

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

DOCTORADO en Medicina y Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN INTESTINAL POR ENTEROBACTERIAS
MULTIRRESISTENTES E IMPLICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN
EL DESARROLLO DE INFECCIONES Y PRONÓSTICO DE PACIENTES
RECEPTORES DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS

PhD THESIS

IMPACT OF INTESTINAL COLONIZATION BY MULTIRESTANT
ENTEROBACTERIA AND IMPLICATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN
THE DEVELOPMENT OF INFECTIONS AND PROGNOSIS OF PATIENTS
RECEIVING AN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL
TRANSPLANTATION

Presentada por: **Claudia González Rico**

Directora: **Prof./Dra. María Carmen Fariñas Álvarez**

Co-Directora: **Prof./Dra. Marta Fernández Martínez**

Santander, Octubre de 2025



INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS DOCTORAL

Dña. María Carmen Fariñas Álvarez, Catedrática de Medicina de la Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria.

Certifica como Directora y Tutora que la Tesis Doctoral que lleva por título:

“IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN INTESTINAL POR ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES E IMPLICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES Y PRONÓSTICO DE PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS”

realizada por Dña. Claudia González Rico, reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente

Fdo. María Carmen Fariñas Álvarez

FARIÑAS ALVAREZ Firmado digitalmente por
MARIA CARMEN - FARIÑAS ALVAREZ MARIA
10041406C CARMEN - 10041406C
Fecha: 2025.11.04
11:49:31 +01'00'

En Santander, a fecha de firma electrónica



INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS DOCTORAL

Dña. Marta Fernández Martínez, Doctora en Biología, responsable de Calidad y Gestión de la Calidad de la Unidad de Terapias Avanzadas de la Fundación Marqués de Valdecilla, Cantabria.

Certifica como Co-Directora que la Tesis Doctoral que lleva por título:

“IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN INTESTINAL POR ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES E IMPLICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES Y PRONÓSTICO DE PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS”

realizada por Dña. Claudia González Rico, reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente

Fdo. Marta Fernández Martínez

**FERNANDEZ
MARTINEZ,
MARTA
(FIRMA)**

Firmado digitalmente
por FERNANDEZ
MARTINEZ, MARTA
(FIRMA)
Fecha: 2025.11.04
13:20:35 +01'00'

En Santander, a fecha de firma electrónica

*“It has [...] everything to do
with the way you see the things”.*

— Elliott Erwitt

“El talento se educa en la calma y el carácter en la tempestad” (o durante la elaboración de una tesis doctoral).

A la Dra. M. Carmen Fariñas, directora y tutora de esta tesis, por la confianza depositada día a día en mis capacidades y por creer que podía llegar al final de este camino incluso cuando yo misma lo dudaba. Por todos los retos, las críticas y los consejos que me han permitido mejorar día a día en mi actividad. Gracias por apostar por una novel sin experiencia en el ámbito clínico y por todas y cada una de las enseñanzas transmitidas, que me han ayudado a crecer no sólo en el ámbito profesional, sino también en el personal.

A la Dra. Marta Fernández Martínez, codirectora de esta tesis, por todo el trabajo desarrollado en este proyecto, su apoyo y sus enseñanzas en el trabajo de laboratorio. Gracias por embarcarte en esta aventura conmigo y atreverte a dejarme con una pipeta en la mano casi sin supervisión.

A todos los centros colaboradores en el estudio, por su dedicación y trabajo excepcional.

A la Dra. Marta Hernández, colaboradora del proyecto, y a todo su equipo, por el apoyo y los medios para el procesamiento y secuenciación de las muestras de microbiota intestinal, sin los que no habríamos podido finalizar este trabajo.

Al equipo del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, por su participación e implicación en el estudio. Su tiempo y dedicación han sido indispensables para poder llevar a cabo este trabajo. En especial, a la Dra. Arancha Bermúdez Rodríguez, quien contribuyó a dar forma a este proyecto, por abrirme las puertas al campo del trasplante hematológico; y al equipo de enfermería, tanto de la planta como de consultas, en especial a Rocío, sin su ayuda hubiera sido imposible tener muestras para analizar.

Al Dr. Alain Ocampo Sosa, tanto por el apoyo en el trabajo de laboratorio como por su orientación dentro del universo de los organismos microscópicos. Gracias por seguir generando hipótesis, aunque el resultado sea incierto.

A Núria Fraile Valcárcel, por su ayuda y experiencia en la poyata.

Al Dr. Jorge Rodríguez Grande, por ser mi “maestro Jedi” en el camino de la bioinformática y guiarme por la madriguera del conejo, aunque a veces aún me pregunto si debería haber elegido la pastilla azul.

A la Dra. Sara Fernández Luis, por su disponibilidad 24/7 y extrema paciencia para contestar a cada uno de mis mails con dudas, más dudas y continuación de dudas. Gracias por todo el tiempo dedicado, por hacer de traductora de cada informe y sigla, haciendo casi entendible lo ilegible, y descubrirme este mundo de marcadores. Sin tu ayuda hubiera sido imposible ver la luz al final del túnel.

A todos/as mis compañeros/as del Servicio de Enfermedades Infecciosas, gracias a los que he aprendido a ver la investigación clínica con otros ojos. A Marta, por acercarme a casa. A Manu, por su disponibilidad para ir a la caza de un consentimiento y acordarse todas las mañanas de que un día no empieza hasta que no se escucha el borboteo de la cafetera. A Carlos, por atreverse a cruzar al mundo al revés y recordarme que no todo es trabajo. A Fran, por no tener horario de consulta (al menos para dudas) y estar siempre dispuesto a ayudar y colaborar. A Itxasne, Paula y Raúl, que, si bien no llegaron a tiempo a este proyecto, contribuyen día a día para que los estudios salgan adelante. A Noelia, por su ayuda y apoyo en el trabajo, que me han permitido liberarme para terminar de escribir estas líneas. Gracias por hacer que levante la vista del teclado de vez en cuando compartiendo momentos de gatos. A los/as compañeros/as de la consulta y secretaría, que siempre nos han apoyado en todos los estudios en los que nos hemos embarcado.

A mis amigos/as, por su apoyo y escucha activa, por las tardes de juegos de mesa y de meriendas de cotilleos, por ayudarme a crear una familia junto a la bahía. A Carlota, Lorién y Pacho, que compartieron conmigo años junto a un ficus y un calamar gigante, por seguir ahí.

A todos los que están y a los que se cruzaron en el camino, porque de todo se aprende.

A mi familia, por su apoyo y cariño, en especial a mis padres, que dicen que siempre ando con historias (y no se equivocan), por inculcarme el valor del trabajo y la responsabilidad; a Laura, por aportar un toque de locura en la seriedad; y a mi hermano, al que siempre he admirado, por estar sin necesidad de decirlo.

A Sara, por romperme los esquemas y darme la oportunidad de construirlos de nuevo. Por ser un ejemplo y una inspiración. Hubiera acabado esta tesis sin ti, pero la contraportada no sería la misma. Contigo todo siempre es mejor.

Y, por último, pero no por ello menos importante, a todos los pacientes que han decidido participar en el estudio, sin los que, sin ninguna duda, sería imposible avanzar en la investigación. Gracias por ayudarme a ver el todo y no solo quedarme con las partes.

ÍNDICE

<i>Abreviaturas</i>	19
<i>Índice de tablas</i>	21
<i>Índice de figuras</i>	23
1. INTRODUCCIÓN	27
Contexto del proyecto de tesis doctoral.....	29
Justificación	30
1.1. Trasplante de progenitores hematopoyéticos	31
1.1.1. Fundamentos del trasplante.....	31
1.1.1.1. <i>Etapas y clasificación de los trasplantes</i>	32
1.1.2. Complicaciones durante el trasplante.....	40
1.1.2.1. <i>Complicaciones infecciosas</i>	40
1.1.2.2. <i>Enfermedad injerto contra huésped</i>	43
1.1.3. Situación actual del trasplante.....	44
1.2. Colonización por enterobacterias multirresistentes	46
1.2.1. Problema de la resistencia a los antimicrobianos.....	46
1.2.2. Infecciones por enterobacterias multirresistentes en el trasplante	52
1.3. Microbiota intestinal	55
1.3.1. Generalidades de la microbiota intestinal	55
1.3.2. Microbiota intestinal en el trasplante	57
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
2.1. Hipótesis	63
2.2. Objetivos.....	64
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1. Diseño del estudio, ámbito y selección de la población	67

3.1.1. Diseño del estudio	67
3.1.2. Periodo del estudio.....	67
3.1.3. Ámbito del estudio	67
3.1.4. Selección de la población de estudio	67
<i>Criterios de inclusión</i>	67
<i>Criterios de exclusión</i>	68
3.1.5. Protocolos clínicos de cada centro participante	68
3.2. Determinación del tamaño muestral	68
3.3. Seguimiento	69
3.4. Recogida de datos clínicos.....	70
3.5. Procesamiento de las muestras. Análisis microbiológicos.....	71
3.5.1. Muestras de colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes .	71
3.5.1.1. <i>Recogida, conservación y transporte de frotis rectales</i>	71
3.5.1.2. <i>Análisis microbiológicos de las cepas</i>	72
3.5.2. Muestras de microbiota intestinal	78
3.5.2.1. <i>Recogida, conservación y transporte de muestras de heces</i>	78
3.5.2.2. <i>Selección de las muestras</i>	79
3.5.2.3. <i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	79
3.5.2.4. <i>Preparación de la librería y secuenciación</i>	80
3.6. Análisis Bioinformático	81
3.6.1. Análisis primario. Calidad, filtrado y preprocesado de las secuencias	82
3.6.2. “ <i>Denoising</i> ” y análisis secundario.....	83
3.6.3. Análisis terciario: análisis estadístico de los datos.....	84
3.7. Análisis estadístico.....	86
3.7.1. Análisis de resultados clínicos y microbiológicos	86
3.7.2. Análisis de resultados de la microbiota intestinal	87
3.8. Aspectos éticos.....	88

4. RESULTADOS.....	89
4.1. Flujo de reclutamiento	91
4.2. Análisis descriptivo de la población de estudio	93
4.2.1. Estudio de colonización intestinal.....	97
4.2.1.1. <i>Análisis multivariante</i>	101
4.2.2. Complicaciones infecciosas por EMR	104
4.2.3. Análisis de supervivencia.....	105
4.3. Caracterización de las enterobacterias multirresistentes	108
4.3.1. Aislamiento en frotis rectales de seguimiento.....	108
4.3.2. Aislamiento en muestras clínicas de infección	112
4.4. Caracterización de la microbiota intestinal.....	115
4.4.1. Análisis descriptivo de los pacientes.....	115
4.4.2. Perfil taxonómico de la microbiota	118
4.4.2.1. <i>Perfil taxonómico y colonización</i>	120
4.4.3. Análisis de diversidad alfa	121
4.4.3.1. <i>Análisis de diversidad basal y durante el periodo de neutropenia</i> ...	122
4.4.3.2. <i>Análisis de supervivencia en función de la diversidad</i>	124
4.4.3.3. <i>Diversidad alfa y colonización</i>	125
4.4.4. Análisis de diversidad beta.....	126
4.4.4.1. <i>Diversidad beta y colonización</i>	128
4.4.5. Análisis de abundancia diferencial.....	129
4.4.5.1. <i>Abundancia diferencial y colonización</i>	134
4.4.6. Tratamiento antibiótico y microbiota intestinal	136
4.4.7. Análisis de microbiota intestinal al año postrasplante	138
4.4.7.1. <i>Caracterización del perfil taxonómico</i>	139
4.4.7.2. <i>Análisis de diversidad alfa</i>	144
4.4.7.3. <i>Microbiota e inmunosupresión</i>	144

4.4.7.4. <i>Microbiota y profilaxis antibiótica</i>	145
5. DISCUSIÓN.....	147
5.1. Características de la población de estudio	150
5.2. Colonización intestinal en el trasplante	152
5.3. Caracterización de las enterobacterias multirresistentes	155
5.4. Microbiota intestinal en el trasplante.....	156
5.4.1. Microbiota intestinal y colonización	159
5.5. Limitaciones del estudio	160
5.6. Fortalezas del estudio.....	162
6. CONCLUSIONES	163
7. BIBLIOGRAFÍA	167
8. ANEXOS.....	187
Anexo I: Artículo aceptado por <i>International Journal of Infectious Diseases</i>	189
Anexo II: Certificado de formación transversal de la Escuela de Doctorado	199
Anexo III: Certificado dictamen favorable CEIm	201
Anexo IV: Modelo de consentimiento informado	207
Anexo V: Documento de instrucciones entregado a pacientes	213
Anexo VI: Comunicaciones a congresos	215

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Criterio de información de Akaike
Alo-TPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASV	Variante de secuencia de amplicón (<i>“Amplicon Variant Sequence”</i>)
ATG	Globulina antitimocítica
Auto-TPH	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CEIm	Comité de Ética de la Investigación con medicamentos y productos sanitarios
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMV	Citomegalovirus
DE	Desviación estándar
DRI	Índice de riesgo de la enfermedad (<i>“Disease Risk Index”</i>)
EARS-Net	Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (<i>“European Antimicrobial Resistance Surveillance Network”</i>)
EBMT	Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula Ósea (<i>“European Society for Blood and Marrow Transplantation”</i>)
EE	Error estándar
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
EICHa	Enfermedad de injerto contra huésped aguda
EICHa-GI	Enfermedad injerto contra huésped con afectación gastrointestinal
EICHc	Enfermedad de injerto contra huésped crónica
EMR	Enterobacterias multirresistentes
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos (<i>“Granulocyte Colony-Stimulating Factor”</i>)
GLASS	Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y su Uso (<i>“Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System”</i>)
GLMM	Modelo lineal generalizado mixto (<i>“Generalized linear mixed model”</i>)

HCT-CI	Índice de comorbilidad específico para el trasplante de células hematopoyéticas (“ <i>Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index</i> ”)
HLA	Antígeno leucocitario humano (“ <i>Human Leukocyte Antigen</i> ”)
HU12O	Hospital Universitario 12 de Octubre
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
HURS	Hospital Universitario Reina Sofía
HUSAL	Hospital Universitario de Salamanca
IC	Intervalos de confianza
IMC	Índice de masa corporal
ITS	Región espaciadora interna trascrita (“ <i>Internal Transcribed Spacer</i> ”)
LEfSe	Ánalisis discriminante lineal con efecto del tamaño (“ <i>Linear discriminant analysis Effect Size</i> ”)
MR	Multirresistente
NIH	Instituto Nacional de Salud (“ <i>National Institutes of Health</i> ”)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
PCoA	Ánalisis de coordenadas principales (“ <i>Principal Coordinate Analysis</i> ”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QIIME	“ <i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i> ”
REDMO	Registro de donantes de médula ósea
Rep-PCR	PCR de repeticiones palindrómicas extragénicas (“ <i>Repetitive extragenic palindromic PCR</i> ”)
RIQ	Rango intercuartílico
RR	Riesgo relativo
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VHS	Virus del herpes simple
VVZ	Virus de la varicela-zóster

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Indicaciones actuales del alotrasplante y autotrasplante. Fuente: Conde García E et al., 2017 (2).....	33
Tabla 2. Índice de comorbilidad del TPH (HCT-CI score). Fuente: Carreras E et al., 2022 (10); adaptado de Sorror M et al., 2005 (11).	34
Tabla 3. Score de Riesgo del EBMT. Fuente: Carreras E et al., 2022 (10); adaptado de Gratwohl A et al., 2009 (12).	35
Tabla 4. Índice de riesgo de enfermedad (DRI index). Fuente: Carreras E et al., 2022 (10); adaptado de Armand P et al., 2012 (13).....	36
Tabla 5. Ejemplos de complicaciones post-TPH. Fuente: Conde García E et al., 2017 (2).	40
Tabla 6. “ <i>Primers</i> ” y protocolo de PCR de genes relacionados con la producción de BLEEs: CTX-M, TEM y SHV. Fuente: Pagani L et al., 2003 (86) y Rasheed JK et al., 1997 (87).	73
Tabla 7. “ <i>Primers</i> ” y protocolo de PCR de los genes blaCTXM del grupo 1 y grupo 9. Fuente: Ruiz del Castillo et al., 2013 (88).....	73
Tabla 8. “ <i>Primers</i> ” y protocolo de PCR de los genes que codifican para carbapenemasas (CBPs). Fuente: Galani I et al., 2005 (89), Miró E et al., 2013 (90), Oteo J et al., 2013 (91), Yigit H et al., 2001 (92), Österblad M et al., 2012 (93) y Poirel L et al., 2011 (94).	74
Tabla 9. “ <i>Primers</i> ” y protocolo de PCR de los genes QNR, responsables de la resistencia a quinolonas. Fuente: Cattoir V et al., 2007 (95), Cano M et al., 2009 (96), Kraychete G et al., 2016 (97) y Rodríguez-Martínez J et al., 2016 (98).	75
Tabla 10. “ <i>Primers</i> ” y protocolo de PCR de los genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMES). Fuente: Miró E et al., 2013 (90), Park C et al., 2006 (99) y Fernández-Martínez M et al., 2015 (100).	76
Tabla 11. “ <i>Primers</i> ” y protocolo de PCR de los genes que codifican para AmpC plasmídicas. Fuente: Pérez-Pérez F et al., 2002 (101).....	77

Tabla 12. Características principales de la población de estudio y su evolución (n=186).	93
Tabla 13. Diagnósticos clínicos de los pacientes durante el seguimiento del estudio (n=186).	96
Tabla 14. Distribución de los pacientes en función de la primera visita en la que se detectó la colonización intestinal (n=76).	98
Tabla 15. Cepas de EMR y mecanismos de resistencia aislados en la población de estudio (n=186).	99
Tabla 16. Características de la población de estudio en función del estatus de colonización intestinal pretrasplante por EMR.....	102
Tabla 17. Características de la población de estudio en función del estatus de colonización intestinal postrasplante por EMR.....	103
Tabla 18. Características de la población incluida en el estudio de microbiota intestinal (n=95).	115
Tabla 19. Abundancia relativa media de los taxones a nivel de filo y género más abundantes en las muestras de microbiota intestinal.....	118
Tabla 20. Abundancia relativa media de los filos y géneros más abundantes a lo largo del seguimiento del estudio.....	119
Tabla 21. Abundancia relativa media de los filos y géneros más abundantes en función del estado de colonización intestinal por EMR.....	121
Tabla 22. Características de la población incluida en el estudio de microbiota intestinal hasta el año post-TPH (n=25).	138
Tabla 23. Abundancia relativa media de los taxones a nivel de filo y género más abundantes en las muestras de microbiota intestinal hasta el año post-TPH.....	139
Tabla 24. Abundancia relativa media por visita de los filos y géneros más abundantes en las muestras de microbiota intestinal hasta el año post-TPH.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado del proceso de hematopoyesis. Fuente: Foucar K, 2018 (4).	31
Figura 2. Esquema del procedimiento llevado a cabo durante el TPH en función del tipo de donante. Fuente: Carreras E, 2016 (9).	37
Figura 3. Esquema de los regímenes de acondicionamiento utilizados en el TPH. Fuente: Conde García E et al., 2017 (2).	39
Figura 4. Tipos de complicaciones infecciosas en función del periodo del TPH. Fuente: Tomblyn M et al., 2009 (17).	42
Figura 5. Número de trasplantes de progenitores hematopoyéticos realizados en España de 2006 a 2024 en función del tipo de TPH. Fuente: ONT, 2024 (23).	45
Figura 6. Muertes globales (número de muertes) atribuibles y asociadas con la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en 2019 por patógeno. Fuente: Murray C et al., 2022 (26).	47
Figura 7. Actualización de 2024 del listado de patógenos prioritarios según la OMS. Fuente: WHO, 2024 (31).	50
Figura 8. Porcentaje de aislados invasivos resistentes por país. Fuente: ECDC, 2024 (33).	51
Figura 9. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos y de aislamientos MR según los hospitales participantes. Fuente: Chumbita M et al., 2022 (45).	54
Figura 10. Distribución de los principales taxones, a nivel de filo y género, en el microbioma intestinal de hombres y mujeres en España. Fuente: Latorre-Pérez A et al., 2021 (51).	56
Figura 11. Esquema del gen que codifica para el ARNr 16S y la posición relativa que abarcan distintos “ <i>primers</i> ” en relación a las regiones variables (V, marcadas en gris). Fuente: Lee H et al., 2023 (104).	80
Figura 12. Esquema del flujo de trabajo empleado en el pipeline QIIME2. Fuente: QIIME 2 development team, 2016 (107).	82

Figura 13. Curvas de rarefacción construidas en Galaxy con el <i>plugin</i> diversity alphararefaction. Fuente: elaboración propia.....	85
Figura 14. Flujo de reclutamiento de la población de estudio y análisis de muestras....	92
Figura 15. Distribución del número de pacientes reclutados por año de realización del trasplante.....	93
Figura 16. Número de frotis recogidos por visita a lo largo del seguimiento.	99
Figura 17. Curva de supervivencia global (A) y no relacionada con la recidiva de la enfermedad hematológica de base (B) de la población de estudio a lo largo del seguimiento.....	106
Figura 18. Curva de supervivencia en función del estado de colonización.....	107
Figura 19. Curva de supervivencia en función de si los pacientes presentaron o no un episodio de infección por EMR durante el seguimiento.....	107
Figura 20. Especies de EMR aisladas en los frotis rectales de seguimiento.	108
Figura 21. Número de EMR aisladas en función del tipo de microorganismo y la visita de seguimiento.....	109
Figura 22. Distribución del grado de resistencia encontrado en las cepas de enterobacterias aisladas.	110
Figura 23. Distribución de los mecanismos de resistencia encontrados en las cepas de enterobacterias aisladas.	110
Figura 24. Distribución del grado y tipo de resistencia detectados por cepa de enterobacteria aislada durante el seguimiento.	111
Figura 25. Especies de EMR aisladas en muestras clínicas causantes de episodios de infección.	112
Figura 26. Distribución del grado de resistencia encontrado en las cepas de enterobacterias aisladas.	113
Figura 27. Distribución de los mecanismos de resistencia encontrados en las cepas de enterobacterias aisladas.	113
Figura 28. Distribución del grado y tipo de resistencia detectados por cepa de enterobacteria aislada en muestras clínicas de infección durante el seguimiento.	114

Figura 29. Porcentaje de EMR obtenidas en función del tipo de muestra clínica.....	115
Figura 30. Abundancia relativa por visita de los taxones más abundantes a nivel de filo (A) y género (B)	120
Figura 31. Análisis de alfa diversidad, según el índice inverso de Simpson, por visita.	122
Figura 32. Curva de supervivencia global en función de la diversidad de la microbiota intestinal en la visita basal (A) y durante el periodo de neutropenia (B).	125
Figura 33. Alfa diversidad de la población de estudio en función de su estado de colonización durante el seguimiento.	126
Figura 34. Análisis de beta diversidad de las muestras pretrasplante en función de haber recibido tratamiento antibiótico durante los 3 meses previos.....	127
Figura 35. Análisis de beta diversidad durante el periodo de neutropenia en relación con el episodio de bacteriemia.	128
Figura 36. Análisis de abundancia diferencial entre los pacientes fallecidos (0) y los que sobrevivieron (1).	129
Figura 37. Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en relación con características de los pacientes asociadas a peor evolución.	132
Figura 38. Asociación de la abundancia de <i>Blautia</i> con la evolución clínica de los pacientes.	133
Figura 39. Análisis de abundancia diferencial en función del estado de colonización intestinal por EMR (0 (rojo), no colonizados; 1 (turquesa), colonizados).	134
Figura 40. Abundancia relativa de <i>Enterobacteriales</i> y <i>Escherichia</i> en relación con características de los pacientes asociadas a peor evolución.	135
Figura 41. Abundancia relativa de <i>Blautia</i> por visita en función del estado de colonización intestinal por EMR.	136
Figura 42. Alfa diversidad de la microbiota intestinal por visita en función de la exposición a antibioterapia antes de la recogida de la muestra.	137
Figura 43. Perfil taxonómico de las muestras recogidas hasta el año post-TPH a nivel de género.	141

Figura 44. Abundancia relativa por visita de los taxones a nivel de filo (A) y género (B) en los que se observaron cambios significativos en la población estudiada hasta el año post-TPH.....	142
Figura 45. Evolución de la abundancia relativa por paciente de los taxones más abundantes a nivel de filo (A) y género (B)	143
Figura 46. Análisis de alfa diversidad, según el índice inverso de Simpson, por visita de la cohorte con seguimiento hasta el año post-TPH.	144
Figura 47. Análisis de la diversidad alfa, medida según el índice inverso de Simpson, de las muestras recogidas hasta el día 14 post-TPH en función de si los pacientes habían recibido o no profilaxis antibiótica.....	145
Figura 48. Abundancia relativa de los taxones a nivel de filo (A) y género (B) de las muestras recogidas hasta el día 14 post-TPH en función de si los pacientes habían recibido o no profilaxis antibiótica.....	146

1. INTRODUCCIÓN

CONTEXTO DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

Este trabajo de doctorado se engloba en el marco de un proyecto de investigación financiado por el Subprograma de Proyectos de Investigación en Salud de la Convocatoria 2016 de la Acción Estratégica en Salud 2016-2019 (PI16/01415), con un subproyecto anidado; y en un proyecto de investigación concedido por el Programa de Dinamización de la Investigación Biosanitaria de Cantabria – Programa de Apoyo a Investigadores Emergentes “Next-Val” (NVAL21/18). Todos los proyectos cuentan con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos y productos sanitarios (CEIm) de Cantabria y de los comités de los centros participantes.

El proyecto **PI16/01415**, “*Impacto de la colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes en las infecciones sistémicas, EICH y mortalidad de pacientes receptores de trasplante alogénico de médula ósea. Estudio EN THERE-SCT*” (código CEIm: PI16/01415), cuya investigadora principal es la Dra. M. Carmen Fariñas Álvarez, es un estudio multicéntrico de cohortes prospectivo, llevado a cabo en cinco hospitales del territorio nacional, tres de los cuales participaron también en el subestudio de la microbiota intestinal, “*Estudio del microbioma intestinal, su composición, variaciones, e implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estudio MICROBIOMA-SCT*” (código CEIm: 2017.112).

El proyecto **NVAL 21/18**, “*Composición del microbioma intestinal y su implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad de injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estudio MITAPH*” (código CEIm: NVAL21/18), finalizado en octubre de 2023, cuya investigadora principal es Claudia González Rico, es un estudio multicéntrico en el que, a partir de la cohorte de pacientes incluida en el estudio EN THERE-SCT y MICROBIOMA-SCT, se ha estudiado el efecto de la composición de la microbiota intestinal en la evolución de estos pacientes hasta el año postrasplante. Este proyecto se ha llevado a cabo en dos de los hospitales participantes en dichos proyectos.

JUSTIFICACIÓN

- Las complicaciones infecciosas en pacientes receptores de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), especialmente en el periodo post-TPH precoz, continúan siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad tempranas, junto con la recidiva, la enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda, la toxicidad del tratamiento y el fracaso del injerto.
- En los últimos años, se ha visto un incremento de las infecciones por microorganismos resistentes a antimicrobianos, consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) una de las principales amenazas para la salud pública en la actualidad. Destaca la particular amenaza de las bacterias gramnegativas multirresistentes (MR), incluidas en el listado de patógenos con prioridad crítica, especialmente los pertenecientes al orden *Enterobacteriales*.
- El uso de antimicrobianos de amplio espectro es un factor de riesgo conocido para la colonización y propagación de enterobacterias MR (EMR), afectando particularmente al campo de la hematología, ya que los pacientes con neoplasias hematológicas reciben antimicrobianos de forma frecuente tanto para profilaxis como tratamiento.
- Los pacientes con infecciones por microorganismos MR son más propensos a recibir tratamiento antibiótico empírico inadecuado, lo que se ha asociado con un aumento de la mortalidad.
- La alteración de la microbiota intestinal durante el TPH se ha relacionado con una peor evolución clínica de los pacientes trasplantados, en términos de mayor número de infecciones, eventos de EICH y una mayor mortalidad.

Por tanto, es fundamental conocer la resistencia de la flora local y el estado de colonización de los pacientes para lograr un tratamiento inmediato adecuado. La microbiota intestinal tiene un papel protector frente a patógenos, pero durante el alo-TPH se produce una desregulación de estas comunidades microbianas. Los estudios existentes sobre microbiota se centran principalmente en el periodo de neutropenia, justificando investigaciones a largo plazo para determinar si la reducción de la inmunosupresión permite la recuperación de la microbiota basal y cambios en la colonización por EMR, reduciendo así las infecciones y la EICH.

1.1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

1.1.1. Fundamentos del trasplante

La investigación en este campo surgió con el objetivo de intentar reparar los efectos producidos por la radiación tras observar la mielosupresión (afección en la que disminuye la actividad de la médula ósea) que ocasionaba en los supervivientes de los bombardeos nucleares de 1945 en Hiroshima y Nagasaki (Japón) (1).

El objetivo del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es restaurar la función medular del paciente mediante la administración de células progenitoras hematopoyéticas de un donante sano para recuperar el correcto funcionamiento de la hematopoyesis, proceso biológico que da lugar a la formación de las células sanguíneas a partir de un precursor celular común, conocido como célula madre hematopoyética o *stem cell* (figura 1) (2–4). Alteraciones en este proceso, en cuanto a la composición, cantidad o morfología de células sanguíneas generadas, producen una serie de enfermedades conocidas como enfermedades hematológicas (4).

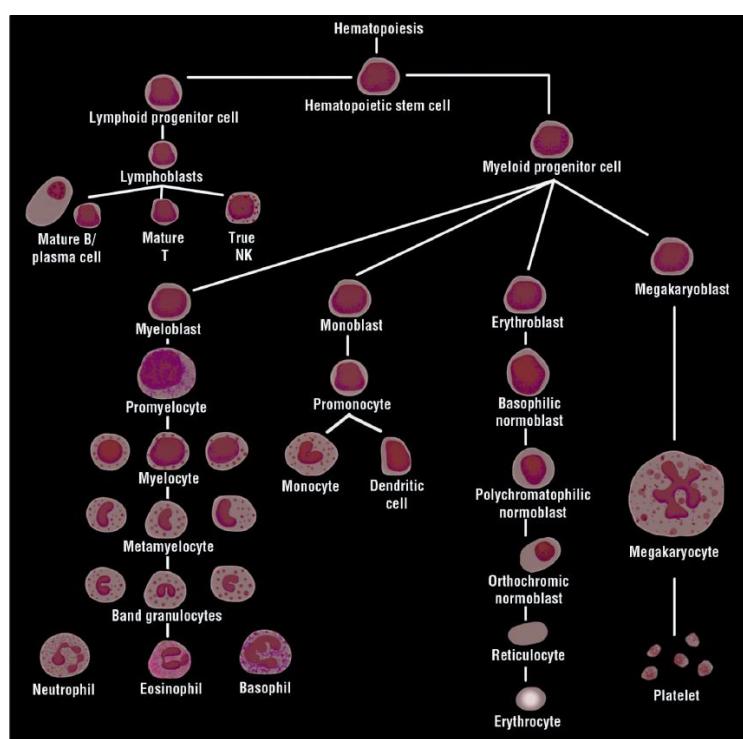


Figura 1. Esquema simplificado del proceso de hematopoyesis. Fuente: Foucar K, 2018 (4). Se observan los diferentes estadios de diferenciación celular desde la célula madre hematopoyética, precursora común, hasta los diferentes tipos de células sanguíneas ya maduras y funcionales.

Siguiendo el principio de que altas dosis de radiación/quimioterapia podrían erradicar la enfermedad hematológica y suprimir el sistema inmune del paciente permitiendo que aceptara las células de un donante; Thomas ED et al. (5), en 1957, demostraron que la médula ósea de un donante podía ser infundida de manera segura e injertarse en un paciente con leucemia. Aunque finalmente la leucemia recidivó.

Posteriormente, en 1958, el grupo de Mathé G (6) intentó aplicar el trasplante de médula ósea en seis trabajadores de una central nuclear accidentalmente expuestos a irradiación corporal total. Cuatro de los trabajadores sobrevivieron, aunque las células del donante únicamente persistieron de forma transitoria.

Se sucedieron varios intentos de aplicar este procedimiento sin éxito durante la década de los 60. Bortin M (7), en 1970, recogió los resultados publicados de 200 TPH realizados entre 1957 y 1967, en los que todos los pacientes habían fallecido, bien por fallo del injerto, enfermedad injerto contra huésped (EICH), complicaciones infecciosas o recurrencia de la enfermedad. No fue hasta la segunda mitad de la década de los 60 cuando comenzaron a obtenerse resultados prometedores gracias al refinamiento de los tratamientos de acondicionamiento, a la comprensión del sistema de antígenos leucocitarios humanos (*“human leucocyte antigen”*, HLA) y el papel de la histocompatibilidad entre donante-receptor, y al control de la EICH.

Hoy en día, los TPH constituyen una terapéutica establecida para gran variedad de enfermedades que afectan a la médula ósea (8) (tabla 1).

1.1.1.1. Etapas y clasificación de los trasplantes

El TPH es un término que engloba distintos procedimientos y se puede dividir en una serie de etapas (2, 3, 9):

- Valoración pretrasplante del paciente.
- Selección del donante y extracción de células progenitoras hematopoyéticas.
- Acondicionamiento.
- Infusión de células progenitoras hematopoyéticas.
- Seguimiento post-TPH y control de complicaciones.

Tabla 1. Indicaciones actuales del alotrasplante y autotrasplante. Fuente: Conde García E et al., 2017 (2).

Alotrasplante	Autotrasplante
Enfermedades adquiridas	
Leucemias agudas (leucemia aguda mieloblástica y leucemia aguda linfoblástica)	Mieloma múltiple
Síndromes mielodisplásicos	Linfomas (Hodgkin y no Hodgkin)
Síndromes mieloproliferativos	Leucemias agudas
Leucemia linfoide crónica	Amiloidosis
Linfomas (Hodgkin y no Hodgkin)	Enfermedades autoinmunes
Mieloma múltiple	Tumores sólidos:
Hemoglobinuria paroxística nocturna	Neuroblastoma
Aplasia medular grave	Tumores germinales
	Sarcoma de Ewing
	Sarcoma de partes blandas
Enfermedades congénitas	
Inmunodeficiencia combinada grave	
Talasemia mayor	
Anemia de Fanconi	
Anemia de Blackfan-Diamond	
Neutropenia de Kostmann	
Síndrome de Wiskott-Aldrich	
Enfermedad granulomatosa crónica	
Osteopetrosis	
Otras inmunodeficiencias congénitas	

En la fase de **valoración pretrasplante** se comprueba el estadio en el que se encuentra la enfermedad del paciente, la indicación existente para llevar a cabo el trasplante y las comorbilidades y posibles factores de riesgo presentes, de manera que se pueda evaluar el potencial riesgo-beneficio de la realización del procedimiento. Para ello se aplican distintos índices de riesgo específicos:

- Índice de comorbilidad específico para el trasplante de células hematopoyéticas (“*Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index*”, HCT-CI) (tabla 2). Evalúa el impacto de las diferentes comorbilidades del paciente en la mortalidad del procedimiento, estableciéndose tres grupos de riesgo con diferentes porcentajes de mortalidad a los 2 años no debida a recidiva o relacionada con el TPH: bajo riesgo (0 puntos): mortalidad del 14%; riesgo intermedio (1-2 puntos): mortalidad del 21%; y alto riesgo (≥ 3 puntos): mortalidad del 41%.

Tabla 2. Índice de comorbilidad del TPH (HCT-CI score). Fuente: Carreras E et al., 2022 (10); adaptado de Sorror M et al., 2005 (11).

Comorbilidad/definición	Puntos
Edad ≥ 40 años	1
<i>Arritmia</i>	1
Fibrilación auricular o <i>flutter</i> , síndrome del seno, arritmia ventricular	
<i>Cardíaca</i>	1
Enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, IAM, FE $\leq 50\%$	
<i>Enfermedad inflamatoria intestinal</i>	1
Enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa que ha requerido tratamiento	
<i>Diabetes</i>	1
Que requiere insulina o antidiabéticos orales en las 4 semanas previas al TPH	
<i>Cerebrovascular</i>	1
ACV, o AIT o trombosis cerebral	
<i>Enfermedad psiquiátrica</i>	1
Depresión o ansiedad u otros, requiriendo tratamiento (no a demanda)	
<i>Enfermedad hepática leve</i>	1
Hepatitis crónica, bilirrubina $> 1,5 \times VN$ o AST/ALT $> 2,5 \times VN$	
VHB previa o infección por VHC	
<i>Obesidad</i>	1
IMC $> 35 \text{ kg/m}^2$	
<i>Infección previa</i>	1
Infección al ingreso que requiere continuar con el tratamiento después del día 0 del TPH	
<i>Enfermedad pulmonar moderada</i>	2
DLCO y/o FEV1 66–80% o disnea de mínimos esfuerzos	
<i>Enfermedad reumatólogica</i>	2
Lupus sistémico, artritis reumatoide, polimiositis, polimialgia reumática, enfermedad del tejido conectivo	
<i>Úlcera péptica</i>	2
Diagnóstico endoscópico o radiológico (no aplicable si solo reflujo o gastritis)	
<i>Renal</i>	2
Creatinina $> 176 \text{ mmol/L}$, diálisis o trasplante renal previo	
<i>Neoplasia previa¹</i>	3
Cualquier neoplasia, excluyendo el cáncer de piel distinto al melanoma	
<i>Valvulopatía cardíaca</i>	3
Diagnosticada, excepto el prolапso de válvula mitral	
<i>Enfermedad pulmonar grave</i>	3
DLCO y/o FEV1 $\leq 65\%$, disnea de reposo o necesidad de oxígeno domiciliario	
<i>Enfermedad hepática grave</i>	3
Bilirrubina $\geq 5 \times VN$ o AST/ALT $\geq 5 \times VN$ o cirrosis	

IAM, infarto agudo de miocardio; FE, fracción de eyeccción; ACV, accidente cerebrovascular; AIT, accidente isquémico transitorio; VN, valor normal; AST, aspartato-aminotransferasa; ALT, alanina-transaminasa; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C; IMC, índice de masa corporal; DLCO, capacidad de difusión pulmonar para el monóxido de carbono; FEV1, volumen espiratorio forzado en el primer segundo. La puntuación final se obtiene a partir del sumatorio de todas las comorbilidades presentes en el paciente.

¹En la versión más reciente se incluyen también en esta categoría tumores hematológicos de estirpe diferente al que motiva el trasplante (ej. Linfoma previo en paciente con LMA, pero no SMD previo en paciente con LMA).

- Score de riesgo de la Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula Ósea (“European Group for Blood and Marrow Transplantation [EBMT] risk score”) (tabla 3), índice pronóstico que permite estimar el riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante: riesgo bajo (0-2 puntos): mortalidad del 17%; riesgo intermedio (3-4 puntos): mortalidad del 50%; riesgo alto (5-6 puntos): mortalidad del 70%.

Tabla 3. Score de Riesgo del EBMT. Fuente: Carreras E et al., 2022 (10); adaptado de Gratwohl A et al., 2009 (12).

Variables	Valor de la variable	Puntos
Edad	<20 años	0
	20-40 años	1
	>40 años	2
Estado enfermedad ¹	Inicial	0
	Intermedio	1
	Avanzado	2
Intervalo diagnóstico-TPH ²	<12 meses	0
	≥12 meses	1
Donante ²	Hermano HLA-ídéntico	0
	Donante no emparentado	1
Sexo donante-receptor	Mujer a Hombre	1
	Otras combinaciones	0

El score se obtiene de la suma de los puntos de cada una de las variables.

¹No aplicar en pacientes con anemia aplásica grave (AAG). Inicial= Leucemia aguda (LA) en primera remisión completa (RC1); Síndrome mielodisplásico en RC1 o sin tratar; Leucemia mieloide crónica (LMC) en primera fase crónica (FC); Linfoma no Hodgkin (LNH) / Mieloma múltiple (MM) sin tratar o en RC1. Intermedio= LA en segunda remisión completa (RC2); LMC en otro estado que no sea fase acelerada (FA) o crisis blástica (CB); SMD en RC2 o en remisión parcial (RP); LNH/MM en RC2, RP o enfermedad estable. Avanzada= LA en otras fases; LMC en crisis blástica; SMD en todos los demás estadios; LHN/MM en todos los demás estadios.

²No se aplica a los pacientes en RC1.

- Índice de riesgo de la enfermedad (“Disease Risk Index”, DRI) (tabla 4). Índice pronóstico basado en la enfermedad y su estado en el momento del TPH. No tiene en cuenta factores como la edad o las comorbilidades.

Tabla 4. Índice de riesgo de enfermedad (DRI index). Fuente: Carreras E et al., 2022 (10); adaptado de Armand P et al., 2012 (13).

Riesgo	Enfermedad
Bajo	LMA con citogenética favorable, LLC, LMC, LNH-B indolentes
Intermedio	LMA o SMD con citogenética de riesgo intermedio, neoplasias mieloproliferativas, MM, LH, LDCBG, LNH-B indolente transformado, MCL, LNH-T nodal
Alto	LMA o SMD con citogenética adversa, LNH-T extranodal

Riesgo	Estadio
Bajo	RC1, RC ≥ 2 , RP1, no tratado, LMC en FC, RP ≥ 2 (si AIR)
Alto	RP ≥ 2 (si AMA), fracaso inducción, REC activa, LMC en FA o CB

Riesgo enfermedad	Riesgo estadio	Riesgo global	Supervivencia global a los 4 años
Bajo	Bajo	Bajo	64% (56–70%)
Bajo	Alto	Intermedio	46% (42–50%)
Intermedio	Bajo		
Intermedio	Alto	Alto	26% (21–31%)
Alto	Bajo		
Alto	Alto	Muy alto	6% (0–21%)

LMA, leucemia mieloide aguda; LLC, leucemia linfoblástica crónica; LMC, leucemia mieloide crónica; LNH-B, linfoma no-Hodgkin de células B; SMD, síndrome mielodisplásico; MM, mieloma múltiple; LH, linfoma de Hodgkin; LDCBG, linfoma difuso de células B grandes; LCM, linfoma de células del manto; LNH-T, linfoma no-Hodgkin de células T; RC1, primera remisión completa; RC ≥ 2 , segunda o posteriores remisiones completas; RP, remisión parcial; FC, fase crónica; AIR, acondicionamiento de intensidad reducida; AMA, acondicionamiento mieloablativo; REC, recidiva/recaída; FA, fase aguda; CB, crisis blástica.

Las indicaciones para la realización del TPH han ido cambiando a lo largo del tiempo (14, 15). Las diferentes sociedades científicas, entre ellas la EBMT, establecen periódicamente una serie de recomendaciones, basadas en la evidencia científica y en opiniones de expertos, para la indicación de TPH en enfermedades hematológicas y autoinmunes. En el año 2022, se publicó la última actualización realizada por la EBMT (15).

Los TPH se pueden **clasificar** en función del tipo de donante seleccionado, la fuente de células progenitoras hematopoyéticas elegida y la histocompatibilidad donante-receptor:

A) *Tipo de donante* (figura 2) (2, 3, 9):

- *Trasplante autólogo, autogénico o autotrasplante (auto-TPH)*: las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen del propio paciente antes de que se eliminen las células anómalas con quimioterapia y/o radioterapia.
- *Trasplante alogénico o alotrasplante (alo-TPH)*: las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen de un donante sano.
- *Trasplante singénico*: es una particularidad del trasplante alogénico. En este caso, el donante de células progenitoras hematopoyéticas es un hermano gemelo univitelino.

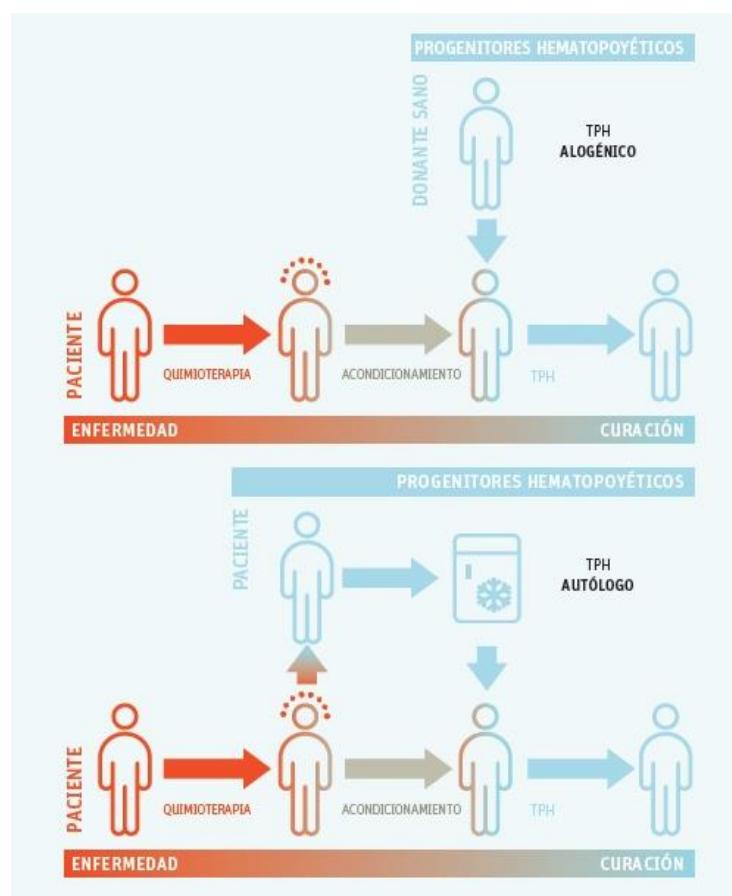


Figura 2. Esquema del procedimiento llevado a cabo durante el TPH en función del tipo de donante. Fuente: Carreras E, 2016 (9).

B) Fuente de células progenitoras hematopoyéticas:

- *Médula ósea:* las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen mediante punciones a nivel de la cresta ilíaca posterosuperior.
- *Sangre periférica:* las células progenitoras hematopoyéticas se recogen mediante aféresis tras haber estimulado su movilización desde la médula ósea a la sangre con el uso de un factor estimulante de colonias de granulocitos (*granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF*).
- *Sangre de cordón umbilical:* las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen tras el parto. El principal inconveniente de esta fuente es que el volumen total obtenido es escaso, pudiendo no ser suficiente para un receptor adulto.

C) Histocompatibilidad donante-receptor en el alo-TPH:

- *HLA idéntico:* el donante puede ser un hermano o un donante no emparentado con idéntico HLA. El primer caso, un hermano HLA idéntico, se considera el mejor donante para un alo-TPH.
- *HLA no idéntico:* donante no emparentado con una disparidad en uno de los alelos (9/10).
- *HLA haploidéntico:* donante emparentado que comparte al menos un haplotipo (conjunto de alelos de los genes de HLA de uno de los cromosomas, heredado de uno de los parentales) con el paciente.

El tratamiento de **acondicionamiento** es la combinación de quimioterapia, con o sin radioterapia, que se administra antes de la infusión de las células progenitoras hematopoyéticas con dos objetivos: *antineoplásico*, eliminando la totalidad o mayor cantidad posible de enfermedad residual; e *inmunosupresor*, generando una inmunosupresión suficiente para permitir que las células del donante no sean eliminadas por el sistema inmune del paciente (sólo aplica en el alo-TPH). Según su intensidad hablamos de (2, 3, 10):

- *Acondicionamiento mieloablutivo:* produce una mielosupresión irreversible seguida de una pancitopenia muy intensa que requiere de la infusión de células progenitoras hematopoyéticas para su recuperación.
- *Acondicionamiento no mieloablutivo:* la mielosupresión no suele ser completa, produce pancitopenias moderadas, de menor duración, se podría dar una recuperación sin necesidad de la infusión de células progenitoras hematopoyéticas del donante. Es un régimen muy immunosupresor, por lo que los linfocitos T del donante son capaces de desplazar la hematopoyesis del paciente consiguiendo finalmente que la hematopoyesis del donante predomine.
- *Acondicionamiento de intensidad reducida:* se encuentra entre los dos anteriores, provocan una pancitopenia prolongada y habitualmente requieren células progenitoras hematopoyéticas de rescate del donante.

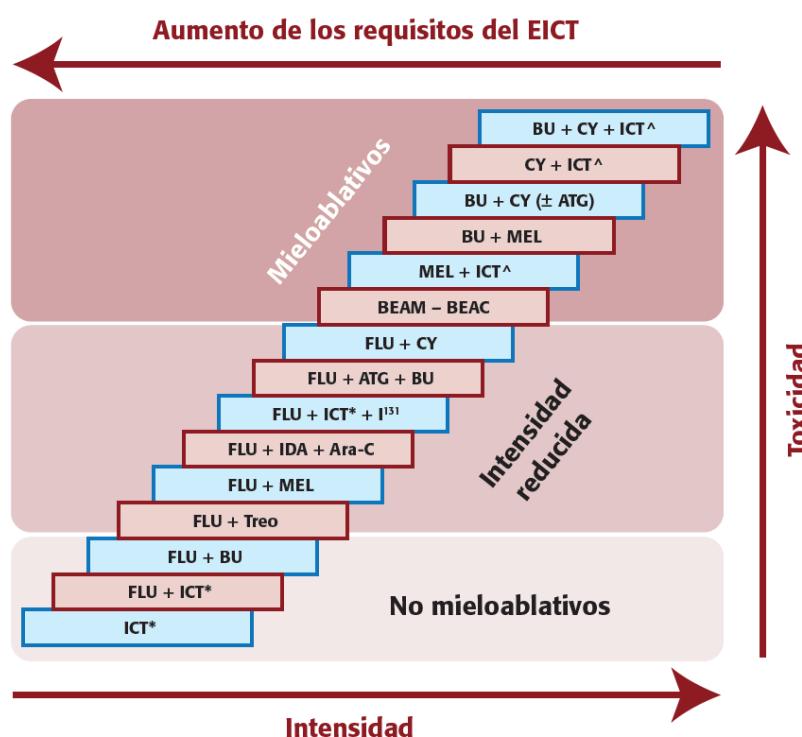


Figura 3. Esquema de los regímenes de acondicionamiento utilizados en el TPH. Fuente: Conde García E et al., 2017 (2).

Ara-C, arabinósido de citosina; ATG, globulina antitimocítica; BEAC, carmustina, etopósido, citarabina y ciclofosfamida; BEAM, carmustina, etopósido, citarabina y melfalán; BU, busulfán; CY, ciclofosfamida; EICT, efecto injerto contra tumor; FLU, fludarabina; I¹³¹, iodo 131; IDA, idarubicina; ICT^, irradiación corporal total a dosis altas (8 a 12,3 Gy); ICT*, irradiación corporal total a dosis bajas (2 a 4 Gy); MEL, melfalán; Treo, treosulfán.

La **infusión de las células progenitoras hematopoyéticas** se considera el día 0 del trasplante y se realiza a las 24-48 horas de haber finalizado el acondicionamiento.

Una vez realizada la infusión de células progenitoras hematopoyéticas, en general se consideran tres periodos o fases durante el **seguimiento post-TPH**: la fase previa al prendimiento del injerto (0 a 30 días después del trasplante), la fase temprana (30 a 100 días después del trasplante) y la fase tardía (>100 días después del trasplante). Cada una de estas fases tiene implícitas una serie de complicaciones derivadas de la toxicidad del acondicionamiento previo y de problemas inmunológicos debido al aloinjerto (tabla 5).

Tabla 5. Ejemplos de complicaciones post-TPH. Fuente: Conde García E et al., 2017 (2).

Complicaciones precoces
<ul style="list-style-type: none">• Insuficiencia medular• Mucositis• Fallo de injerto• Síndrome de obstrucción sinusoidal (enfermedad venooclusiva hepática)• Neumonitis intersticial• Enfermedad injerto contra huésped aguda• Neurotoxicidad• Cardiotoxicidad
Complicaciones tardías
<ul style="list-style-type: none">• Enfermedad injerto contra huésped crónica• Inmunodeficiencia: infecciones• Trastornos endocrinos: hipotiroidismo, esterilidad, trastornos del crecimiento• Trastornos oculares: cataratas, síndrome seco• Enfermedad pulmonar: obstructiva (bronquiolitis obliterante) y restrictiva• Autoinmunidad exacerbada: anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, etc.• Enfermedad ósea: osteoporosis, necrosis aséptica• Recaída de la enfermedad de base• Segundas neoplasias

1.1.2. Complicaciones durante el trasplante

1.1.2.1. Complicaciones infecciosas

El tipo de infección y su gravedad dependen de varios factores relacionados con el procedimiento del TPH, principalmente el tiempo transcurrido desde el trasplante y la presencia o ausencia de EICH. Otros factores incluyen el tipo de trasplante, la histocompatibilidad donante-receptor, si se ha llevado a cabo una depleción de los linfocitos T en el inóculo, el tipo de profilaxis para EICH empleada, diagnóstico de algún

proceso infeccioso previo al trasplante, o el haber recibido tratamiento antibiótico previo (16, 17).

Para ayudar al abordaje de las posibles complicaciones infecciosas durante el seguimiento de estos pacientes, se estratifica el procedimiento de trasplante en distintas fases. Esta división se fundamenta en las características clínicas que suelen presentar los pacientes en esos tiempos, con el objetivo de mejorar la prevención, el diagnóstico rápido y conseguir un tratamiento anticipado efectivo de dichos episodios. Siguiendo la clasificación establecida por Sable C y Donowitz G (16) cuyas fases postrasplante se mantienen en las guías de prevención de complicaciones infecciosas del 2009 (17), se establecen cuatro periodos principales:

- *Periodo pretrasplante*: debido a las características heterogéneas de los pacientes (enfermedad de base, quimioterapia recibida, historial de infecciones previas), el riesgo de infección en este periodo es muy variable, siendo un factor crucial la presencia de neutropenia y la alteración de las barreras naturales de la piel y las membranas mucosas. En este periodo, la mayoría de las infecciones son causadas por bacilos gramnegativos aerobios, siendo mayoritariamente infecciones locales de piel y partes blandas, de la cavidad oral o del tracto urinario (16).
- *Periodo pre-injerto (o pre-implante)*: corresponde al periodo entre el día 0, día de la infusión, y el día 30 post-TPH. Se caracteriza por un periodo de aplasia con neutropenia profunda. El tipo de infecciones detectadas en este periodo dependerá del acondicionamiento empleado, por ejemplo, la asociación de irradiación corporal total a la quimioterapia se ha relacionado con mayor incidencia de diarrea y bacteriemia (16). Además, estos regímenes de tratamiento producen daños en la barrera mucocutánea, un 70% de los pacientes receptores de alo-TPH presentan complicaciones severas en la mucosa oral. La situación de neutropenia prolongada y la pérdida de integridad en las barreras anatómicas dan lugar a un riesgo sustancial de bacteriemia e infecciones fúngicas, involucrando a especies de *Candida* y *Aspergillus*, si la neutropenia se prolonga. Además, también puede producirse la reactivación del virus del herpes simple (VHS), siendo estos los agentes infecciosos más importantes en este periodo (16, 17).

- *Periodo intermedio, post-injerto:* corresponde al periodo entre el día 30 y 100 post-TPH. El factor más importante en este periodo es el grado de recuperación inmune del paciente, la presencia de EICH, el grado de afectación de las mucosas y el tratamiento inmunosupresor empleado para el EICH. En este periodo predominan las infecciones secundarias a defectos en la inmunidad celular, los herpesvirus, en particular el citomegalovirus (CMV), son agentes infecciosos comunes durante este periodo. Otros patógenos dominantes durante esta fase incluyen *Pneumocystis jiroveci* y especies de *Aspergillus* (16, 17).
- *Periodo postrasplante tardío:* a partir de los 100 días postrasplante. La presencia de EICH crónica (EICHc), su afectación a nivel de los distintos órganos y el retraso en la recuperación del sistema inmune que puede acarrear, son los factores más importantes que predisponen a desarrollar un proceso infeccioso. En ausencia de EICH, las infecciones son poco frecuentes. En este periodo predominan las infecciones secundarias a defectos en las barreras de defensa y en la inmunidad humoral y celular. Se localizan principalmente en la piel, tracto respiratorio superior e inferior. Más del 40% de las infecciones son infecciones virales, principalmente por virus de la varicela-zóster (VVZ) y CMV; aproximadamente el 33% son infecciones bacterianas, principalmente por bacterias encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae*; y un 20% son infecciones fúngicas (16, 17).

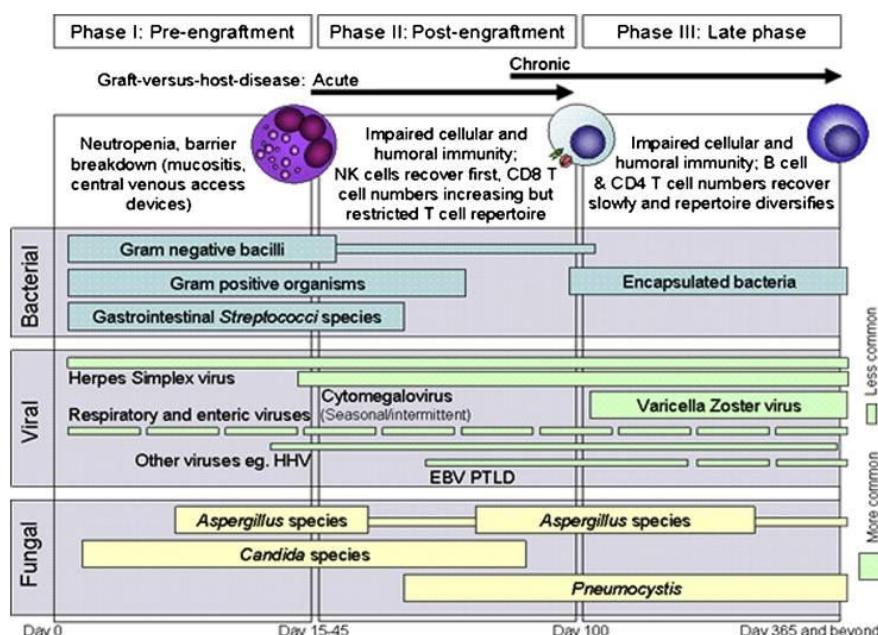


Figura 4. Tipos de complicaciones infecciosas en función del periodo del TPH. Fuente: Tomblyn M et al., 2009 (17).

1.1.2.2. Enfermedad injerto contra huésped

La EICH es debida al reconocimiento y la destrucción por parte de los linfocitos T del donante de antígenos extraños en el receptor (alorreactividad). Supone una de las principales causas de morbi-mortalidad del alo-TPH y compromete la calidad de vida de los pacientes. Se diferencia entre EICH aguda (EICHa) y crónica.

La **EICHa** afecta principalmente a tres órganos: la piel, el tubo digestivo y el hígado. En torno al 40% de los pacientes sometidos a un alo-TPH desarrollan un episodio de EICHa, que suele aparecer entre la segunda y décima semana tras el trasplante. Se caracteriza por la aparición de un exantema cutáneo, alteración de la función hepática y diarrea. Provoca una profunda inmunosupresión y la reactivación de virus latentes. Su incidencia aumenta en proporción directa con la disparidad en el sistema HLA entre el donante y el receptor, así como con la edad. También es mayor en los pacientes que no reciben una adecuada profilaxis de la EICHa, en los pacientes CMV seropositivos y en los receptores varones cuyo donante es una mujer. En función del nivel de afectación de los diferentes órganos se pueden distinguir cuatro grados, de I a IV.

La **EICHc** es una de las complicaciones tardías más frecuentes del alo-TPH, 30-70%, aumenta con la edad y es más frecuente en aquellos pacientes que han padecido una EICHa previa grado III-IV. Es la causa más importante de morbilidad tardía no relacionada con la recidiva y de mortalidad. La fisiopatología de la EICHc es diferente de la de la EICHa, junto con la alorreactividad de los linfocitos del donante, se produce un deterioro de los mecanismos de tolerancia inmunitaria que afectan a la inmunidad innata y adaptativa. Normalmente, las manifestaciones clínicas comienzan entre los 3 meses y los 2 años post-TPH. Puede afectar a uno o varios órganos simultáneamente. Se valoran ocho localizaciones anatómicas: piel, boca, ojos, hígado, pulmón, tracto gastrointestinal, tracto genital y sistema musculoesquelético. Según el número de órganos y el grado de afectación, diferenciamos entre: leve, 1-2 órganos con afectación leve (se excluye el pulmón); moderado, ≥ 3 órganos con una afectación leve-moderada (en el caso de pulmón sólo se acepta afectación leve); y severo, ≥ 3 órganos con afectación severa (moderada o severa en el caso del pulmón) (2, 3, 10, 18).

Clásicamente, esta diferenciación atendía a un criterio temporal, considerándose EICHa si se presentaba antes de los 100 días post-TPH y EICHc si aparecía a partir del día 100. Actualmente, la diferenciación se realiza según los signos y síntomas clínicos específicos

observados (2, 3, 10), de tal forma que, según el Grupo de Consenso de Expertos en EICH del Instituto Nacional de Salud (“*National Institutes of Health*”, NIH) (19), podemos diferenciar:

- EICHa clásica: signos y/o síntomas característicos de EICHa que aparecen dentro de los 100 días posteriores al TPH en ausencia de características diagnósticas de EICHc.
- EICHa persistente, recurrente y de inicio tardío: signos y/o síntomas característicos de EICHa que aparecen >100 días post-TPH, en ausencia de características diagnósticas de EICHc.
- EICHc clásica: características diagnósticas y distintivas de EICHc independientemente del tiempo post-TPH. El paciente no presenta datos de EICHa.
- Síndrome de solapamiento o EICH “overlap”: coexisten características de EICHc y EICHa, independientemente del tiempo post-TPH.

La profilaxis de EICH con tratamiento inmunosupresor persigue evitar su aparición al disminuir la alorreactividad de la respuesta linfocitaria. No existe una estrategia aceptada globalmente, las recomendaciones se basan en estudios retrospectivos y prospectivos de series pequeñas (10). Los fármacos habitualmente empleados como profilaxis son: corticoides, inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A o tacrolimus), inhibidores de mTOR (sirólimus), fármacos anti-proliferativos (metotrexato, mofetil micofenolato y ciclofosfamida) y anticuerpos (globulina antitimocítica [ATG], alemtuzumab). En general, se emplea la combinación de al menos un inhibidor de la calcineurina y un fármaco anti-proliferativo (3, 10).

1.1.3. Situación actual del trasplante

Cambios en la metodología del trasplante, que proporcionan una recuperación hematopoyética más rápida, han permitido su realización en pacientes de mayor riesgo por su edad y por la fase de la enfermedad (20, 21).

Además, el uso de distintas fuentes de células progenitoras hematopoyéticas y de tipos de donantes (no emparentados), ofrece opciones de trasplante a un mayor porcentaje de

pacientes (17, 21). Este aumento en el número de donantes potenciales se ve reflejado en el registro oficial en España de donantes voluntarios y unidades de cordón, el Registro de Donantes de Médula Ósea (REDMO), creado en 1991 por la Fundación Josep Carreras contra la leucemia. Según los datos publicados en su memoria del 2024 (22), actualmente existen en España 505.505 donantes voluntarios y 61.214 unidades de sangre de cordón almacenadas en los ocho bancos de sangre de cordón umbilical establecidos en nuestro país. A nivel global, existen en el mundo más de 40 millones de donantes de médula ósea y más de 800.000 unidades de sangre de cordón umbilical, lo que ha incrementado la posibilidad de encontrar un donante compatible y la posibilidad de realización de un trasplante no emparentado. Los últimos datos publicados por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), en la memoria de actividad, confirman este aumento progresivo del número de TPH que se viene observando desde el año 2006, habiéndose registrado 3.844 TPH (2.246 autólogos y 1.598 alogénicos) en 2024 (figura 5) (23).

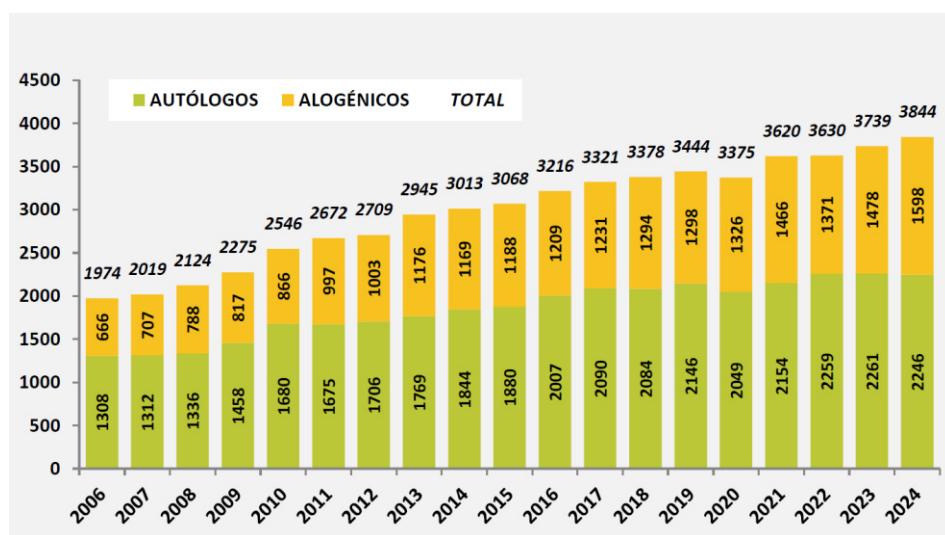


Figura 5. Número de trasplantes de progenitores hematopoyéticos realizados en España de 2006 a 2024 en función del tipo de TPH. Fuente: ONT, 2024 (23).

Si bien las mejoras en los cuidados paliativos de los pacientes con inmunosupresión y mielosupresión graves han disminuido la morbilidad y la mortalidad a causa de las complicaciones infecciosas (17), se ha visto un incremento notable de su incidencia debido al uso de agentes inmunosupresores cada vez más potentes, la depleción linfoide del inóculo y la lesión de las barreras anatómicas por el acondicionamiento (24), especialmente en el periodo post-TPH precoz. Por todo ello, las complicaciones infecciosas continúan siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad

tempranas, junto con la recaída de la enfermedad, la EICHa, la toxicidad relacionada con el tratamiento y el fracaso del injerto (17, 21).

1.2. COLONIZACIÓN POR ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES

1.2.1. Problema de la resistencia a los antimicrobianos

Las enfermedades producidas por microorganismos resistentes a antimicrobianos o microorganismos multirresistentes (MR) son consideradas actualmente como una enfermedad global emergente, siendo una de las 10 principales amenazas para la salud pública según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (25). Un análisis sistemático realizado para estimar la carga global de resistencia bacteriana a antimicrobianos concluyó que 1,27 millones de muertes acontecidas en el mundo en 2019 fueron directamente atribuibles a la resistencia a los antimicrobianos y que ésta contribuyó a 4,95 millones de muertes (26). Los principales patógenos resistentes descritos en este artículo fueron *Escherichia coli*, seguida de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (figura 6).

En Europa se calcula que las bacterias MR causan 33.000 muertes al año y generan un gasto sanitario adicional de unos 1.500 millones de euros (27).

Si bien la resistencia a los antimicrobianos es un proceso natural debido a los cambios genéticos producidos en los patógenos a lo largo del tiempo; el uso excesivo e inadecuado de los antimicrobianos, tanto en el ámbito de salud humana como a nivel de salud animal y uso medioambiental, proporciona la presión selectiva necesaria para su aparición y propagación (25, 28).

Para abordar esta problemática, a nivel mundial los países adoptaron el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos durante la Asamblea Mundial de la Salud de 2015, comprometiéndose a desarrollar e implementar planes de acción nacionales multisectoriales con un enfoque de “Una Salud” para abordar la resistencia a los antimicrobianos (25). Ese mismo año, la OMS puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y su Uso (“Global Antimicrobial

Resistance and Use Surveillance System”, GLASS), como primer esfuerzo colaborativo mundial para estandarizar la vigilancia de la resistencia.

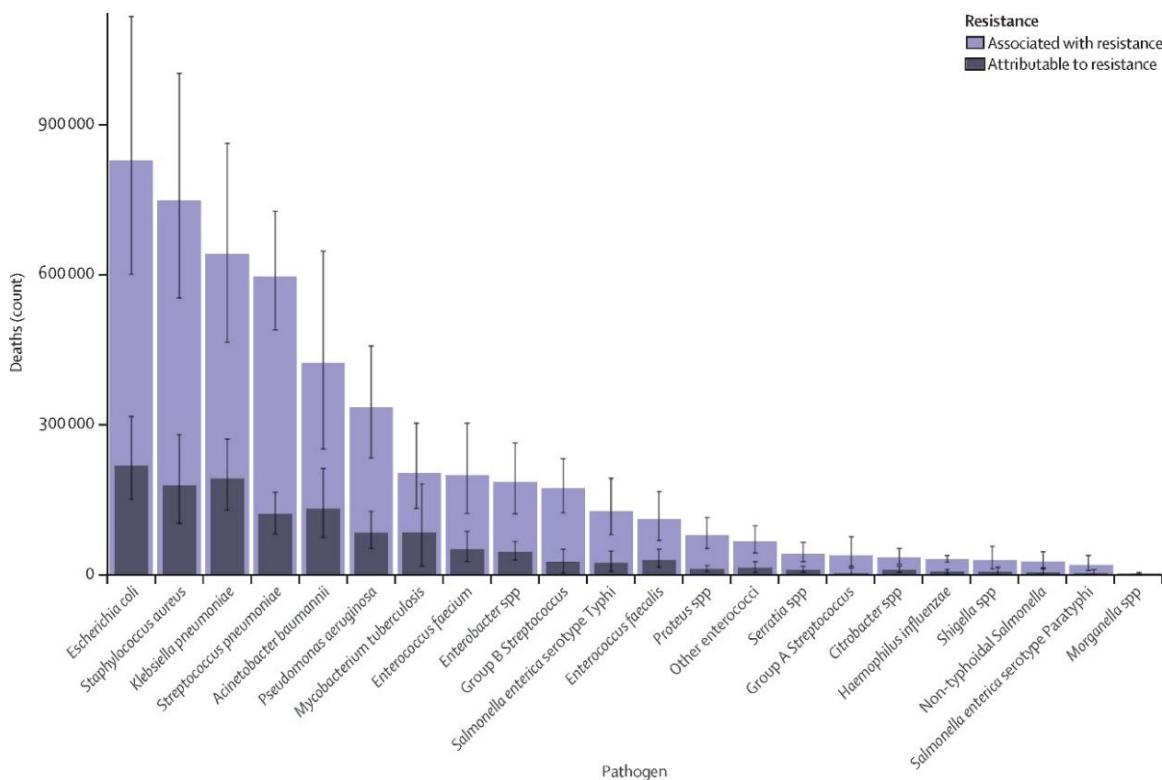


Figura 6. Muertes globales (número de muertes) atribuibles y asociadas con la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en 2019 por patógeno. Fuente: Murray C et al., 2022 (26).

En 2017, se publicó la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos que representaban la mayor amenaza para la salud humana (29, 30). Se incluyeron 12 familias de bacterias, destacando la particular amenaza que suponen las bacterias gramnegativas MR por su capacidad innata de generar nuevos mecanismos de resistencia y de transferir genes de resistencia a otras bacterias, haciéndolas a su vez resistentes, al estar albergados en fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) altamente móviles, conocidos como elementos genéticos móviles. Dicha lista se dividió en tres categorías: prioridad crítica, alta y media, atendiendo al nivel de resistencia de los patógenos al tratamiento, la tasa de mortalidad, la prevalencia y la carga que representan para el sistema de atención médica. Dentro de la categoría de prioridad crítica se consideraron aquellos patógenos que representan una amenaza particular en el ambiente hospitalario, centros sociosanitarios y en pacientes cuya atención requiere el uso de dispositivos invasivos, como ventiladores o catéteres. Los patógenos de la categoría de prioridad alta son

aquellos que pueden causar infecciones difíciles de tratar en personas sanas, pero no tienen un alto riesgo de mortalidad generalmente. Entre los patógenos incluidos en la categoría de prioridad media se incluyen aquellos que mantienen opciones de tratamiento eficaz pero cuya resistencia va en aumento (31).

- **Prioridad crítica:**

- *A. baumannii*, resistente a los carbapenémicos.
- *P. aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos.
- *Enterobacteriaceae* (actualmente orden *Enterobacteriales*), resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Dentro de *Enterobacteriaceae* se incluye: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., and *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp.

- **Prioridad alta:**

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina.
- *S. aureus*, resistente a la meticilina, resistente a la vancomicina.
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina.
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas.
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas.
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas de tercera generación, resistente a las fluoroquinolonas.

- **Prioridad media:**

- *S. pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina.
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina.

- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas.

En el documento técnico publicado el 4 de septiembre de 2017 (30), la OMS incluye un apartado referente a la tuberculosis y modifica la categoría de *Enterobacteriales* de prioridad crítica, haciendo referencia a aquellas resistentes a los carbapenémicos y/o resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

El 17 de mayo de 2024 se publica la primera actualización de esta lista de patógenos prioritarios (32, 33). Se incluyen 24 patógenos que abarcan 15 familias de bacterias resistentes a los antibióticos atendiendo a la nueva evidencia científica y conocimiento de los expertos sobre la resistencia a los antimicrobianos (figura 7). La categorización se lleva a cabo evaluando ocho criterios: mortalidad, incidencia, carga sanitaria no mortal, tendencia de la resistencia, transmisibilidad, posibilidad de prevención en los centros sanitarios y en la comunidad, posibilidad de tratamiento, y número de antibióticos en desarrollo que los abordan (34).

Las bacterias gramnegativas, especialmente las pertenecientes al orden *Enterobacteriales*, continúan siendo patógenos prioritarios (33).

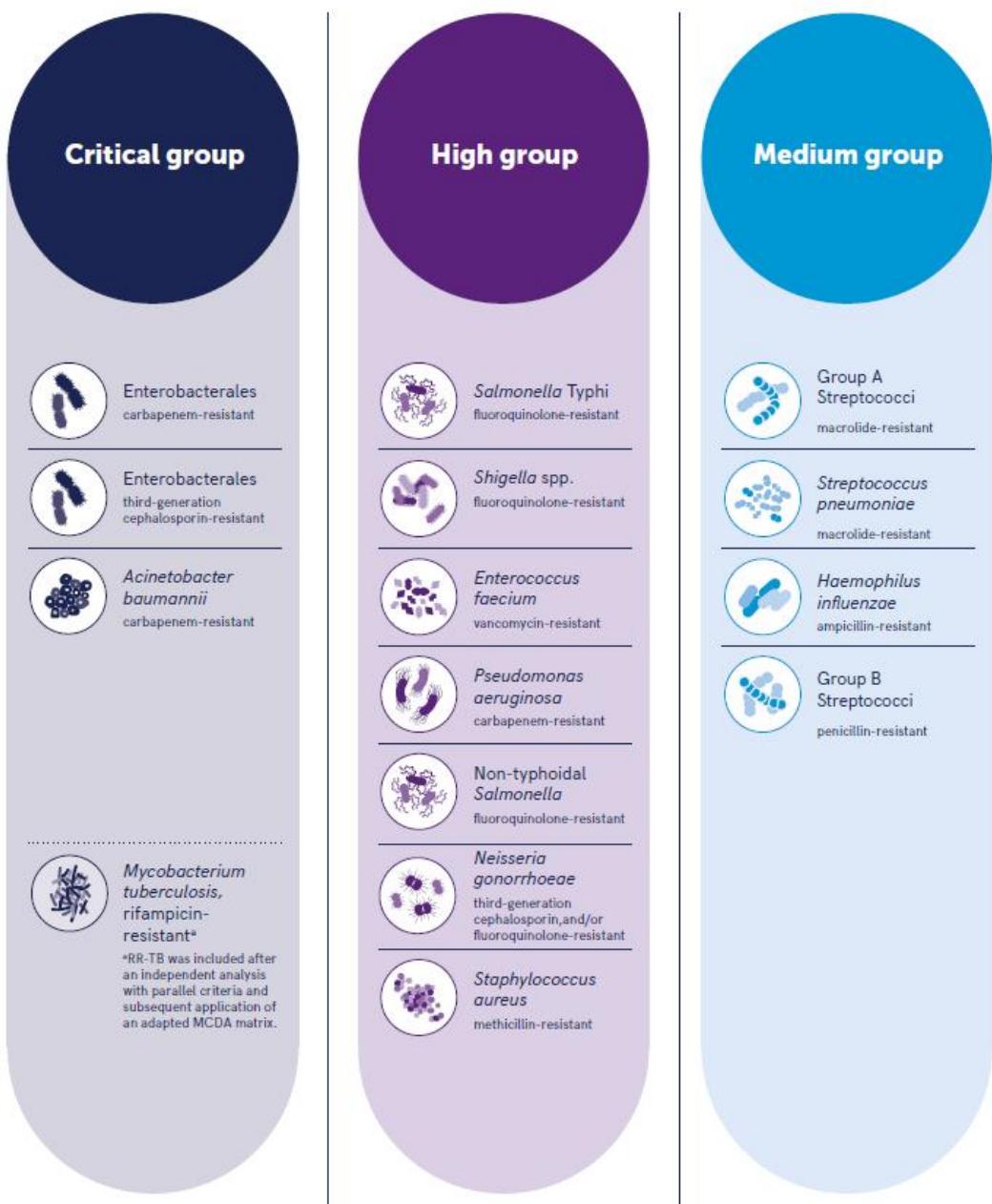


Figura 7. Actualización de 2024 del listado de patógenos prioritarios según la OMS. Fuente: WHO, 2024 (33).

Según el último informe epidemiológico, publicado en el año 2024, de la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (“European Antimicrobial Resistance Surveillance Network”, EARS-Net), la incidencia de bacteriemias por *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación en la Unión Europea solo mostró una pequeña disminución en comparación con 2019 (año de referencia) y la incidencia de bacteriemias por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos mostró un aumento de más del 50% en

comparación con 2019, lo que contrarresta el objetivo fijado de una reducción del 5% para 2030 (35).

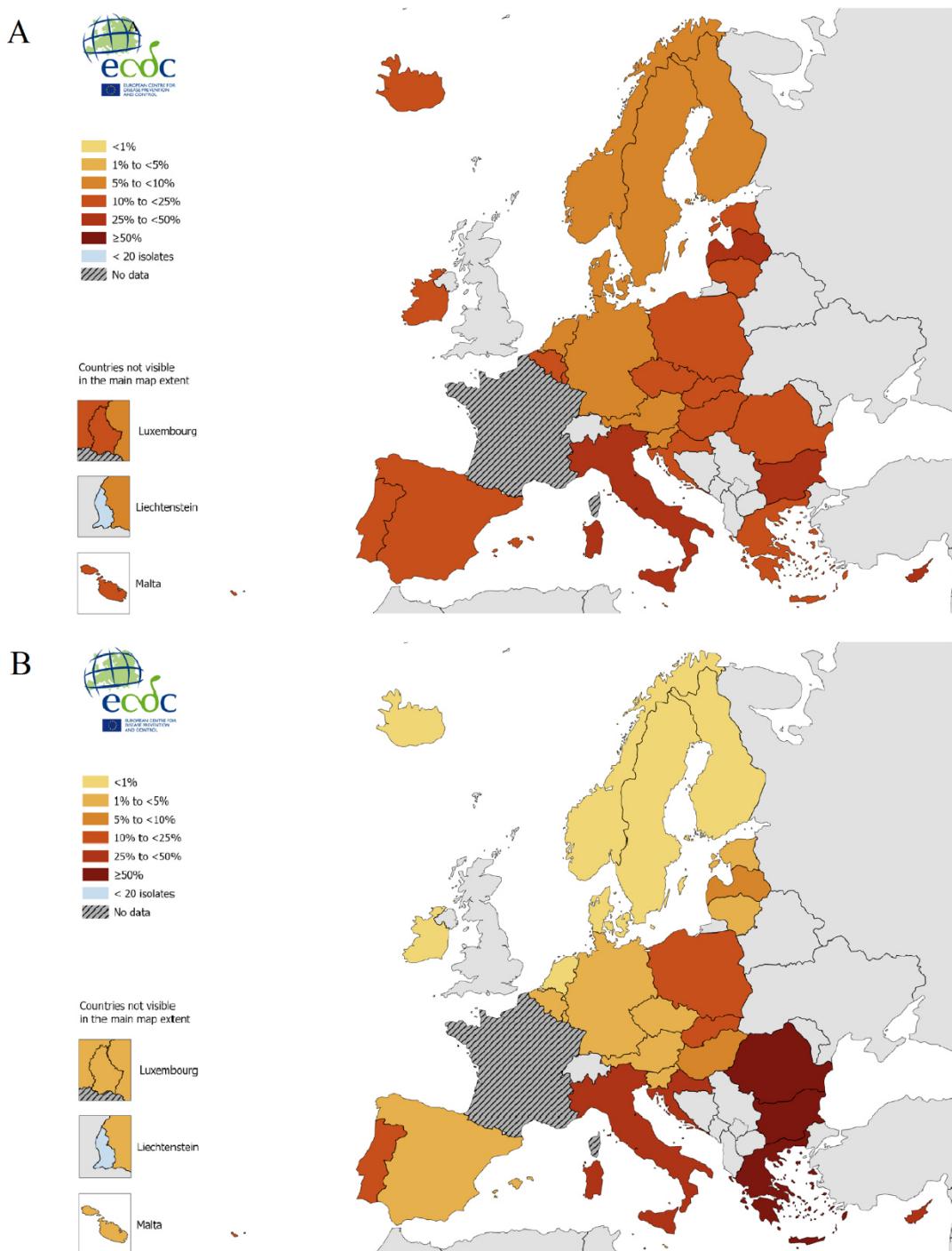


Figura 8. Porcentaje de aislados invasivos resistentes por país. Fuente: ECDC, 2024 (35).
a) *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima/ceftriaxona/ceftazidima), y b) *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes (imipenem/meropenem).

En el caso de los microorganismos gramnegativos, los cambios en la incidencia estimada de bacteriemias en la Unión Europea indican que, a falta de medidas de salud pública más contundentes y rápidas, se pueden esperar nuevos aumentos en los próximos años (35).

A nivel nacional, Peñalva G et al. (36) publicaron a principios de 2025 los resultados de tres estudios multicéntricos realizados en varios hospitales de España en 2018, 2019 y 2023 con el objetivo de evaluar la carga de la resistencia a los antimicrobianos en nuestro territorio. Se realizó un muestreo de microorganismos MR en todas las muestras clínicas enviadas para diagnóstico de infección de pacientes ingresados, incluyéndose sólo aquellos pacientes con nuevos diagnósticos de infección y considerando únicamente 10 microorganismos MR, entre ellos las enterobacterias MR (EMR). Recogieron la incidencia de resistencia de forma prospectiva y calcularon las estimaciones anuales ponderadas y ajustadas estacionalmente para todo el país. Los resultados obtenidos alertan sobre la elevada carga de enfermedad causada por las infecciones por microorganismos MR entre los pacientes hospitalizados en España, que permanece estable a lo largo del periodo de estudio. En el año 2023 estimaron una frecuencia a nivel nacional de 173.653 infecciones por microorganismos MR, con 24.582 muertes dentro de los 30 días posteriores al diagnóstico. Estos datos son significativamente superiores a los estimados por el Ministerio de Sanidad en 2015, 3.058 muertes. Esto hace necesario intensificar las medidas nacionales de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos.

El uso de antimicrobianos de amplio espectro es un factor de riesgo conocido para la colonización y propagación de EMR (35). El campo de la hematología se ve particularmente afectada, ya que los pacientes con neoplasias hematológicas reciben antimicrobianos frecuentemente, tanto en profilaxis como tratamiento (37).

1.2.2. Infecciones por enterobacterias multirresistentes en el trasplante

En el alo-TPH la mayoría de las infecciones ocurren en el periodo de neutropenia, antes del prendimiento del injerto. Durante este periodo, las infecciones bacterianas por microorganismos grampositivos y gramnegativos suponen más del 90% de las infecciones, siendo entre un 20-30% bacterémicas (38).

Distintas estrategias desarrolladas a partir de la década de los 60, como el uso de profilaxis con fluoroquinolonas y el uso de antibioterapia empírica en caso de fiebre durante el periodo de neutropenia, consiguieron reducir las infecciones por bacilos gramnegativos,

que constituían la principal causa de mortalidad relacionada con la infección en esta etapa. Este hecho conllevó un cambio en la epidemiología de las infecciones bacterianas, aumentando la prevalencia de infecciones por bacterias grampositivas durante las décadas de 1980 y 1990, consecuencia también del uso más frecuente de catéteres venosos centrales. Sin embargo, en los últimos años, se ha producido nuevamente un cambio en esta tendencia, habiéndose detectado un aumento significativo de la proporción de bacteriemias causadas por bacilos gramnegativos, principalmente enterobacterias, y un aumento de las producidas por microorganismos MR, siendo los patógenos más frecuentes las enterobacterias productoras de BLEE, resistentes a fluoroquinolonas y *P. aeruginosa* resistente a carbapenemes (37–39).

La neutropenia y los tumores malignos hematológicos se han descrito como factores de riesgo independiente para bacteriemia por *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (40–42).

En nuestro país Gudiol C et al. (39) han comunicado en pacientes con neutropenia y neoplasias hematológicas, no solo un incremento de las infecciones por bacilos gramnegativos, sino un incremento por bacilos gramnegativos MR. Estos hallazgos son consistentes con los de otros estudios recientes, los cuales observan un aumento en la resistencia a los antibióticos entre los bacilos gramnegativos en pacientes inmunodeprimidos, incluyendo pacientes con enfermedades malignas y receptores de TPH (39, 41–44).

Estos pacientes son más propensos a recibir tratamiento antibiótico empírico inadecuado, de ahí que la tasa de mortalidad asociada a las infecciones por bacilos gramnegativos MR sea alta, variando entre el 36% y el 95% (39, 42–45)

Averbuch D et al. (46) publicaron en 2017 un estudio realizado para evaluar el nivel de resistencia entre los bacilos gramnegativos causantes de episodios de bacteriemia en pacientes receptores de TPH. Participaron un total de 65 centros de 25 países de Europa, Australia y Asia, habiéndose recogido un total de 655 episodios de bacteriemia por bacilos gramnegativos. El 75,6% de los centros empleaba profilaxis con fluoroquinolonas en el alo-TPH. El 73% de los episodios de bacteriemia fue causado por EMR. De los 704 aislamientos de bacilos gramnegativos resistentes, la mitad presentaron resistencia a fluoroquinolonas, en enterobacterias de forma significativamente más frecuente, y a

betalactámicos antipseudomónicos no carbapenémicos, el 18,5% eran resistentes a carbapenémicos y el 35,2% se clasificaron como MR. La ratio de bacilos gramnegativos resistentes a fluoroquinolonas fue mayor en aquellos centros que empleaban profilaxis con dichos fármacos, que en aquellos centros en los que no realizaban profilaxis. Además, con relación a la evolución de estos pacientes, se observó una mayor mortalidad en aquellos con episodios de bacteriemia causados por MR que en aquellos con bacteriemias por microorganismos sensibles. Las tasas de mortalidad más altas en infecciones causadas por bacterias resistentes se asociaron con un tratamiento empírico inadecuado.

A nivel nacional, en un estudio realizado en 14 hospitales de España publicado en 2022 por Chumbita M et al. (47), se describieron unas tasas extremadamente altas de resistencias a los betalactámicos empíricos recomendados en las guías sobre neutropenia febril. El 34,7% de los bacilos gramnegativos aislados fueron resistentes a al menos uno de los tres betalactámicos recomendados en dichas guías (cefepima, piperacilina/tazobactam y meropenem) (figura 9). Se detectó un alto porcentaje (16,6%) de tratamiento antibiótico empírico inadecuado, siendo este más frecuente en episodios de bacteriemia causados por bacilos gramnegativos MR frente a los causados por bacilos gramnegativos sensibles (46,3% versus 6,1%; $p<0,001$). En general, la mortalidad a los 30 días fue del 14,6%, alcanzando el 16,3% en los episodios causados por bacilos gramnegativos MR y el 21,6% en aquellos pacientes que recibieron tratamiento antibiótico empírico inadecuado.

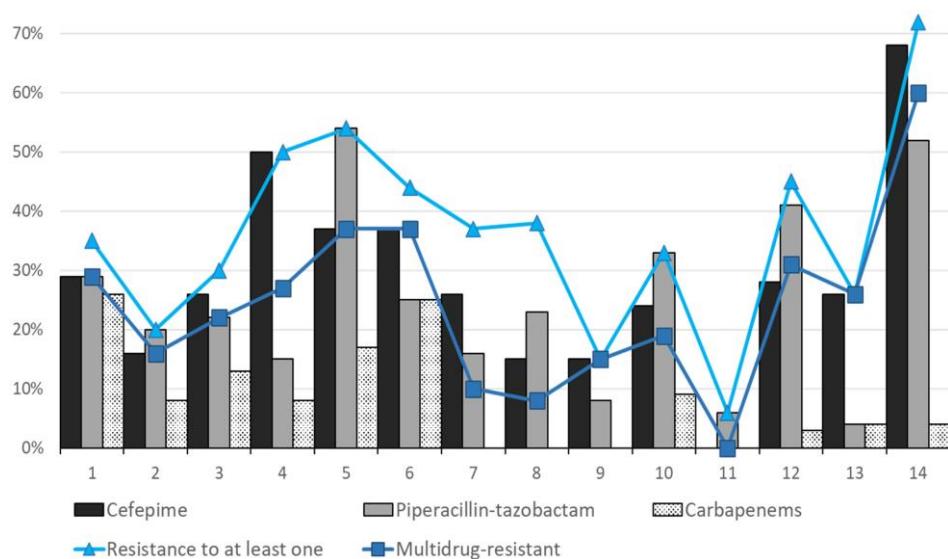


Figura 9. Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos y de aislamientos MR según los hospitales participantes. Fuente: Chumbita M et al., 2022 (47).

La terapia empírica inapropiada y la mortalidad fueron significativamente más frecuentes en las infecciones causadas por bacterias resistentes. Ambas publicaciones (46, 47) concluyen la importancia de conocer la epidemiología local para un tratamiento adecuado e identificar mejor a los pacientes con un alto riesgo de desarrollar una infección por bacilos gramnegativos MR.

Por otro lado, la utilidad de la profilaxis antibiótica con quinolonas en el TPH es objeto de mucho debate. Si bien algunos estudios ponen de manifiesto su implicación en la reducción de la incidencia de episodios febriles y de infecciones documentadas, no parece demostrar una mejora en la supervivencia de los pacientes (48). Además, el empleo de quinolonas tiene efectos secundarios y se ha identificado como un factor de riesgo para la colonización e infección por varios microorganismos resistentes a múltiples fármacos, sobre todo enterobacterias productoras de BLEE y *S. aureus* resistentes a la meticilina (40, 41), encontrándose diferencias en su uso en hospitales del mismo territorio nacional. De hecho, se contempla que la profilaxis con quinolonas debe estar sujeta a la consideración de datos epidemiológicos locales sobre patrones de resistencia y a la monitorización de la aparición de resistencias (AIII).

Estudios previos (48, 49) han puesto de manifiesto como la colonización intestinal por bacilos gramnegativos puede ser un predictor de episodios de bacteriemia por dichos microorganismos al incrementar el riesgo de ocasionarlos, sugiriendo que la determinación de la composición de la microbiota intestinal y los perfiles de dominancia de microorganismos podría ayudar a identificar a pacientes con alto riesgo de bacteriemia.

1.3. MICROBIOTA INTESTINAL

1.3.1. Generalidades de la microbiota intestinal

La **microbiota** es el conjunto de microorganismos residentes en un nicho ecológico determinado. Está formado por virus, bacterias, arqueas, hongos y otros organismos eucariotas (como protozoos), siendo las bacterias el grupo de microorganismos más numeroso. El término **microbioma** engloba tanto al conjunto de microorganismos presentes en un entorno específico, que interactúan entre sí, como sus genomas, distintos

metabolitos derivados y las condiciones del ambiente específico en el que se encuentran (50, 51).

El aparato digestivo alberga al ecosistema de microorganismos más complejo, diverso y numeroso del cuerpo humano, especialmente en el ciego, donde la densidad de microorganismos es la mayor que hay en nuestro organismo y está compuesto principalmente por bacterias anaerobias estrictas (50). En una persona adulta, el tracto gastrointestinal puede albergar entre 500 y 1.000 especies de microorganismos, siendo las bacterias de los filos *Bacteroidota* ($\approx 25\%$) y *Firmicutes* ($\approx 60\%$) los mayoritarios. En menor proporción se detectan *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Spirochaetes*, las arqueas, los hongos, los protozoos, los virus y otros microorganismos (52).

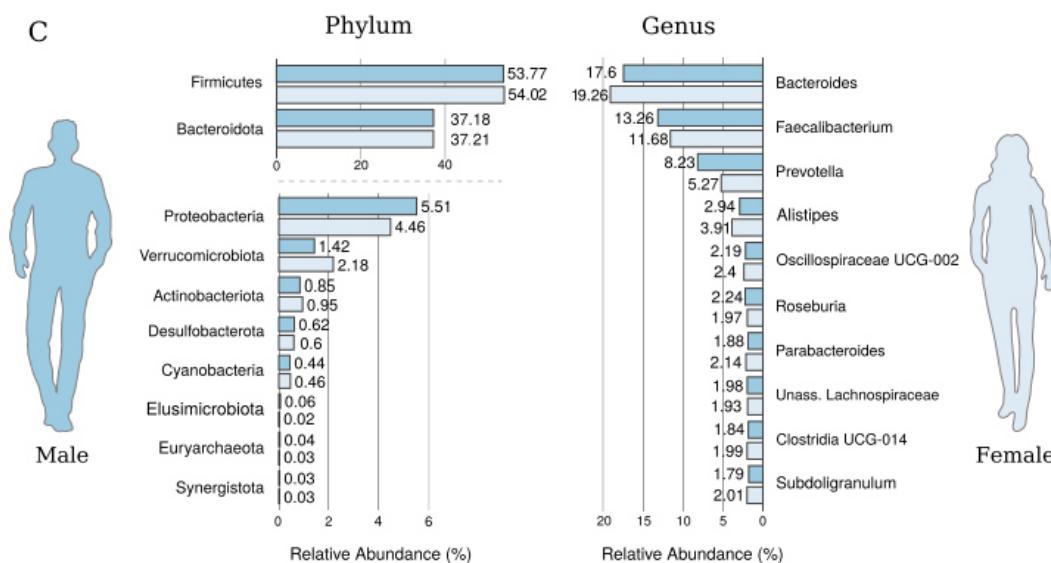


Figura 10. Distribución de los principales taxones, a nivel de filo y género, en el microbioma intestinal de hombres y mujeres en España. Fuente: Latorre-Pérez A et al., 2021 (53).

Además de la diversidad, presencia de distintos tipos de microorganismos, se ha descrito la importancia del mantenimiento de las proporciones de microorganismos presentes en la microbiota para su correcta funcionalidad, habiéndose establecido el parámetro ratio *Firmicutes/Bacteroidota* para su evaluación (50).

Las principales funciones de la microbiota intestinal en equilibrio (eubiosis) están relacionadas con funciones metabólicas y nutricionales, ayudan en la digestión de los alimentos y en la producción de vitaminas B y K, que el organismo humano no es capaz

de sintetizar; funciones de protección antimicrobiana, previenen la colonización por otros microorganismos potencialmente patógenos; funciones de mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal y de regulación de la respuesta inmune (50, 51, 54–56). Cambios en la composición de la microbiota intestinal pueden ser potencialmente dañinos (57, 58).

La microbiota experimenta cambios como consecuencia de la influencia de múltiples factores como el propio crecimiento del individuo, la dieta, los hábitos de vida, el estrés y el uso de tratamientos antimicrobianos, entre otros. Si bien presenta una gran capacidad de resiliencia, en algunas ocasiones la naturaleza de la alteración es tan fuerte que se produce un estado de disbiosis, alteración en la composición y/o funciones de los microorganismos que forman parte de la microbiota, caracterizada por una menor diversidad, observando una dominancia de un taxón concreto ($>30\%$), un menor número de microorganismos comensales y mayor presencia de microorganismos patógenos. Este desequilibrio se ha relacionado con distintos estados patológicos, como trastornos inflamatorios crónicos (57–59).

Los patobiontes son microorganismos comensales habituales de la microbiota humana que en un estado de equilibrio tienen funciones beneficiosas para nuestro organismo, pero son potencialmente patógenos en condiciones de un ecosistema alterado; por lo que juegan un papel fundamental cuando se da un estado de disbiosis (50).

1.3.2. Microbiota intestinal en el trasplante

Se sabe que la microbiota mantiene una compleja relación con el epitelio de la mucosa intestinal. Durante el alo-TPH, esta relación se ve alterada debido al daño que produce la quimioterapia en el epitelio, la desregulación de las poblaciones de microorganismos por el uso de antibióticos y la supresión del sistema inmune innato. El papel que esta alteración juega en el desarrollo de infecciones sistémicas, desarrollo de la EICH y mayor mortalidad en el alo-TPH está siendo actualmente objeto de estudio (49, 60, 61).

Se ha visto que esta disbiosis puede resultar en un predominio de microorganismos potencialmente patógenos, sobre todo enterococos y bacterias gramnegativas (*P. aeruginosa*, *Enterobacteriales*) (62). El daño inducido por la quimioterapia en el epitelio intestinal y la superposición de neutropenia permiten a las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal difundir a través de la pared intestinal, provocando infecciones sistémicas que amenazan la vida (49, 60, 62–64). Esto sugiere que la evaluación de la

microbiota intestinal y su evolución durante el alo-TPH podría permitir identificar en los pacientes un mayor riesgo de desarrollar infecciones, especialmente de bacteriemia y sepsis (64).

En estudios realizados en pacientes receptores de alo-TPH la mortalidad fue significativamente mayor en pacientes con menor diversidad en la microbiota intestinal, pudiendo ser considerada, por tanto, un factor importante en el éxito o el fracaso del alo-TPH (64, 65). Un estudio multicéntrico reciente desarrollado por Peled J et al. (66) analizó la microbiota intestinal de 1.362 pacientes sometidos a un alo-TPH en cuatro hospitales en New York, Alemania, Japón, y Carolina del Norte. Observaron que los patrones de disbiosis de la microbiota durante el alo-TPH fueron similares en los pacientes de los cuatro hospitales y que ésta se caracterizaba por la pérdida de diversidad y el dominio de taxones únicos. Los análisis identificaron una asociación entre una menor diversidad intestinal y mayores riesgos de muerte relacionada con el trasplante y muerte atribuible a EICH. Para el estudio de la microbiota emplearon muestras de heces recogidas antes del acondicionamiento para el trasplante y a distintos tiempos hasta los 25-30 días postrasplante.

Además, se ha observado que la microbiota intestinal juega un papel importante en la EICH en receptores de alo-TPH. Biagi E et al. (67) concluyeron que los pacientes que desarrollaban EICH tenían, antes del alo-TPH, una microbiota con disbiosis con una diversidad reducida, un menor contenido de *Blautia*, y aumento en abundancia de *Fusobacterium*, lo que implica que la composición de la microbiota antes del alo-TPH puede predecir la aparición de EICH.

Otros autores también han descrito que la composición de la microbiota alrededor del tiempo de recuperación de neutrófilos post-TPH puede ser un predictor útil para el desarrollo posterior de EICH grave y parece existir una correlación entre la composición de la microbiota y la tasa de recaída de la enfermedad a los dos años (68, 69). Específicamente, se observó que el riesgo de recaída era menor cuando la microbiota de los pacientes era rica en *Eubacterium limosum* (riesgo de recaída del 19,8%), en comparación con los pacientes cuya microbiota no contenía esta bacteria (tasa de recidiva del 33,8%) (69). El género *Blautia* (especies de *Clostridial*) se ha asociado con una menor mortalidad relacionada con EICH (70). Además, los metabolitos derivados de la microbiota parecen ser factores cruciales en la homeostasis del alo-TPH (71, 72).

Varios estudios han evaluado el impacto del tiempo de tratamiento antibiótico en la composición de la microbiota intestinal, así como en la gravedad de la EICH, en la mortalidad y la supervivencia global relacionada con el TPH (61, 73, 74). En un análisis retrospectivo de 621 pacientes sometidos a TPH en dos centros, en Alemania y EE.UU., con diferente tipo de profilaxis antibiótica: ciprofloxacino y metronidazol oral en el centro de Alemania, y ciprofloxacino intravenoso en el centro de EE.UU. (a los pacientes que recibieron regímenes mieloablativos se les añadió vancomicina intravenosa), el tratamiento antibiótico pretrasplante se asoció con una mayor mortalidad en comparación con el tratamiento post-TPH (73). También se ha observado como importantes especies microbianas anaerobias comensales se pierden durante el TPH después del tratamiento antibiótico (74). Además, se han encontrado evidencias de que el uso de ciertos antibióticos de amplio espectro exacerbaba la EICH mediante la alteración de la microbiota intestinal y la degradación de la mucosa del colon, asociándose con una mayor mortalidad relacionada con la EICH (61). Relacionado con esto, Shono Y et al. (61), han descrito en modelos murinos la implicación de la expansión de *Akkermansia muciniphila* en la gravedad de la EICH tras el uso de ciertos antibióticos pudiendo agravar la inflamación intestinal. *A. muciniphila* es un conocido comensal de la microbiota intestinal humana que usualmente se asocia con efectos beneficiosos relacionados con la integridad epitelial intestinal, pero cuyo papel puede cambiar en función del contexto específico, como el uso de antibióticos o la dieta (61, 75).

Con el objetivo de mejorar el pronóstico de los pacientes sometidos a un alo-TPH, diversos estudios, recogidos en una revisión del 2021, han valorado el uso de distintas técnicas, desde intervenciones en la dieta hasta la transferencia de microbiota fecal, como mecanismo para lograr mantener o recuperar una microbiota sana (76).

Varias revisiones ponen de manifiesto el papel del microbioma como factor de protección o resistencia frente a la colonización por microorganismos patógenos (77, 78). Este efecto puede ser mediante mecanismos directos o indirectos. Los mecanismos directos hacen referencia a la competencia por recursos, como hierro y carbono, la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, la secreción de sistemas tipo VI, la generación de ácidos grasos de cadena corta, la modificación del pH intestinal, la producción de metabolitos de triptófano y la modulación de la concentración de oxígeno.

Además, la microbiota intestinal también protege indirectamente al estimular la inmunidad innata del huésped y fortalecer la barrera epitelial intestinal.

La disbiosis que se produce durante el alo-TPH puede conllevar una mayor susceptibilidad a la colonización por microorganismos MR y a posibles episodios de infección por estos. Un estudio reciente valoró el efecto que el uso o no de la transferencia de microbiota fecal tiene en la evolución de pacientes receptores de un alo-TPH colonizados por microorganismos MR (79). Si bien no se logró la descolonización de los pacientes, se observó una mejor evolución del trasplante y una mayor supervivencia en aquellos que habían recibido un trasplante de microbiota fecal.

Por el contrario, en una revisión sistemática publicada en 2019 que evaluó la eficacia de la transferencia de microbiota fecal para erradicar la colonización por microorganismos MR y prevenir infecciones recurrentes por estos, se observó una tasa de erradicación entre el 37,5% y el 87,5% (80). Sin embargo, los estudios variaron en diseño, incluyendo un ensayo clínico aleatorizado, ensayos clínicos no controlados, estudios de cohorte retrospectivos y series de casos. Siendo necesario la realización de ensayos controlados aleatorizados para establecer datos de seguridad y eficacia más sólidos.

De lo expuesto anteriormente se desprende que es esencial conocer las resistencias locales y el estado de colonización de los pacientes para optimizar el tratamiento inicial. La microbiota intestinal, que tiene un papel protector frente a patógenos, se ve alterada durante el alo-TPH, lo que justifica estudios a más largo plazo para evaluar su recuperación y el impacto en la colonización por EMR, infecciones y EICH.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Hipótesis 1:

La caracterización de la microbiota intestinal antes del TPH y a lo largo del seguimiento hasta los 180 días, y la detección de la colonización por EMR permitirán un mayor conocimiento de su implicación en el desarrollo de infecciones y en la evolución de los pacientes, así como el diseño de nuevos abordajes terapéuticos (diseño de estrategias de profilaxis, tratamientos antimicrobianos empíricos óptimos, trasplante fecal, descontaminación intestinal).

Hipótesis 2:

La reconstitución de la composición de la microbiota intestinal tras finalizar el periodo de inmunosupresión (normalmente al sexto mes post-TPH) es un factor protector contra el desarrollo de infecciones sistémicas y de EICH.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar en pacientes receptores de un alo-TPH la composición, modificación y relevancia clínica de la microbiota intestinal, así como la epidemiología y relevancia clínica de la colonización intestinal por EMR en el desarrollo de infecciones sistémicas y de EICH, y en la mortalidad no relacionada con la recidiva de la neoplasia hematológica durante el primer año postrasplante.

Objetivos específicos:

1. Estimar la incidencia de colonización intestinal por EMR y conocer la composición de la microbiota intestinal previa al trasplante y hasta el año postrasplante.
2. Caracterizar microbiológicamente la composición de la microbiota intestinal y las cepas de EMR aisladas en los pacientes.
3. Estudiar la relación entre la composición de la microbiota y la colonización intestinal por EMR.
4. Determinar la incidencia de infecciones y de EICH y si existe relación entre éstas y la composición de la microbiota o la colonización intestinal por EMR.
5. Estudiar el impacto de las diferentes profilaxis antibiótica recibidas, en cada uno de los centros participantes, en la composición y diversidad de la microbiota intestinal y su relación con las infecciones.
6. Establecer la supervivencia global y la no relacionada con la recidiva de la neoplasia hematológica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO, ÁMBITO Y SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN

3.1.1. Diseño del estudio

Estudio multicéntrico de cohortes prospectivo en pacientes sometidos a un alo-TPH.

3.1.2. Periodo del estudio

Cuatro años, entre el 12 de mayo de 2017 y el 11 de diciembre de 2020.

3.1.3. Ámbito del estudio

El estudio para evaluar el impacto de la colonización intestinal por EMR se realizó en 5 centros de tercer nivel del territorio nacional: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), Santander, como centro coordinador; Hospital Universitario Reina Sofía (HURS), Córdoba; Hospital Universitario de Salamanca (HUSAL), Salamanca; Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo; y Hospital Universitario 12 de Octubre (HU12O), Madrid.

En el subestudio de la microbiota intestinal participaron 3 de los 5 centros: HUMV, HUCA y HUSAL. Contando los dos primeros centros, HUMV y HUCA, con un seguimiento al año de muestras de microbiota de dichos pacientes.

3.1.4. Selección de la población de estudio

Se incluyeron todos los pacientes que ingresaron en los centros participantes para la realización de un alo-TPH que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión:

Criterios de inclusión

1. Pacientes que ingresan para realizar un alo-TPH durante el periodo de estudio en los centros participantes.
2. Edad mayor o igual a 18 años.
3. Firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Presencia de uno o más de los siguientes criterios.

1. Ausencia de consentimiento escrito previa a la inclusión en el estudio.
2. Edad menor de 18 años.

En caso de producirse un retrasplante durante el seguimiento del estudio, se permitió la inclusión de ese mismo paciente como un caso nuevo, siempre y cuando cumpliese todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

3.1.5. Protocolos clínicos de cada centro participante

Según la práctica clínica habitual, cada centro participante empleó su propio protocolo de profilaxis antibiótica. El HUMV y HU12O no emplearon profilaxis antibiótica, el HUCA y el HUSAL utilizaron quinolonas, concretamente ciprofloxacino y levofloxacino, respectivamente, durante el periodo de neutropenia; y el HURS empleó ceftriaxona como profilaxis antibacteriana en neutropenia severa.

Los pacientes en los que se detectó colonización por EMR se abordaron según el protocolo clínico de cada hospital. En todos los centros se tomaron medidas de aislamiento y no se les administró ningún tratamiento antibiótico siempre y cuando no presentasen clínica asociada. En caso de fiebre neutropénica, el aislamiento de algún microorganismo en el frotis rectal fue tenido en cuenta para la pauta del tratamiento empírico.

En el estudio de la microbiota intestinal, con relación a la dieta, no se realizaron restricciones dietéticas. Aunque en el HUCA se recomendó seguir una dieta de baja carga bacteriana restringiendo el consumo de carnes y pescados crudos, quesos no pasteurizados o embutidos.

3.2. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

Según información de Bilinski J et al. (81) asumimos que la prevalencia de colonización por EMR en pacientes con alo-TPH es del 30%, por lo que la razón expuestos/no expuestos es de 0,5. Desde un abordaje conservador, y según información del estudio

previo, se pretende poder detectar unas diferencias de incidencia de infecciones por enterobacterias MR de un 20% entre los pacientes con y sin colonización (riesgo en no colonizados de infección por EMR de 10%; riesgo relativo [RR]=3), con un alfa de 0,05 (dos colas) y un beta de 0,2. Usando la aproximación normal corregida, el tamaño muestral necesario es de 168 pacientes. Considerando que los pacientes no evaluables o perdidos podrían suponer un 10% adicional, se estableció un tamaño muestral de 185 pacientes.

En relación a la microbiota intestinal, no existe una metodología estandarizada para la elaboración de estudios sobre microbiota, encontrándose una alta heterogeneidad de población reclutada y tiempos de seguimiento en la bibliografía. Estos factores dificultan el obtener un cálculo exacto del tamaño muestral necesario para realizar un estudio de microbiota. En este caso, el tamaño muestral fue calculado basándonos en trabajos previos en este campo en el que se definió un tamaño muestral para detectar como estadísticamente significativas diferencias en la prevalencia de especies bacterianas en la microbiota de un 30%, es decir, detectándose pérdidas de diversidad en las que existe dominancia de un taxón único representando éste un 30% de la diversidad de la muestra; con un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral. Por lo que se consideró necesario reclutar al menos 76 pacientes.

3.3. SEGUIMIENTO

El seguimiento se llevó a cabo desde el momento de ingreso de los pacientes para la realización del alo-TPH hasta el año postrasplante o hasta el exitus (si se produjo dentro de ese periodo).

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les recogió una muestra de frotis rectal en el momento pretrasplante y durante el postrasplante a distintos tiempos: semanalmente durante el primer mes (días +7, +14, +21, +30), quincenalmente hasta el día +100 (días +45, +60, +75, +90, +100), mensualmente hasta los 6 meses postrasplante (días +120, +150, +180) y las muestras de seguimiento tras el periodo de inmunosupresión: a los 9 meses y al año postrasplante.

A los pacientes que participaron en el subestudio de microbiota intestinal, además del frotis rectal, se les recogió una muestra de heces en el momento pretrasplante y durante

el postrasplante a distintos tiempos: a los 14, 30, 60 y 100 días postrasplante, y las muestras de seguimiento tras el periodo de inmunosupresión, a los 9 meses y al año del alo-TPH.

3.4. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

En cada visita, además de las muestras biológicas, se registró la información correspondiente a las variables clínicas sobre la evolución de los pacientes. Esta información incluyó todos los datos epidemiológicos y clínicos que pudieran afectar al pronóstico clínico, la evolución clínica del trasplante, la aparición de infecciones durante el seguimiento y la composición de la microbiota intestinal: edad del paciente, sexo, comorbilidades previas, el HCT-CI index (tabla 2), el EBMT risk score (tabla 3), el DRI index (tabla 4), hábitos tóxicos, procedimientos invasivos recientes, ingresos previos en los últimos 6 meses, tratamientos antibióticos previos, episodios de infección en los 3 meses previos al trasplante; datos del trasplante, tipo de trasplante, tipo de acondicionamiento, profilaxis de EICH recibida, profilaxis antimicrobiana; durante el seguimiento se tuvo en cuenta la aparición de fiebre, episodios de toxicidad (con especial relevancia a la toxicidad digestiva como mucositis y/o diarrea), desarrollo de EICH agudo y crónico, necesidad de procedimientos invasivos postrasplante, ingreso en unidad de cuidado intensivos, reingresos tras el alta hospitalaria por el alo-TPH, recidiva de la enfermedad hematológica y muerte del paciente. Además, se recogió la información relativa a cualquier episodio de infección por EMR, correlacionando estos datos con los resultados del estudio de la colonización intestinal por EMR.

Para la definición de las causas primarias y secundarias de mortalidad se empleó la clasificación jerárquica descrita por Copelan E et al. (82) y Hahn T et al. (83) utilizadas en el trasplante hematológico.

Para la recogida de las variables clínicas del estudio en los distintos centros se diseñó un cuaderno de recogida de datos en formato formulario en el programa Word de Microsoft Office. Posteriormente, los datos fueron unificados por el centro coordinador en una base de datos diseñada para tal fin en el programa Access de Microsoft Office. La información fue recogida mediante la revisión de la historia clínica de los pacientes, siguiendo las

definiciones y criterios previamente acordados y que no se modificaron a lo largo del estudio.

3.5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

3.5.1. Muestras de colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes

3.5.1.1. *Recogida, conservación y transporte de frotis rectales*

Para la toma del frotis rectal se utilizó una torunda con medio de transporte tipo Amies-Stuart® que se introdujo a través del esfínter anal unos 2 cm y se rotó contra las criptas rectales, manteniéndose durante 10 segundos antes de extraer el hisopo. Para que la muestra fuese considerada válida, debía haber constancia en la torunda de material fecal, no siendo aceptable en ningún caso una torunda limpia. La muestra de heces se consideró igualmente válida que el frotis rectal. En el caso de que fuese necesario la administración de un enema al paciente, la muestra siempre que fuera posible debía tomarse previamente. El tiempo transcurrido desde su recogida hasta su entrega en el laboratorio de Microbiología local fue inferior a 2 horas, habiéndose mantenido en la nevera a 4°C de no ser posible su envío en ese plazo.

Los escobillones se sembraron en dos tipos de placas cromogénicas comerciales diseñadas para aislar EMR a cefalosporinas de amplio espectro y a carbapenémicos, y en una placa de agar no selectivo (ej. Agar McConkey) para comprobar, por una parte, la correcta toma de la muestra y, por otra, para poder identificar aquellas enterobacterias productoras de AmpC que no crecerían en las placas selectivas. Los microorganismos recuperados se identificaron a nivel de especie en cada centro participante, donde se realizó un antibiograma preliminar. Las cepas se mantuvieron congeladas al menos a -20°C en caldo soja-tripticasa con glicerol o similar hasta su envío al HUMV para su completa caracterización.

Si durante el seguimiento del paciente en el estudio se detectó algún episodio de infección por una EMR, se procedió a la identificación de la cepa a nivel de especie y a la realización del antibiograma habitual en cada centro. Posteriormente, la cepa se conservó

en las condiciones previamente descritas hasta su envío al HUMV para estudios microbiológicos.

3.5.1.2. Análisis microbiológicos de las cepas

Tanto para las cepas que causan colonización como infección se realizó un antibiograma de referencia mediante microdilución para el estudio de la sensibilidad a beta-lactámicos: amoxicilina, aztreonam, piperacilina, cefalosporinas de amplio espectro (cefoxitina, cefotaxima, cefepime y ceftazidima) y carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem); quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino); aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, arbekacina); trimetropim-sulfametoxazol, fosfomicina, tigeciclina y colistina. Se hizo el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI50 y CMI90). Según su perfil de resistencia en el antibiograma, las cepas se clasificaron en tres categorías: multirresistentes, multirresistentes difíciles de tratar y extremadamente resistentes (84–86).

Se estudió la inducibilidad/hiperproducción de AmpC, la producción de BLEEs (mediante prueba de sinergia de cefalosporinas de amplio espectro con ácido clavulánico), y la posible presencia de carbapenemasas (por reacción en cadena de la polimerasa [PCR]).

Además, se llevó a cabo la caracterización molecular (mediante PCR simple o multiplex) de los mecanismos de resistencia en las cepas que presentaron un fenotipo sugestivo de los mismos: BLEEs, cefamicinasas plasmídicas y carbapenemasas; genes *qnr* (resistencia a quinolonas mediada por plásmidos); genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y genes codificadores de AmpC plasmídica (tablas 6-11).

Se comprobó la relación clonal de los aislamientos de la misma especie procedentes de cada paciente mediante PCR de repeticiones palindrómicas extragénicas (“*repetitive extragenic palindromic PCR*”, rep-PCR). Esta técnica es un método rápido y sencillo para caracterizar microorganismos y estudiar su relación clonal (limitado a bacilos gramnegativos). Consiste en la amplificación de fragmentos de ADN entre secuencias repetidas mediante PCR y su separación por electroforesis, generando un patrón único para cada cepa basado en el polimorfismo de estas regiones (87). Los “*primers*” empleados fueron: REP-1: 5'-III-GCG CCG ICA TCA GGC-3' y REP-2: 5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC-3'.

Tabla 6. “Primers” y protocolo de PCR de genes relacionados con la producción de BLEEs: CTX-M, TEM y SHV. Fuente: Pagani L et al., 2003 (88) y Rasheed JK et al., 1997 (89).

Gen	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Ciclos	Desnaturalización Inicial	Desnat.	Hibridación	Extensión	Ext. final
<i>blaCTXM</i>	CTXMU-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593	35	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 7min
	CTXMU-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA							
<i>blaTEM</i>	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	867	30	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 7min
	TEM-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA							
<i>blaSHV</i>	SHV-F	GGGTTATTCTTATTGTCGC	930	30	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 7min
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC							

Tabla 7. “Primers” y protocolo de PCR de los genes blaCTXM del grupo 1 y grupo 9. Fuente: Ruiz del Castillo et al., 2013 (90).

Gen blaCTXM	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Ciclos	Desnaturalización Inicial	Desnat.	Hibridación	Extensión	Ext. final
GRUPO1	CTXM1-F	ATGGTTAAAAAAATCACTG	912	30	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 7min
	CTXM1-R	TTACAAACCGTYGGTGAC							
GRUPO9	CTXM9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	873	30	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 7min
	CTXM9-R	TTACAGCCCYTYGGCGAT							

Tabla 8. “Primers” y protocolo de PCR de los genes que codifican para carbapenemasas (CBPs). Fuente: Galani I et al., 2005 (91), Miró E et al., 2013 (92), Oteo J et al., 2013 (93), Yigit H et al., 2001 (94), Österblad M et al., 2012 (95) y Poirel L et al., 2011 (96).

Gen CBP	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Ciclos	Desnaturalización inicial	Desnat.	Hibridación	Extensión	Ext. final
blaVIM-like	<i>blaVIM-like-F</i>	ATGGTGTGTTGGTCGCATATC	510	30	94°C 3min	94°C 30s	60°C 30s	72°C 40s	72°C 2min
	<i>blaVIM-like-R</i>	TGGGCCATTCAAGCCAGATC							
blaIMP-like	<i>blaIMP-like-F</i>	GAAGGCGTTATGTTCATAC	586	30	94°C 3min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 2min
	<i>blaIMP-like-R</i>	GTAAGTTCAAGAGTGATGC							
blaNDM-like	<i>blaNDM-like-F</i>	CCATGCGGGCCGTATGAGTGATTG	700	30	94°C 3min	94°C 30s	60°C 30s	72°C 40s	72°C 2min
	<i>blaNDM-like-R</i>	TCGCGAAGCTGAGCACCGCATTAG							
blaOXA-48 like	<i>blaOXA-48 like-F</i>	TGCGTGTATTAGCCTTATCG	784	30	94°C 3min	94°C 30s	60°C 30s	72°C 40s	72°C 2min
	<i>blaOXA-48 like-R</i>	TTTTCCCTGTTGAGCACTTC							
blaKPC-like	<i>blaKPC-like-F</i>	TGTCACTGTATGCCGTC	882	30	94°C 3min	94°C 30s	60°C 30s	72°C 40s	72°C 2min
	<i>blaKPC-like-R</i>	TTACTGCCGTTGACGCC							
GES	GES-F	CTATTGTCCTGCTCAGG	801	35	94°C 3min	94°C 15s	60°C 15s	72°C 2min	72°C 2min
	GES-R	ATGCGCTTCATTACACGCAC							

Tabla 9. “Primers” y protocolo de PCR de los genes QNR, responsables de la resistencia a quinolonas. Fuente: Cattoir V et al., 2007 (97), Cano M et al., 2009 (98), Kraychete G et al., 2016 (99) y Rodríguez-Martínez J et al., 2016 (100).

Gen	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Ciclos	Desnaturalización	Desnat. inicial	Hibridación	Extensión	Ext. final
qnrA	qnrA-F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	579	25	94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	qnrA-R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC							
qnrB	qnrB-F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG*	263		94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	qnrB-R	TTYGCBGYYCGCCAGTCGAA							
qnrS	qnrS-F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	427		94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	qnrS-R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG							
qepA	qepA-F	AAC TGC TTG AGC CCG TAG AT	189		94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	qepA-R	CGT GTT GCT GGA GTT CTT CC							
qnrC	qnrC-F	GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC G	308	25	94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	qnrC-R	CAC CTA CCC ATT TAT TTT CA							
qnrD	qnrD-F	AGG TGT AGC ATG TAT GGA AAA GC	691	25	94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	qnrD-R	ACA TTG GGG CAT TAG GCG TT							
oqxAB	oqxAB-F	GAC GAC AAA GCG GTA CTG AC	448	25	94°C 1 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	oqxAB-R	GTC TCG GCA ATC ACT TTC GG							

*M=A or C; H=A or C or T; Y=C or T; K=T or G; R=A or G

Tabla 10. “Primers” y protocolo de PCR de los genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs). Fuente: Miró E et al., 2013 (92), Park C et al., 2006 (101) y Fernández-Martínez M et al., 2015 (102).

Gen AMEs	Resistencia	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ext. final
AAC(6')-Ib/cr	Ak, K, Nt, To	AAC6'-Ib-cr-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	30	94°C / 0,30	60°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		AAC6'-Ib-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGT						
AAC(3)-IIa	Gm, Nt, To	AAC3-IIa-F	GGCAATAACGGAGGCGCTTC	563	30	94°C / 0,30	55°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		AAC3-IIa-R	TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG						
ANT(2")-Ia	Gm, K, To	ANT2"-Ia-F	CGTCATGGAGGAGTTGGACT	303	30	94°C / 0,30	55°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		ANT2"-Ia-R	CGCAAGACCTAACCTTTTC						
AAC(3)-Ia	Gm	AAC3-Ia-F	GCAGTCGCCCTAAACAAA	464	30	94°C / 0,30	55°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		AAC3-Ia-R	CACTTCTTCCGTATGCCAACTT						
APH(3')-Ia	K, Nm	APH3'-Ia-F	CGAGCATCAAATGAAACTGC	624	30	94°C / 0,30	55°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		APH3'-Ia-R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG						
APH(3')-IIa	K, Nm	APH3'-IIa-F	GAACAAGATGGATTGCACGC	680	30	94°C / 0,30	55°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		APH3'-IIa-R	GCTCTCAGCAATATCACGG						
APH(3')-VIa	Ak, K, Nm	APH3'-VIa-F	AAAGCGATCAATGCAAAACC	310	30	94°C / 0,30	55°C / 0,30	72°C 1'	72°C 7'
		APH3'-VIa-R	TATCCGTGATATGCCATGA						

Ak, amikacina; Gm, gentamicina; K, kanamicina; Nm, neomicina; Nt, netilmicina; To, tobramicina.

Tabla 11. “Primers” y protocolo de PCR de los genes que codifican para AmpC plasmídicas. Fuente: Pérez-Pérez F et al., 2002 (103).

Gen	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Ciclos	Desnaturalización	Desnat. inicial	Hibridación	Extensión	Ext. final
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	MOXM-F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	25	94°C 2 min	94°C 30s	64°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	MOXM-R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC							
LAT-1, CMY-2 a CMY-7	CITM-F	TGGCCAGAACTGACAGGAAA	462	25	94°C 2 min	94°C 30s	64°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	CITM-R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC							
DHA-1, DHA-2	DHAM-F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGT	405	25	94°C 2 min	94°C 30s	64°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	DHAM-R	CCGTACGCATACTGGCTTGC							
ACC	ACCM-F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	25	94°C 2 min	94°C 30s	64°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	ACCM-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC							
MIR-1T ACT-1	EBCM-F	TCGGTAAAGCCATGTTGCGG	302	25	94°C 2 min	94°C 30s	64°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	EBCM-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT							
FOX-1 a FOX-5b	FOXM-F	AACATGGGTATCAGGGAGATG	190	25	94°C 2 min	94°C 30s	64°C 30s	72°C 30s	72°C 2min
	FOXM-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG							

En aquellos casos en los que se demostró relación clonal entre cepas obtenidas en las muestras de colonización y muestras clínicas de un episodio de infección, se seleccionaron las cepas para un futuro estudio adicional de secuenciación de genoma completo. Además, también se seleccionó una cepa de colonización por cada paciente para su secuenciación.

El ADN de las cepas seleccionadas se extrajo con el kit comercial por centrifugación en columna NucleoSpin® Microbial DNA Kit Ref. 740235.250 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN fueron comprobados usando el espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific) y el fluorímetro Qubit® (SigmaAldrich). Los aislados con concentraciones superiores a 20 ng/μl y rangos A260/A280 ~1,8 a 2,0 y A260/A230 ~2,0 a 2,2 se seleccionarán para llevar a cabo la preparación de librerías de secuenciación. Para ello se empleará el kit Rapid Barcoding Kit RBK114-24 (Oxford Nanopore Technologies, LTD. UK), que permite multiplexar hasta 24 muestras por carrera de secuenciación.

Para la secuenciación de genoma completo de los aislados se utilizará el dispositivo MinION MK1B, con FlowCells r10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies), empleando su software propietario MinKnow v.25.05.14 para la gestión de la carrera de secuenciación y el software dorado v.1.1.1 para realizar, en tiempo real, la llamada de bases (“basecalling”) en modo sup (calidad máxima) con el modelo dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup@v5.0.0. Las carreras se llevarán a cabo hasta que uno de los siguientes sea cierto: 1) que todas las muestras hayan producido al menos 180 MB de datos crudos en formato FASTQ comprimido en gzip (suficiente para una profundidad media de secuenciación de 30x para un genoma bacteriano promedio de 5 Mbp), 2) que todas los poros de secuenciación en la FlowCell se hayan agotado, 3) que se hayan cumplido las 48 horas desde que se inició la carrera.

3.5.2. Muestras de microbiota intestinal

3.5.2.1. Recogida, conservación y transporte de muestras de heces

Siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica recogidas en el documento Nº 59 “Microbiota” de los

Procedimientos en Microbiología Clínica (104) se emplearon muestras de heces, que es el tipo de muestra más frecuente para el estudio de la microbiota intestinal.

Las muestras fueron recogidas en contenedores estériles de boca ancha del modo más aséptico posible y entregadas al laboratorio de Microbiología de cada hospital. El tiempo transcurrido desde su recogida hasta su entrega en el laboratorio fue inferior a 2 horas, habiéndose mantenido en la nevera a 4°C de no ser posible su envío en ese plazo.

Para facilitar la recogida de las muestras de seguimiento una vez el paciente no se encontraba hospitalizado, se les hizo entrega de un kit con todo el material necesario para la correcta manipulación de la muestra al alta hospitalaria: instrucciones para la recogida, bote estéril, espátula estéril, guantes y bolsa de plástico hermética para el almacenamiento de la muestra en el congelador (Anexo V). Las muestras fueron congeladas a -20°C en los 15 minutos siguientes a la defecación, pudiendo conservarse de esta forma hasta 3 días. El día de la consulta médica, el paciente entregaba las muestras al personal sanitario que lo hacía llegar al laboratorio de Microbiología para su correcta conservación a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Este tipo de muestras pueden sufrir hasta 4 ciclos de congelación-descongelación sin que la microbiota sufra cambios importantes.

3.5.2.2. Selección de las muestras

Para el análisis de datos y procesamiento de las muestras, se seleccionaron aquellos pacientes en los que se hubiera recogido un mínimo de una muestra pretrasplante y dos muestras durante el seguimiento postrasplante. Los pacientes fallecidos durante los 30 primeros días tras el trasplante fueron excluidos, a excepción de aquellos que tuvieran al menos una muestra postrasplante disponible.

3.5.2.3. Extracción de ácidos nucleicos

Las muestras de heces fueron descongeladas de manera gradual durante 24 horas a 4°C para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos más sensibles a los cambios de temperatura.

Para la extracción del ADN a partir de las heces se empleó el sistema comercial QIAamp PowerFecal DNA Kit Cat No./ID: 12830-50 (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se midió con un fluorímetro

Qubit® (Invitrogen) y se almacenó a -20°C hasta la preparación de la librería de secuenciación.

3.5.2.4. Preparación de la librería y secuenciación

Para evaluar la diversidad de la microbiota, se llevó a cabo la amplificación de la región variable V3-V4 del gen que codifica la subunidad pequeña del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) bacteriano 16S (figura 11) mediante PCR, utilizando “primers” específicos para tal efecto (105).

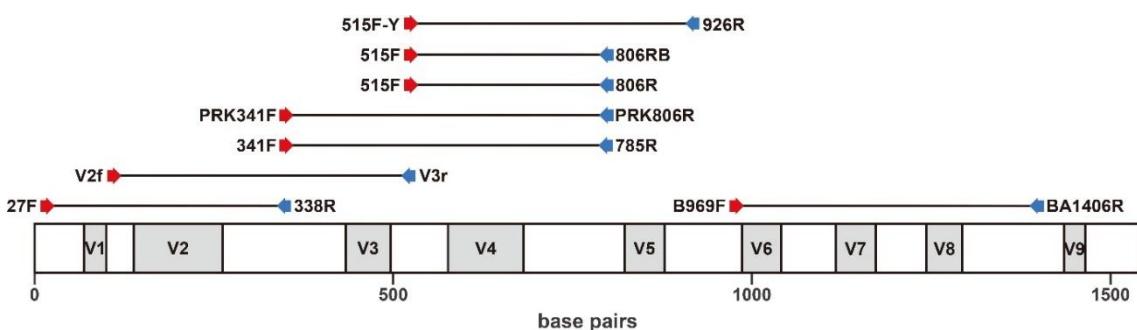


Figura 11. Esquema del gen que codifica para el ARNr 16S y la posición relativa que abarcan distintos “primers” en relación a las regiones variables (V, marcadas en gris). Fuente: Lee H et al., 2023 (106).

En blanco se encuentran las regiones conservadas del gen. Para este experimento se seleccionaron los “primers” 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y 785R: GACTACHVGGGTATCTAATCC que cubren la región V3-V4 (105).

Las librerías se construyeron siguiendo el protocolo “*16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*” (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). Una vez normalizadas y ajustadas las concentraciones a 4nM, de forma que se encuentren en una concentración equimolar en un único “pool”, se desnaturizaron con NaOH 0,2 N, y se combinaron con PhiX (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) como control.

Las muestras se secuenciaron con tecnología de síntesis paralela en una plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.), utilizando un kit V3 de ciclo 2 × 300 (paired-end) (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.), siguiendo los protocolos de secuenciación de Illumina.

3.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Una vez obtenidas las secuencias, lecturas o “*reads*”, tras la secuenciación, se llevó a cabo su análisis de calidad, filtrado, eliminación de secuencias químéricas productos de errores en la secuenciación, obtención de variantes de secuencia de amplicón (“*Amplicon Variant Sequence*”, ASVs) mediante la agrupación o “*clustering*” de secuencias idénticas que permiten resolver diferencias a nivel de un solo nucleótido, asignación taxonómica usando bases de referencia, análisis de diversidad alfa (diversidad inherente a una misma muestra, intra-muestra) y diversidad beta (diferencias en la diversidad entre muestras), construcción de árbol filogenético y representación gráfica de la composición en ASVs. Todos estos análisis se encuentran detallados en los siguientes subapartados.

Para ello, se siguió el flujo de trabajo basado en el *pipeline* QIIME2 (figura 12) dentro de la plataforma web Galaxy. QIIME2 (“*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*”) (107) es un *pipeline* bioinformático basado en Python para llevar a cabo análisis de la microbiota a partir de datos crudos de secuenciación de muestras de ADN. Tradicionalmente, se empleaba como plataforma de análisis de datos de genes marcadores, normalmente 16S o la región espaciadora interna transcrita (“*Internal Transcribed Spacer*”, ITS) de hongos, pero en la actualidad, se trata de un software con muchas dependencias de otros programas que permite un análisis multiómico de muestras de microbiota. Se puede ejecutar directamente desde la línea de comandos y cuenta con variedad de aplicaciones desarrolladas por la comunidad de usuarios para la realización de diferentes análisis de microbiota.

Galaxy (108) es una plataforma abierta basada en la web para el flujo de trabajo científico. Inicialmente desarrollado para investigación genómica, actualmente se utiliza como un sistema general de gestión de flujo de trabajo de bioinformática. Cuenta con una amplia gama de herramientas bioinformáticas que permiten procesar, analizar y visualizar datos de la microbiota en general.

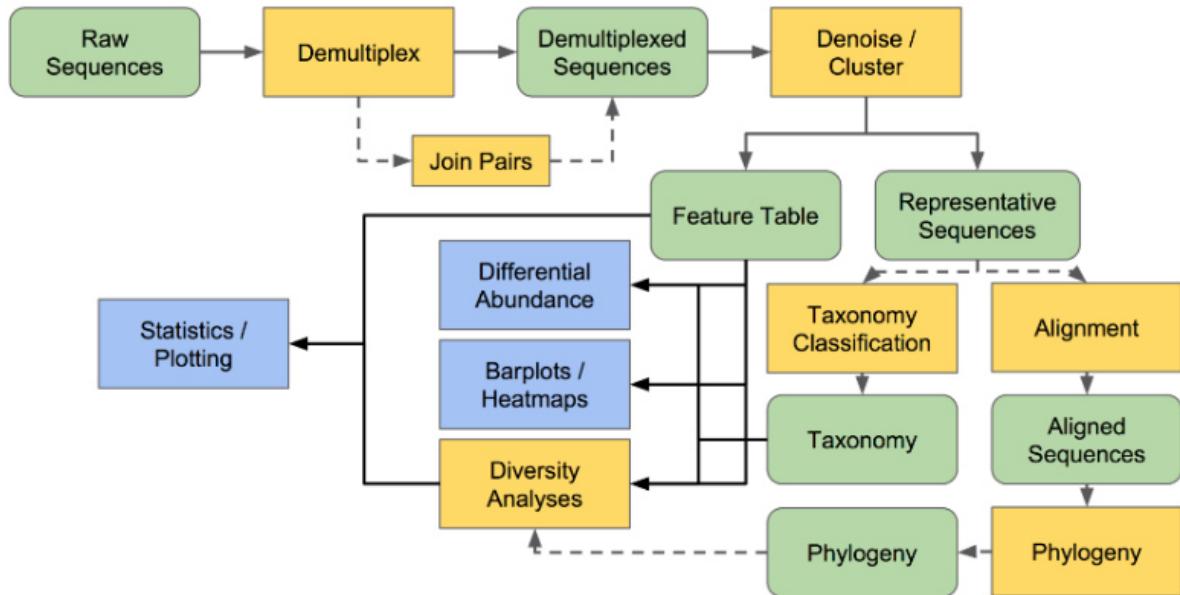


Figura 12. Esquema del flujo de trabajo empleado en el pipeline QIIME2. Fuente: QIIME 2 development team, 2016 (109).

3.6.1. Análisis primario. Calidad, filtrado y preprocesado de las secuencias

En un primer paso, se comprobó la calidad y características de los archivos fastq crudos (“raw reads”) obtenidos de la secuenciación mediante las herramientas FastQC (110) y MultiQC (111), que proporciona una evaluación de la calidad global al generar un informe resumen de todos los informes de calidad existentes.

A continuación, se llevó a cabo un preprocesamiento inicial de las secuencias mediante el filtrado de las regiones de baja calidad de los “raw reads” y la eliminación de adaptadores con la herramienta FastP (versión 0.23.2) (112). Los parámetros de calidad establecidos para ello fueron:

1. Longitud mínima de las lecturas de 225 pb.
2. “*Phred-score*” promedio de 30 en la ventana de análisis.
3. La ventana de análisis va del extremo 3’ a 5’.
4. “*Phred-score*” por base ≥ 25 .
5. Un máximo de 4 bases no asignadas (N) por lectura.

6. El tamaño de ventana se establece en 3 bases.

Se revisó la calidad de los archivos obtenidos tras el filtrado con las herramientas FastQC y MultiQC.

Todas las muestras que, por sus características o número de lecturas, no superaron el análisis de calidad fueron descartadas y no se incluyeron en el análisis secundario. En el caso de que una de las muestras eliminadas se correspondiese con una muestra pretrasplante (muestra basal), todas las muestras de ese mismo paciente fueron también eliminadas del análisis.

3.6.2. “Denoising” y análisis secundario

Una vez realizado el preprocesamiento, las lecturas preprocesadas y los metadatos se importaron al formato propio de QIIME2 y se cargaron en la plataforma web Galaxy Bioinformatics. Se empleó el servidor público <https://cancer.usegalaxy.org/> para analizar los datos con la herramienta QIIME2 versión 2022.11.2.

A continuación, se llevó a cabo el “*denoising*” o eliminación de ruido de las lecturas, la eliminación de los “*primers*” (17pb en sentido “*forward*” y 21pb en sentido “*reverse*”), de las lecturas truncadas, y la fusión de los extremos emparejados a través de la herramienta DADA2 (113), que permite un filtrado de calidad de secuencias más estricto, favoreciendo la identificación posterior de ASVs. La eliminación de ruido o “*denoising*” elimina los posibles errores de secuenciación, como las secuencias químéricas o los “*singletones*”. Las lecturas fueron truncadas a una longitud de 250pb en el sentido “*forward*” y a 240pb en el sentido “*reverse*” debido a la disminución de las puntuaciones de calidad de las secuencias al final de estas.

Tras la eliminación de ruido, se llevó a cabo la asignación de las lecturas a ASVs, gracias al “*plugin feature-table*”, obteniéndose la tabla de características o “*feature table*”, que proporciona información de cuantas lecturas o secuencias se asocian con cada muestra y con cada característica. Se llevó a cabo un filtrado de aquellas ASVs que aparecían en menos de dos muestras y con una frecuencia total menor de 10, evitando así posibles sesgos introducidos por taxones raros o muy poco frecuentes.

La asignación taxonómica de cada característica o “*feature*” presente en las muestras se realizó mediante un clasificador *Naïve Bayes* pre entrenado con los “*primers*” utilizados

en nuestro experimento (figura 11) basado en la base de datos de referencia GreenGenes2 (114), en concreto *2022.10.backbone.full-length.fna.qza*, utilizando el “*plugin feature-classifier*” (115). Las lecturas no asignadas al reino bacteriano y las ASVs sin asignación de filo se eliminaron del análisis

Se construyó un árbol filogenético utilizando los “*plugins alignment*” (116) y “*phylogeny*” (117).

3.6.3. Análisis terciario: análisis estadístico de los datos

La tabla de ASVs, la asignación taxonómica, el árbol filogenético y los metadatos de las muestras se ensamblaron en un objeto phyloseq utilizando el paquete phyloseq versión 1.46.0 (118) en R. Phyloseq es un paquete de Bioconductor (“*Open Source Software For Bioinformatics*”) para la manipulación y análisis de datos metagenómicos una vez han sido procesados. Este paquete crea un objeto compuesto por diferentes elementos: el número de características observadas por muestra, los metadatos, la tabla de taxonomía y el árbol filogenético, obtenidos en este caso a través del procesamiento en QIIME2. Los subsiguientes análisis de diversidad, análisis de abundancia diferencial y visualizaciones se realizaron utilizando el paquete microbiome (versión 1.24.0) (119), el paquete vegan (versión 2.6-6.1) (120), el paquete microbiomeMarker (versión 1.8.0) (121), y el paquete ggplot2 (versión 3.5.1) (122), dentro del entorno estadístico R versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) (123).

Mediante la construcción de curvas de rarefacción (figura 13) se comprobó que todas las muestras estuvieran correctamente secuenciadas, alcanzándose una profundidad de secuenciación suficiente para captar toda la diversidad existente.

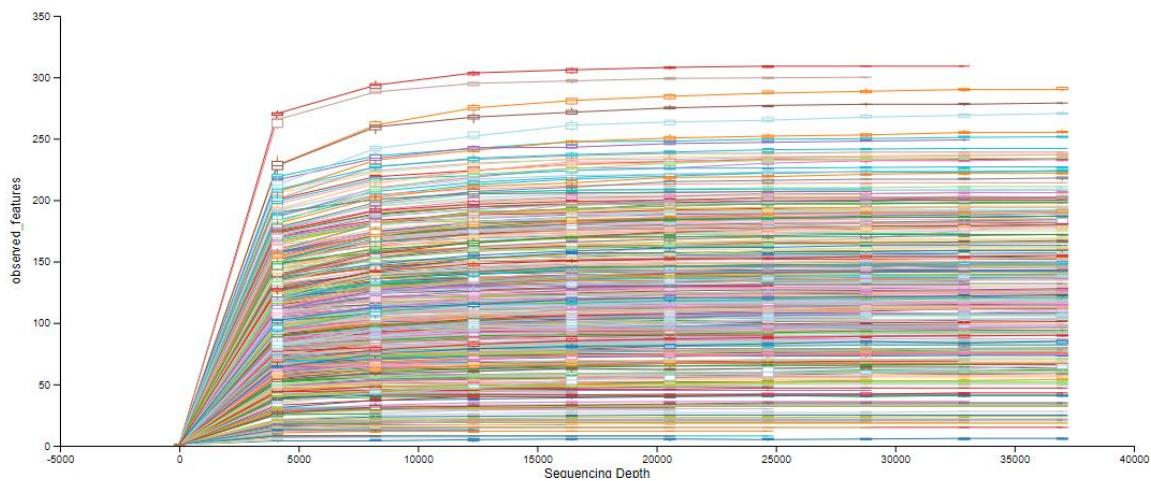


Figura 13. Curvas de rarefacción construidas en Galaxy con el plugin diversity alphararefaction. Fuente: elaboración propia.

Representación del número de taxones observados (*observed_features*, eje Y) en función de la profundidad de secuenciación (eje X) de cada una de las muestras de microbiota intestinal analizadas (cada línea).

Tras revisar los análisis de rarefacción, y para minimizar el sesgo por variaciones en la profundidad de secuenciación, todas las muestras se normalizaron a una profundidad de secuenciación común de 7.078 lecturas por muestra antes de realizar los análisis de diversidad. Además, se excluyeron del análisis las muestras de seguimiento de los pacientes cuya muestra basal no superó el filtro de normalización (se excluyeron 20 muestras).

Para analizar la dinámica temporal de la microbiota intestinal se generaron distintos subconjuntos de muestras:

- 1) Subconjunto longitudinal hasta día +100: se incluyeron las muestras pretrasplante, del día +14, +30, +60 y +100 días post-TPH.
- 2) Subconjunto basal: únicamente se incluyeron las muestras pretrasplante de los pacientes participantes, con el objetivo de examinar la composición inicial de la microbiota y su posible correlación con la evolución clínica posterior del trasplante.
- 3) Subconjunto neutropenia: se incluyeron las muestras recogidas desde el momento post-TPH inmediato hasta el día +18, centrándose específicamente en el periodo

de neutropenia. Se utilizó la mediana del número de días en los que los pacientes recuperaron 500 neutrófilos como punto de corte: 17,67 días.

- 4) Subconjunto longitudinal hasta el año postrasplante: se incluyeron las muestras de aquellos pacientes que participaron en el estudio NVAL21/18, a los que se les realizó una recogida de muestras hasta el año postrasplante.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de las variables recogidas en la base de datos se generó el archivo de metadatos de las muestras. El análisis estadístico de las variables clínicas fue realizado con el programa STATA SE 16 (124). El análisis y representación gráfica de los datos obtenidos de la microbiota se llevó a cabo con el programa R versión 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) (123).

3.7.1. Análisis de resultados clínicos y microbiológicos

Cada variable fue estudiada para evaluar su distribución paramétrica o no paramétrica con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron con la media y su desviación estándar (DE) o mediana y rango intercuartílico (RIQ); mientras que los resultados de las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y porcentajes. Para detectar las diferencias entre dos variables cuantitativas se utilizó la t de Student y la prueba de ANOVA, en el caso de que las variables siguieran una distribución paramétrica; y la prueba de Wilcoxon y Kruskal-Wallis, en el caso de distribuciones no paramétricas. Considerando una comparación múltiple con la corrección FDR en las variables con más de dos categorías. En el caso de variables cualitativas, se empleó la prueba chi cuadrado, y el test exacto de Fisher cuando los efectivos esperados fueron menor de 5. Se llevó a cabo un análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier y regresión de Cox. Las curvas de supervivencia fueron comparadas con la prueba de log-rank y el test de Breslow.

Se calcularon las odds ratio (OR) con sus intervalos de confianza (IC) al 95% para analizar la asociación mediante regresión logística ajustado por edad, sexo, fuente de progenitores hematopoyéticos, intensidad del acondicionamiento y HCT-CI score. Además, se realizó regresión lineal múltiple en el caso de las variables cuantitativas, cruda

y ajustada por edad, sexo, fuente de progenitores hematopoyéticos, intensidad del acondicionamiento y HCT-CI score.

Todos los valores p se consideraron bilaterales con un nivel de significación de 0,05.

3.7.2. Análisis de resultados de la microbiota intestinal

Se empleó el índice inverso de Simpson y el índice de Shannon para evaluar la riqueza y la uniformidad de la microbiota intestinal dentro de cada subconjunto de muestras. Para analizar los cambios en la abundancia relativa de los taxones y en la alfa diversidad se empleó un modelo lineal generalizado mixto (“*Generalized linear mixed model*”, GLMM), que permite incluir a los pacientes como efectos aleatorios, modelando así la naturaleza pareada de los datos y la correlación entre las muestras de un mismo paciente. Para evaluar la disimilitud en la composición entre las comunidades microbianas de los subconjuntos de muestras se empleó el índice de disimilitud de Bray-Curtis para cuantificar la distancia entre cada par de muestras. Para ello, se utilizaron las abundancias relativas a nivel de género y se filtró el conjunto de datos para los géneros presentes con una abundancia relativa media $> 0,001$. Se utilizó el análisis de coordenadas principales (“*Principal Coordinate Analysis*”, PCoA) para visualizar los patrones de diversidad beta en un espacio bidimensional, y la separación de los datos se evaluó mediante la prueba de permutación, con la función adonis (125) o anosim (126), según las dispersiones beta presentes en los grupos analizados. Se utilizó el análisis discriminante lineal con efecto del tamaño (“*Linear discriminant analysis Effect Size*”, LEfSe) (127) para identificar los biomarcadores microbianos que diferenciaban los grupos de estudio. Para el análisis de la asociación de la abundancia de taxones específicos con variables clínicas de interés, se llevó a cabo un análisis multivariable, mediante un modelo lineal generalizado ajustado según el criterio de información de Akaike (AIC) con una selección paso a paso hacia atrás, considerando las siguientes variables potencialmente relacionadas o de confusión: edad en el momento del alo-TPH, sexo, régimen de acondicionamiento (mieloablutivo/no mieloablutivo), fuente de células (médula ósea/sangre periférica), HCT-CI score (agrupado en categorías: 0, ≤ 2 y > 2), exposición a antibióticos antes de la toma de la muestra de microbiota, y la interacción entre esta exposición y la abundancia relativa de un taxón específico.

3.8. ASPECTOS ÉTICOS

Todos los procedimientos se han realizado conforme a la legislación vigente, los principios de la Declaración de Helsinki y las guías de buena práctica clínica. El estudio de investigación cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos y productos sanitarios (CEIm) de Cantabria (Ref: PI16/01415, 2017.112 y NVAL21/18) (Anexo III), como comité de referencia, y de los CEIm de cada uno de los centros participantes. Se solicitó el consentimiento informado (Anexo IV) por escrito a todos los pacientes participantes en el mismo para el uso de los datos y recogida de las muestras de seguimiento.

Los datos recogidos y derivados de la realización del estudio fueron anonimizados y tratados de un modo confidencial con arreglo a la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales, mediante un código de registro y hospital, teniendo únicamente acceso el personal investigador del proyecto en los centros participantes.

4. RESULTADOS

4.1. FLUJO DE RECLUTAMIENTO

La duración del reclutamiento del estudio fue de 43 meses, desde el 12/05/2017 hasta el 11/12/2020. El tiempo de seguimiento finalizó el 18/12/2021, fecha del seguimiento anual del último paciente incluido en el estudio. La recogida de muestras anual se prolongó hasta el año 2022, debido a pérdidas en el seguimiento ocasionadas por la pandemia de la COVID-19.

Durante el tiempo de reclutamiento, se llevaron a cabo un total de 603 alo-TPH en adultos en los centros participantes en el estudio. En el estudio principal de colonización intestinal por EMR se reclutaron un total de 186 pacientes, de los cuales, 107 participaron en el subestudio de microbiota intestinal, habiéndose realizado en 25 de ellos una recogida de muestras de microbiota intestinal hasta el año postrasplante. Tras la selección de las muestras, su procesamiento y el filtrado de calidad de las secuencias, finalmente se analizaron un total de 409 muestras de 95 pacientes.

El detalle del flujo de reclutamiento con los pacientes y muestras analizadas se encuentra en la figura 14.

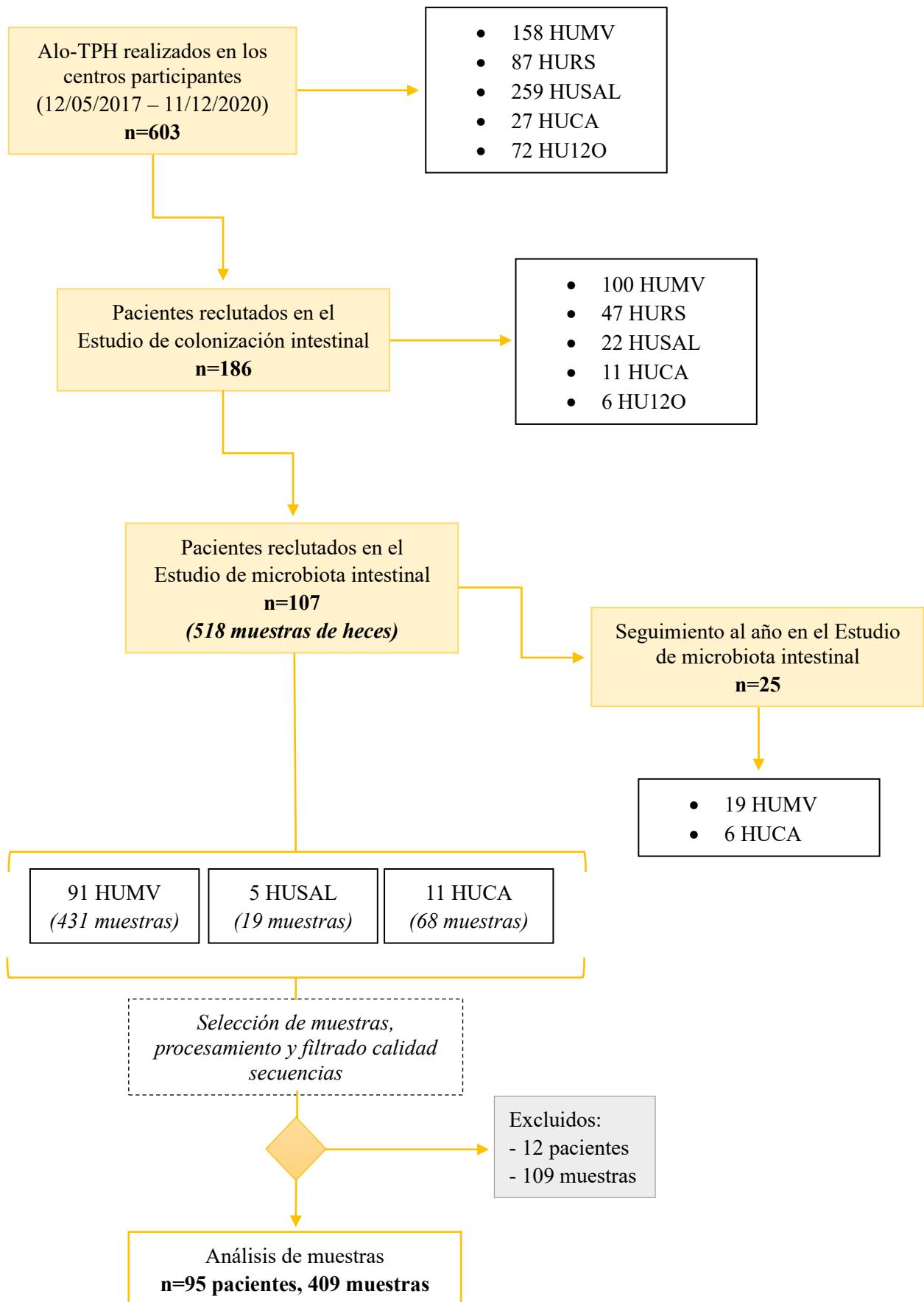


Figura 14. Flujo de reclutamiento de la población de estudio y análisis de muestras.

4.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La distribución de los pacientes incluidos por año de realización del alo-TPH se encuentra en la figura 15.

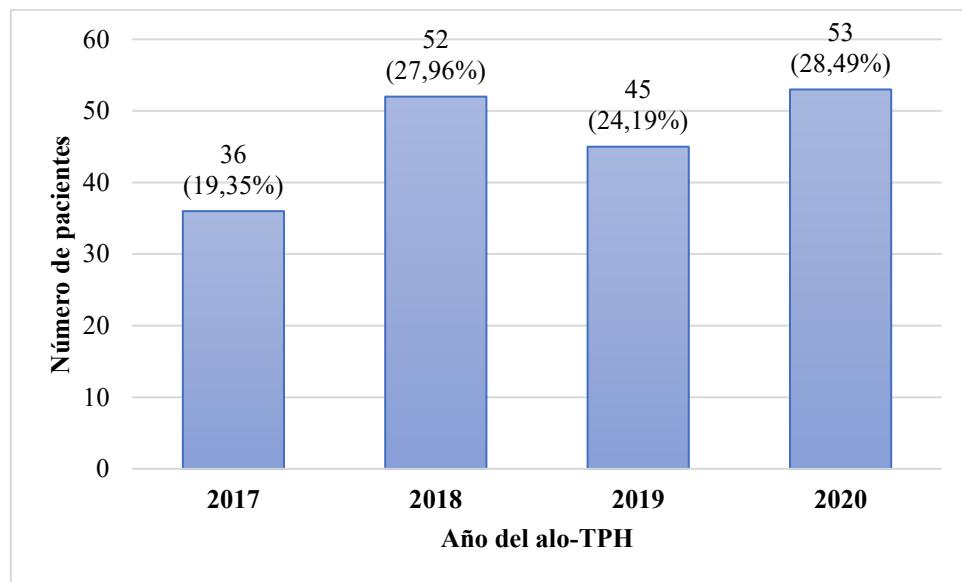


Figura 15. Distribución del número de pacientes reclutados por año de realización del trasplante.

A modo de resumen, las características principales de los 186 pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Características principales de la población de estudio y su evolución (n=186).

Características de la población de estudio	n	%
Características basales		
Sexo		
Hombre	119	63,98
Mujer	67	36,02
Edad en el momento del alo-TPH (años), mediana [rango]	54,13	[18,09–82,50]
Score HCT-CI, mediana [RIQ]	2	[0–3]
Score EBMT, media ± DE	3,49±1,35	
DRI index		
bajo	27	14,52
intermedio	100	53,76
alto	39	20,97
Enfermedad de base		

Tipo de enfermedad		
Leucemia mieloide aguda	57	30,65
Leucemia linfoblástica aguda	33	17,74
Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	30	16,13
Linfoma no Hodgkin	22	11,83
Linfoma de Hodgkin	10	5,38
Discrasia de células plasmáticas	9	4,84
Mielofibrosis primaria	8	4,30
Leucemia linfoblástica crónica	4	2,15
Aplasia medular	3	1,61
Leucemia mieloide crónica	2	1,08
Mielofibrosis secundaria	2	1,08
Otras	6	3,23
Número de líneas de tratamiento previas ¹ , mediana [RIQ]	1	[1-3]
Estadio de la enfermedad de base¹		
Remisión completa	92	49,46
Remisión completa con enfermedad mínima residual+	18	9,68
Muy buena respuesta parcial ²	4	2,15
Respuesta parcial	20	10,75
Enfermedad estable	19	10,22
Progresión	16	8,60
Aplasia sin blastos	2	1,08
Respuesta¹		
Pacientes en primera respuesta	105	56,45
Pacientes en segunda y posteriores respuestas	42	22,58
Datos del trasplante		
Fuente de progenitores hematopoyéticos		
Médula ósea	56	30,11
Sangre periférica	130	69,89
Donante		
HLA-Idéntico	101	54,30
HLA-Haploidéntico	76	40,86
HLA No idéntico	9	4,84
Tipo de acondicionamiento		
Mieloablativo	95	51,08
No mieloablativo	91	48,92
Profilaxis frente a EICH		
Ciclofosfamida/ICN/MMF	70	37,63
ICN/MTX	48	25,81
ICN/MMF	30	16,13
Ciclofosfamida	15	8,06
Ciclofosfamida/Tacrólimus	13	6,99
Otras	10	5,38

Profilaxis antibiótica	39	20,97
Profilaxis antibiótica con quinolonas	22	11,83
Evolución clínica		
Hospitalización (días), media ± DE	30,62±13,63	
EICHa	113	60,75
Afectación gastrointestinal	54	47,79
EICHc	54	29,03
Exitus (1 año tras el alo-TPH)	45	24,19
Causa primaria del exitus		
Recidiva de la enfermedad de base	14	31,11
EICH	9	20,00
Infección	11	24,44
Seguimiento (meses), mediana [RIQ]	12,22	[9,76–12,25]

Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; HCT-CI, índice de comorbilidad específico para el trasplante de células hematopoyéticas; RIQ, rango intercuartílico; EBMT, Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula Ósea; DE, desviación estándar; DRI, índice de riesgo de enfermedad; HLA, antígeno leucocitario humano; EICH, enfermedad injerto contra huésped; ICN, inhibidor de calcineurina; MMF, micofenolato mofetilo; MTX, metotrexato; EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica.

¹En 15 pacientes (8,06%) se desconoce su estado basal en el momento del alo-TPH.

²Sólo aplicable a mieloma.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los pacientes según sexo ($p=0,887$) o edad ($p=0,634$) por centro participante, ni tampoco en su edad en función del sexo (mujeres: media±DE=50,22±14,13 años vs. hombres: 52,70±14,16 años, $p=0,254$).

El 64,52% (120/186) de los pacientes incluidos en el estudio habían tenido algún ingreso hospitalario durante los 6 meses previos al ingreso para el alo-TPH, al 6,45% (12/186) se les había realizado un procedimiento invasivo durante los 30 días previos, y el 11,83% (22/186) y el 3,76% (7/186) habían recibido quimioterapia y corticoterapia, respectivamente, en ese periodo. El 15,59% (29/186) de los pacientes tenían un trasplante hematológico previo y el 41,40% (77/186) habían recibido algún tipo de antibioterapia durante los tres meses previos al alo-TPH.

Respecto a los episodios de infección conocidos previos al ingreso para el alo-TPH, en el 31,72% (59/186) de los pacientes se detectó algún episodio de infección durante los tres meses previos. El 42,37% (25/59) de los pacientes cursaron con una bacteriemia y en el 32,20% (19/59) se aisló una enterobacteria como germen causal del episodio infeccioso.

La información de los distintos regímenes empleados tanto del tipo de acondicionamiento como de la profilaxis frente a EICH se encuentra en la tabla 12. Se empleó radioterapia en el 22,04% (41/186) de los pacientes, timoglobulina en el 4,84% (9/186) y ATG en el 18,82% (35/186).

En 39/186 (20,97%) de los pacientes se empleó profilaxis antibiótica durante el periodo de neutropenia post-TPH. El 43,59% (17/39) recibieron cefalosporinas y el 56,41% (22/39) quinolonas: el 38,46% (15/39) ciprofloxacino y el 17,95% (7/39) levofloxacino.

La duración media del ingreso hospitalario de los pacientes receptores de un alo-TPH fue de $30,62 \pm 13,63$ días [16–177]. El 94,09% (175/186) alcanzó la recuperación granulocitaria, con una media de recuperación hasta los 100 y 500 neutrófilos de $15,42 \pm 3,84$ y $18,34 \pm 4,31$ días, respectivamente.

La mediana del tiempo de seguimiento de la población de estudio fue de 12,22 meses [RIQ: 9,76–12,25]. Las complicaciones detectadas durante dicho seguimiento se recogen en la tabla 13. De forma resumida, el 68,82% (128/186) de los pacientes presentó en algún momento un evento de EICH, tratándose en el 60,75% (113/186) de un episodio de EICHa y en el 29,03% (54/186) de un episodio de EICHc. En 152 (81,72%) pacientes se detectó un evento de toxicidad digestiva, el 60,75% (113/186) presentó diarrea, el 65,05% (121/186) mucositis y 108 (58,06%) pacientes reingresaron en algún momento durante el seguimiento.

Tabla 13. Diagnósticos clínicos de los pacientes durante el seguimiento del estudio (n=186).

Clinica de los pacientes durante el seguimiento	n	%
Episodio de fiebre neutropénica	135	72,58
Episodio de toxicidad digestiva	152	81,72
Mucositis	121	65,05
Diarrea	113	60,75
Enfermedad venooclusiva hepática	10	5,38
Cistitis hemorrágica	25	13,44
Estancia en UCI	28	15,05
Reingreso hospitalario	108	58,06
Número de reingresos, mediana [RIQ]	2	[1–3]
EICHa	113	60,75
Grado máximo alcanzado ≤ 2	83	73,45

Grado máximo alcanzado >2	30	26,55
Tiempo hasta grado máximo (días), mediana [RIQ]	40	[27–63]
Afectación gastrointestinal	54	47,79
Grado ≤2	35	64,81
Grado >2	19	35,19
 EICHc		
Grado leve	54	29,03
Grado moderado/severo	20	37,04
Tiempo hasta grado máximo (días), mediana [RIQ]	34	62,96
177		[133–255]
 Diagnóstico de algún episodio de infección	162	87,10
Bacteriemia	95	58,64
 Diagnóstico de episodio de infección por EMR	25	13,44
Bacteriemia por EMR	14	56,00
 Estatus a los 360 días		
Inmunosupresión activa (pacientes con ICN activo)	34	19,88
Tiempo con ICN activo (meses), mediana [RIQ]	5,52	[2,33–9,79]
Remisión	132	70,97
Recidiva	29	15,59
Fallo del implante	9	4,84
Exitus	45	24,19
Causa primaria del exitus:		
Recidiva	14	31,11
EICH	9	20,00
Infección	10	22,22
Infección por EMR	1	2,22
Otras ¹	11	24,44

UCI, unidad de cuidados intensivos; RIQ, rango intercuartílico; EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica; EMR, enterobacteria multirresistente; ICN, inhibidor de calcineurina; EICH, enfermedad injerto contra huésped.

¹Incluye: fallo del injerto (1), fallo orgánico (5), hemorragia (2), otras causas (3).

4.2.1. Estudio de colonización intestinal

En cuanto al estatus de colonización intestinal por EMR, el 40,86% (76/186) de los pacientes presentó en algún momento del seguimiento un frotis rectal positivo para, al menos, una EMR. En el 25% (19/76) la colonización se detectó en la muestra basal, previo al alo-TPH. En 73/76 (96,05%) pacientes se detectó la colonización durante el seguimiento post-TPH (tabla 14). La mediana de tiempo hasta la primera detección de colonización intestinal post-TPH fue de 28 [RIQ: 14–55] días.

Tabla 14. Distribución de los pacientes en función de la primera visita en la que se detectó la colonización intestinal (n=76).

Visita	n	%
Basal	19	25,00
Día +7	11	14,47
Día +14	11	14,47
Día +21	5	6,58
Día +30	10	13,16
Día +45	5	6,58
Día +60	5	6,58
Día +75	2	2,63
Día +90	3	3,95
Día +100	0	0,00
Día +120	3	3,95
Día +150	2	2,63
Día +180	0	0,00
Mes +9	0	0,00
Mes +12	0	0,00

En 29 de los pacientes ya colonizados se produjo una nueva colonización aislando una EMR diferente a la inicial durante el seguimiento.

Se recogieron un total de 1.826 frotis rectales a lo largo del estudio, de los cuales el 15,06% (275/1.826) fueron positivos para al menos una EMR. La distribución de los frotis recogidos y los frotis positivos por visita se puede ver en la figura 16.

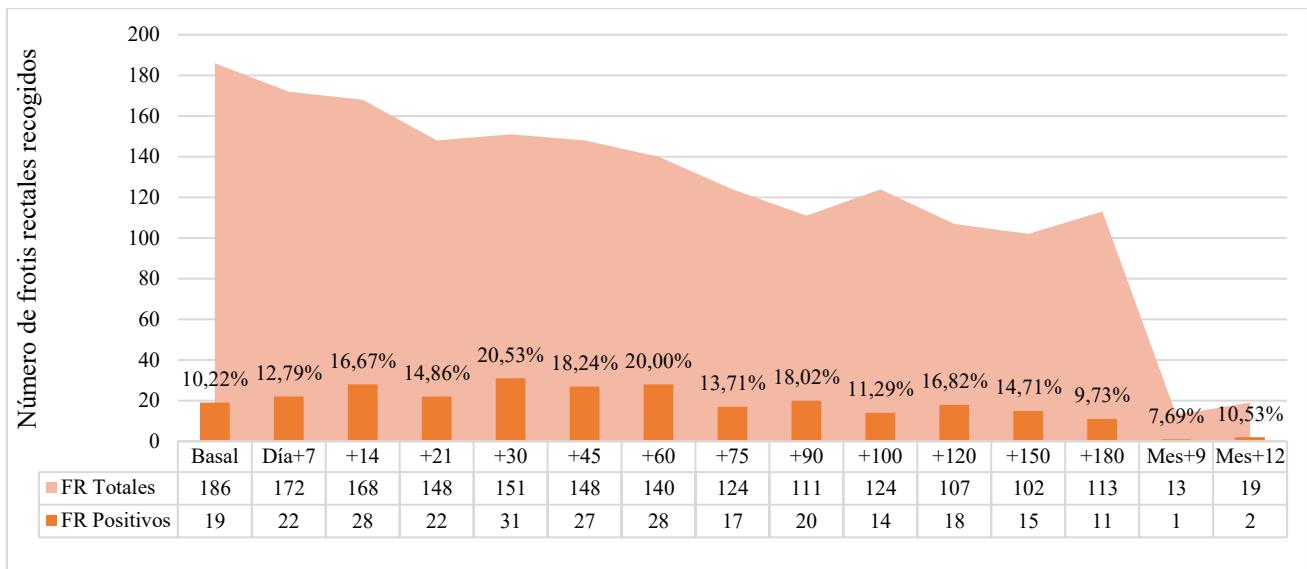


Figura 16. Número de frotis recogidos por visita a lo largo del seguimiento.

El área representa el número de frotis rectales recogidos por visita y las columnas el número de frotis positivos. Además, se muestra el porcentaje de frotis con resultado positivo respecto al total de recogidos, por visita.

FR, frotis rectal.

Las cepas y mecanismos de resistencia aislados en la población de estudio se describen en la tabla 15.

Tabla 15. Cepas de EMR y mecanismos de resistencia aislados en la población de estudio (n=186).

Tipo de EMR	n	%
<i>Escherichia</i> spp.	43	23,12
<i>Enterobacter</i> spp.	26	13,98
<i>Klebsiella</i> spp.	17	9,14
<i>Citrobacter</i> spp.	12	6,45
<i>Hafnia alvei</i>	1	0,54

Mecanismo de resistencia	n	%
BLEE	59	31,72
Carbapenemasas	17	9,14
R mecanismo ND	27	14,52

EMR, enterobacteria multirresistente; BLEE, betalactamasa de espectro extendido; R mecanismo ND, resistencia con mecanismo no determinado.

Respecto a las características clínicas de los pacientes en función de su estado de colonización, se evaluó el impacto de las características clínicas basales de los pacientes en el estatus de colonización pretrasplante (tabla 16) y el impacto de la colonización post-

TPH en su evolución (tabla 17). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estado de colonización basal en función del hospital de procedencia de los pacientes ($p=0,652$), su sexo ($p=0,670$) o la edad ($p=0,734$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en función de los diferentes índices de comorbilidad y riesgo evaluados para el alo-TPH, ni en la enfermedad hematológica de base (tabla 16).

Con relación a posibles factores de riesgo relacionados con la colonización intestinal se observó que los pacientes colonizados presentaban, de forma estadísticamente significativa, en mayor proporción episodios de infección y de bacteriemia en los tres meses previos al TPH que aquellos en los que no se detectó la colonización en el frotis pretrasplante (52,63% vs. 29,34%, $p=0,045$; 31,58% vs. 11,38%, $p=0,014$, respectivamente). En el caso del tratamiento antibiótico previo, se observó una mayor exposición en los pacientes colonizados frente a los no colonizados, aunque no se alcanzó la significación estadística (63,16% vs. 38,92%, $p=0,051$).

Respecto a la profilaxis antibiótica empleada durante el trasplante, si bien se observó que los pacientes no colonizados habían recibido en mayor proporción esta profilaxis (25,66% vs. 13,70%, $p=0,047$), esta relación no se mantuvo al poner el foco en el uso de profilaxis con quinolonas (12,39% vs. 10,96%, $p=0,548$).

Durante el seguimiento posttrasplante aquellos pacientes con aislamiento de EMR en los frotis de seguimiento presentaron una duración media del ingreso hospitalario mayor (32,89 vs. 29,13, $p=0,033$), la media de días que tardaron en alcanzar la recuperación granulocitaria fue mayor (16,23 vs. 14,89, $p=0,012$), presentaron en mayor proporción eventos de toxicidad digestiva (91,78% vs. 75,22%, $p=0,019$), de episodios de diarrea (72,60% vs. 53,10%, $p=0,020$) y de fiebre neutropénica (84,93% vs. 64,60%, $p=0,002$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con otras variables como la estancia en UCI ($p=0,964$), reingreso hospitalario ($p=0,088$) y episodios de EICHa ($p=0,914$) o EICHc ($p=0,550$). Respecto a los episodios de infección, los pacientes con colonización intestinal por EMR presentaron en mayor proporción episodios de infección por EMR frente a los no colonizados de forma estadísticamente significativa (28,77% vs. 3,54%, $p<0,001$). Además, el número medio de días desde el alo-TPH hasta el diagnóstico del primer episodio de infección por EMR fue menor en los pacientes colonizados (24,81 vs. 58,50, $p=0,052$), aunque no alcanzó la significación

estadística, y cursó en mayor porcentaje con bacteriemias (16,44% vs. 1,77%, $p<0,001$) (tabla 17).

No se encontraron diferencias en el estatus de los pacientes al año del trasplante, en cuanto al estado de remisión ($p=0,291$), recidiva ($p=0,503$) y el fallecimiento ($p=0,817$), en función de la colonización intestinal.

4.2.1.1. Análisis multivariable

Para comprobar el efecto de la colonización intestinal por EMR en la evolución clínica de los pacientes, se llevó a cabo un análisis multivariable de las características que resultaron significativas en el análisis univariable, incluyendo posibles factores de confusión.

Tras ajustar el análisis multivariable por la edad, el hospital de procedencia, la enfermedad de base y los distintos scores de comorbilidad asociados con la evolución clínica, se observó que la colonización intestinal por EMR se asoció con un aumento estadísticamente significativo en la duración de la estancia hospitalaria. Específicamente, los pacientes colonizados tuvieron una duración media de hospitalización 5,34 días más larga (IC 95%: 1,13–9,55; $p=0,013$) en comparación con aquellos no colonizados (tabla 17). La edad y la estancia en UCI también resultaron factores estadísticamente significativos en la duración de la estancia hospitalaria. En el primer caso, encontramos una asociación negativa, reduciéndose la estancia hospitalaria 0,25 días por cada año de edad (IC 95%: -0,41 a -0,79; $p=0,004$). La estancia en UCI fue un predictor altamente significativo, produciéndose un aumento, en promedio, de 12,78 días (IC 95%: 7,16–18,41; $p<0,001$).

La colonización intestinal se asoció con odds 2,46 veces mayores de desarrollar episodios de fiebre neutropénica. Sin embargo, esta asociación no alcanzó significación estadística (IC 95%: 0,87–6,88; $p=0,087$) (tabla 17).

En cuanto al desarrollo de episodios de infección por EMR, tras hacer un ajuste por hospital y el uso de profilaxis antibiótica durante el trasplante, se observó que los pacientes colonizados presentaron un odds 8,49 veces mayor de desarrollar episodios de infección que los no colonizados (IC 95%: 2,71–26,64; $p<0,001$) y una odds 8,82 veces

mayor de desarrollar un episodio de bacteriemia por EMR (IC 95%: 1,82–42,73; $p=0,007$) (tabla 17).

Tabla 16. Características de la población de estudio en función del estatus de colonización intestinal pretrasplante por EMR.

	Pacientes No Colonizados (n=167)	Pacientes Colonizados (n=19)	Análisis univariante p-valor
Características basales, n (%)			
Sexo			0,670
Hombre	106 (63,47)	13 (68,42)	
Mujer	61 (36,53)	6 (31,58)	
Edad en el momento del alo-TPH (años), media±DE	51,93±13,76	50,76±17,66	0,734
Score HCT-CI, media±DE	1,91±1,80	1,84±1,61	0,864
Score EBMT, media±DE	3,49±1,37	3,58±1,22	0,775
DRI index			0,139
bajo	24 (14,37)	3 (15,79)	
intermedio	91 (54,49)	9 (47,37)	
alto	35 (20,96)	4 (21,05)	
Enfermedad de base			0,739
Leucemia mieloide aguda	50 (29,94)	7 (36,84)	0,536
Leucemia lifoblástica aguda	29 (17,37)	4 (3,4)	0,751
Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	27 (16,17)	3 (15,79)	1,000
Factores de riesgo, n (%)			
Procedimiento invasivo en el mes previo al TPH	11 (6,59)	1 (5,26)	1,000
Ingresos en 6 meses previos al TPH	105 (62,87)	15 (78,95)	0,195
Infecciones en los 3 meses previos al TPH	49 (29,34)	10 (52,63)	0,045*
Bacteriemia	19 (11,38)	6 (31,58)	0,014*
Infección por enterobacteria	15 (8,98)	4 (21,05)	0,111
Tratamiento antibiótico en los 3 meses previos	65 (38,92)	12 (63,16)	0,051

Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; DE, desviación estándar; HCT-CI, índice de comorbilidad específico para el trasplante de células hematopoyéticas; EBMT, Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula Ósea; DRI, índice de riesgo de enfermedad.

*Valor estadísticamente significativo.

Tabla 17. Características de la población de estudio en función del estatus de colonización intestinal posttrasplante por EMR.

	Pacientes No Colonizados (n=113)	Pacientes Colonizados (n=73)	Análisis univariante p-valor	Análisis multivariable p-valor
Factores de riesgo del trasplante, n (%)				
Progenitores hematopoyéticos de sangre periférica	80 (70,80)	50 (68,49)	0,738	
Donante HLA no idéntico	5 (4,42)	4 (5,48)	0,740	
Profilaxis antibiótica	29 (25,66)	10 (13,70)	0,047*	
Profilaxis con quinolonas	14 (12,39)	8 (10,96)	0,548	
Clínica durante el seguimiento, n (%)				
Duración del ingreso (días), media±DE	29,13±6,68	32,89±19,93	0,033*	0,013*
Número de días hasta recuperación de 100 neutrófilos, media±DE	14,89±3,41	16,23±4,31	0,012*	
Número de días hasta recuperación de 500 neutrófilos, media±DE	18,07±3,94	18,77±4,83	0,294	
Episodio de fiebre neutropénica	73 (64,60)	62 (84,93)	0,002*	0,087
Toxicidad digestiva	85 (75,22)	67 (91,78)	0,019*	
Episodio de diarrea	60 (53,10)	53 (72,60)	0,020*	
Estancia en UCI	17 (15,32)	11 (15,07)	0,964	
Reingreso hospitalario	60 (53,10)	48 (65,75)	0,088	
Episodio de EICHa, n (%)	69 (61,06)	44 (60,27)	0,914	
Tiempo desde TPH hasta desarrollo de EICHa (días), media (DE)	44,45±25,82	69,78±66,40	0,006*	
Afectación gastrointestinal	38 (55,07)	16 (36,36)	0,052	
Episodio de EICHc, n (%)	31 (27,43)	23 (31,55)	0,550	
Tiempo desde TPH hasta desarrollo de EICHc (días), media (DE)	191,71±89,79	197,43±83,31	0,812	
Episodios de Infección por EMR, n (%)	4 (3,54)	21 (28,77)	<0,001*	<0,001*
Tiempo desde TPH hasta primer episodio de infección (días), media (DE)	58,50±56,30	24,81±23,84	0,052	
Bacteriemia	2 (1,77)	12 (16,44)	<0,001*	0,007*
Estatus a los 360 días post-TPH				
Remisión	77 (68,14)	55 (75,34)	0,291	
Recidiva	16 (14,16)	13 (17,81)	0,503	
Exitus	28 (24,78)	17 (23,29)	0,817	

HLA, antígeno leucocitario humano; DE, desviación estándar; EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica; EMR, enterobacteria multirresistente; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos.

*Valor estadísticamente significativo.

4.2.2. Complicaciones infecciosas por EMR

Se detectaron 38 episodios de infección por EMR en 25 pacientes (13,44%) de los 186 que forman la población de estudio. La media del número de episodios de infección por EMR fue de $1,55 \pm 0,89$ [1–4], con una mediana de días desde el alo-TPH hasta el primer episodio de infección igual a 14 [RIQ: 9–39].

La mayoría de los episodios de infección se concentraron en el periodo de neutropenia (39,47%; 15/38) y hasta los 100 días post-TPH (42,11%; 16/38). No encontrándose diferencias significativas entre grupos de colonizados y no colonizados ($p=0,056$). Si bien, la media del número de días transcurridos desde el trasplante hasta el diagnóstico del primer episodio de infección fue menor en los pacientes colonizados que en los no colonizados (tabla 17).

El 44,74% (17/38) tuvieron foco urinario, el 10,53% (4/38) respiratorio, 7,89% (3/38) estuvieron asociados a catéter, el 5,26% (2/38) intestinal y el 2,63% (1/38) asociado a mucositis. En 5 episodios (13,16%) no se detectó el foco y 6 (15,79%) presentaron distintos focos infecciosos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tipo de foco en función del estado de colonización del paciente ($p=0,667$). El 47,37% (18/38) de los episodios cursaron con bacteriemia.

En cuanto a los microorganismos causales, el 52,63% (20/38) fueron debidos a *E. cloacae*, seguido de *E. coli* en un 31,58% (12/38). Los mecanismos de resistencia mayoritarios fueron las BLEE (34,21%, 13/38) y su presencia junto a genes productores de carbapenemas (26,32%, 10/38).

En un 18,42% (7/38) de los episodios de infección se precisó ingreso hospitalario, en un 13,16% (5/38) ingreso en UCI y en 2 (5,26%) se produjo el fallecimiento del paciente, aunque la infección no fue la causa primaria del evento. El primer caso, se trató de una neumonía por *E. cloacae* productor de BLEE y carbapenemasa tipo GES en un paciente no colonizado que presentó varias infecciones por otros microorganismos a lo largo del seguimiento. Con un EICHa grado IV refractario con hemorragia digestiva, que desencadenó un shock mixto y fallo multiorgánico, siendo ésta la causa principal de exitus. El segundo caso, fue un cuadro de colecistitis aguda litiasica complicada con bacteriemia por *E. cloacae* y *Klebsiella variicola* productores de BLEE y carbapenemas tipo OXA-48, en un paciente con EICHa digestiva grado IV refractaria. El cuadro clínico

evolucionó a una insuficiencia respiratoria aguda con necesidad de intubación orotraqueal, síndrome de distrés respiratorio y finalmente el fallecimiento del paciente.

En 30 (78,95%) de los episodios, el microorganismo causal fue el mismo que el detectado en los frotis rectales de seguimiento. En 22 episodios la infección se produjo después de haberse detectado la EMR causal en los frotis de colonización, mientras que, en 8 casos la colonización se detectó después de haber sido diagnosticado del episodio de infección por dicho microorganismo. La mediana de días desde la detección de la colonización hasta el diagnóstico de la infección fue de 20 [RIQ: 4–45] días.

4.2.3. Análisis de supervivencia

La supervivencia global de la población de estudio fue del 75,50% hasta los 381 días post-TPH y la no relacionada con la recidiva de la enfermedad hematológica de base del 81,80%. La figura 17 representa la función de supervivencia y el IC 95% en cada caso.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia en función del estado de colonización de los pacientes (log-rank test; $p=0,549$) (figura 18). Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia de los pacientes que habían presentado un episodio de infección por EMR y aquellos que no (log-rank test: $p=0,013$) (figura 19).

En el análisis multivariable ajustado por edad, sexo, enfermedad de base, uso de profilaxis antibiótica durante el alo-TPH, el tiempo de exposición a inmunosupresores y la presencia de episodios de fiebre neutropénica durante el seguimiento, se observó que aquellos pacientes que tuvieron un episodio de infección por EMR tenían una tasa de riesgo 4,50 veces mayor de fallecer que aquellos que no (IC 95%: 2,05–9,91; $p<0,001$). Siendo este valor 5,85 veces mayor en el caso de fallecimiento no relacionado con la recidiva de la enfermedad de base (IC 95% 2,34–14,63; $p<0,001$). Además, el análisis mostró que el tiempo de tratamiento con inhibidores de calcineurina, como tratamiento inmunosupresor, se asoció con una disminución estadísticamente significativa en la tasa de riesgo de fallecimiento por cualquier causa (hazard ratio: 0,987, IC 95%: 0,982–0,992; $p<0,001$).

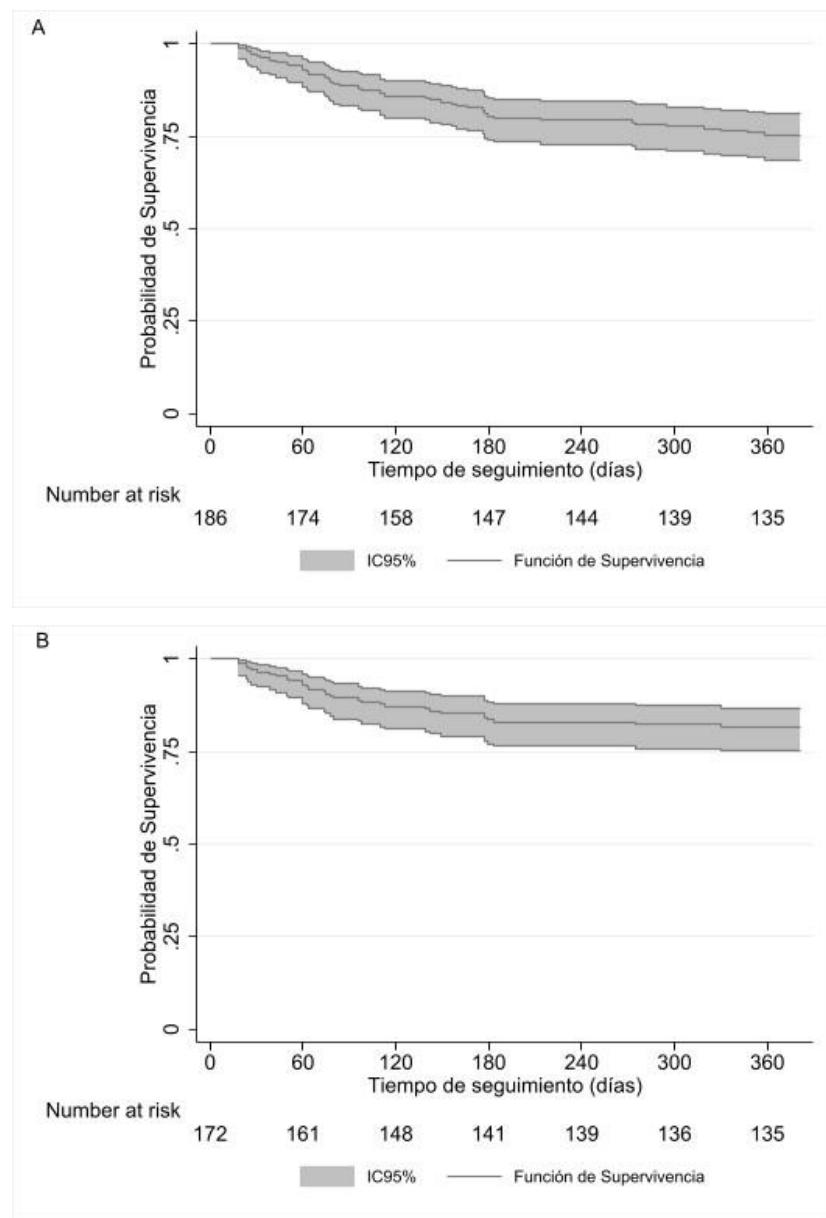


Figura 17. Curva de supervivencia global (A) y no relacionada con la recidiva de la enfermedad hematológica de base (B) de la población de estudio a lo largo del seguimiento. Se muestra la función de supervivencia y el intervalo de confianza del 95%.

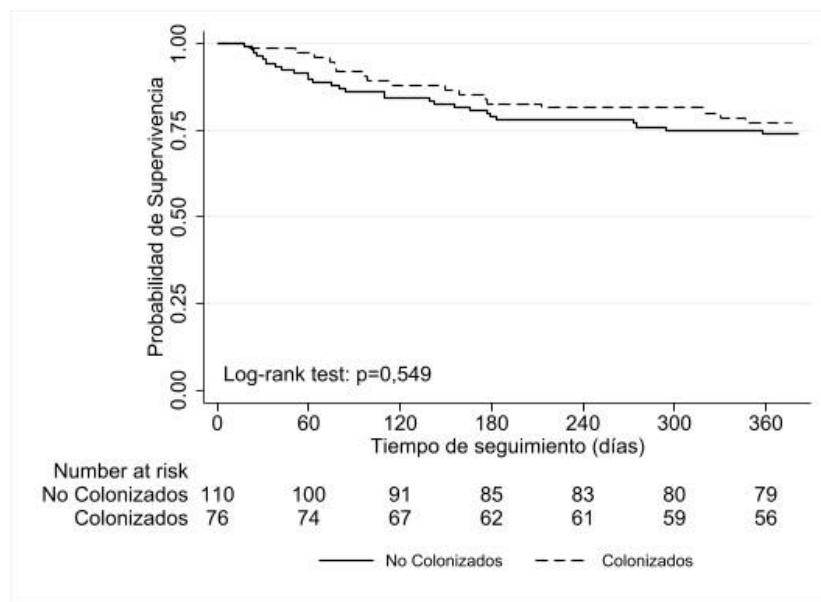


Figura 18. Curva de supervivencia en función del estado de colonización.

La línea continua representa los pacientes no colonizados y la línea punteada los colonizados. Se indica el resultado del análisis estadístico obtenido en el log-rank test.

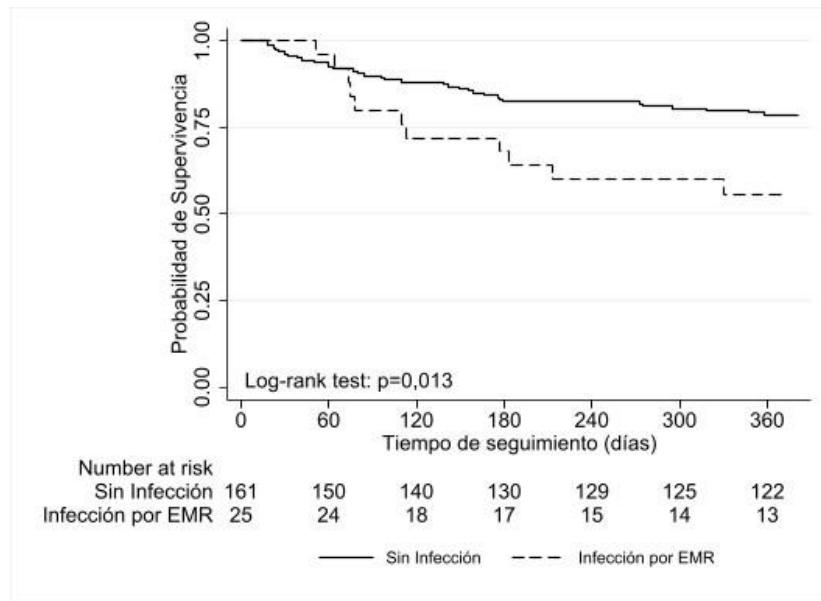


Figura 19. Curva de supervivencia en función de si los pacientes presentaron o no un episodio de infección por EMR durante el seguimiento.

La línea continua representa los pacientes que no presentaron infección y la línea punteada a los pacientes que desarrollaron un episodio de infección por EMR. Se indica el resultado del análisis estadístico obtenido en el log-rank test.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES

4.3.1. Aislamiento en frotis rectales de seguimiento

De los 275 frotis rectales que resultaron positivos se aislaron 295 cepas de EMR correspondientes a 76 pacientes: 169 cepas de 49 pacientes en el HUMV, 62 cepas de 16 pacientes en el HURS, 55 cepas de 7 pacientes en el HUCA y 9 cepas de 4 pacientes en el HUSAL.

Los microorganismos aislados se pueden ver en la figura 20. A modo de resumen, el 45,76% (135/295) de las cepas aisladas fueron *E. coli*, seguido de *Enterobacter cloacae* (23,39%; 69/295), *K. pneumoniae* (17,97%; 53/295) y *Citrobacter freundii* (6,44%; 19/295), mayoritariamente.

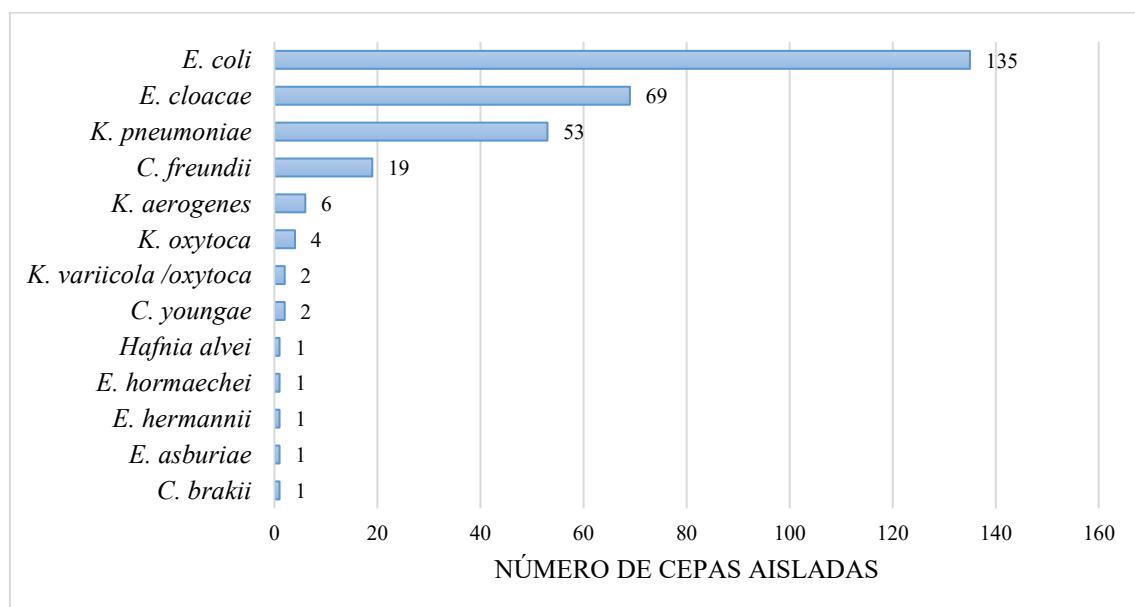


Figura 20. Especies de EMR aisladas en los frotis rectales de seguimiento.

La distribución de las cepas por visita se observa en la figura 21. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los microorganismos según las visitas ($p=0,636$).

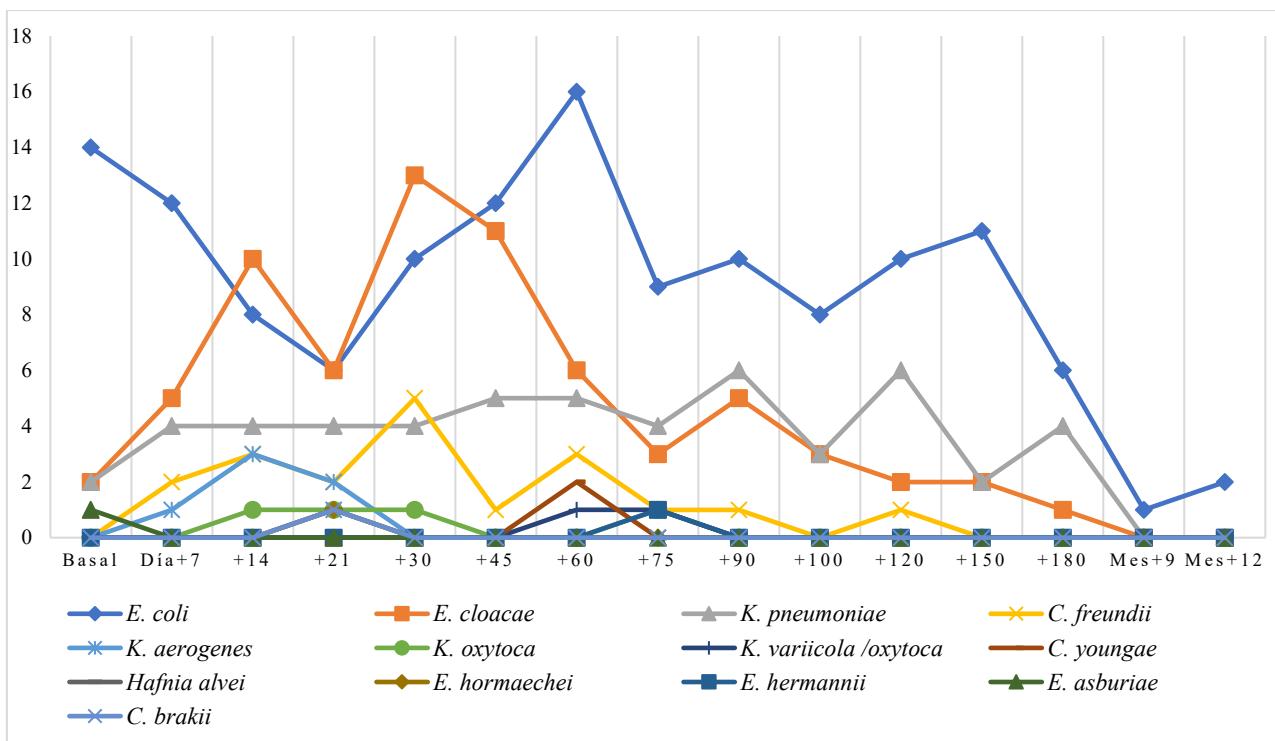


Figura 21. Número de EMR aisladas en función del tipo de microorganismo y la visita de seguimiento.

En las figura 22 y figura 23 se observa el grado de resistencia y la distribución de los diferentes mecanismos detectados en dichas enterobacterias. En el primer caso, los microorganismos se han dividido atendiendo a su antibiograma siguiendo la clasificación de Magiorakos A et al. (84) en: multirresistente, extremadamente resistente y panresistente, incluyéndose además para la clasificación la definición de microorganismo multirresistente difícil de tratar (85, 86). La segunda figura muestra la distribución de los mecanismos de resistencia. Su distribución en función de la especie de enterobacteria se encuentra en la figura 24.

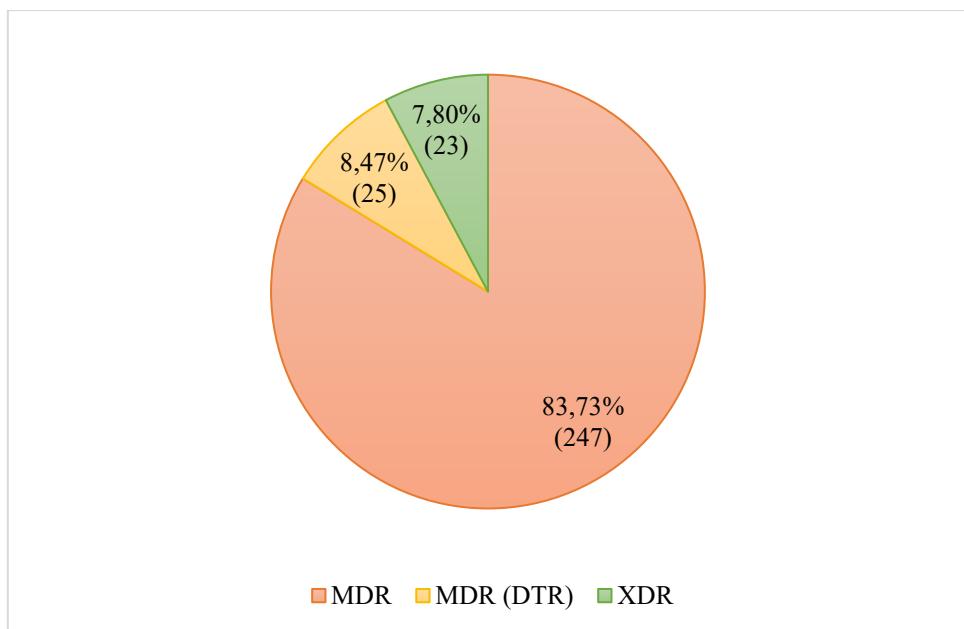


Figura 22. Distribución del grado de resistencia encontrado en las cepas de enterobacterias aisladas.

MDR, multirresistente (“multidrug-resistant”); DTR, difícil de tratar (“difficult-to-treat”); XDR, extremadamente resistente (“extensively drug-resistant”).

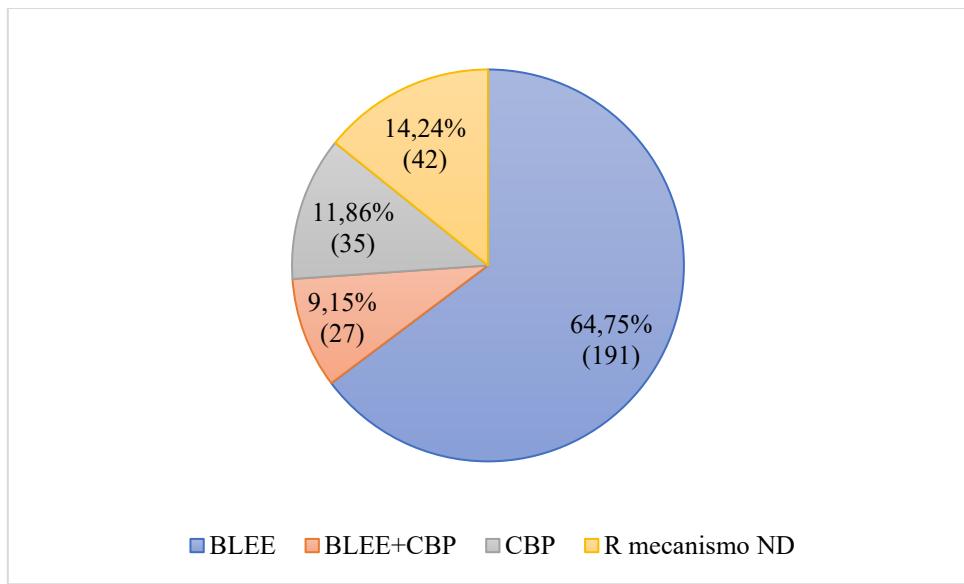


Figura 23. Distribución de los mecanismos de resistencia encontrados en las cepas de enterobacterias aisladas.

BLEE, betalactamasas de espectro extendido; CBP, carbapenemasas; R mecanismo ND, resistencia con mecanismo no determinado.

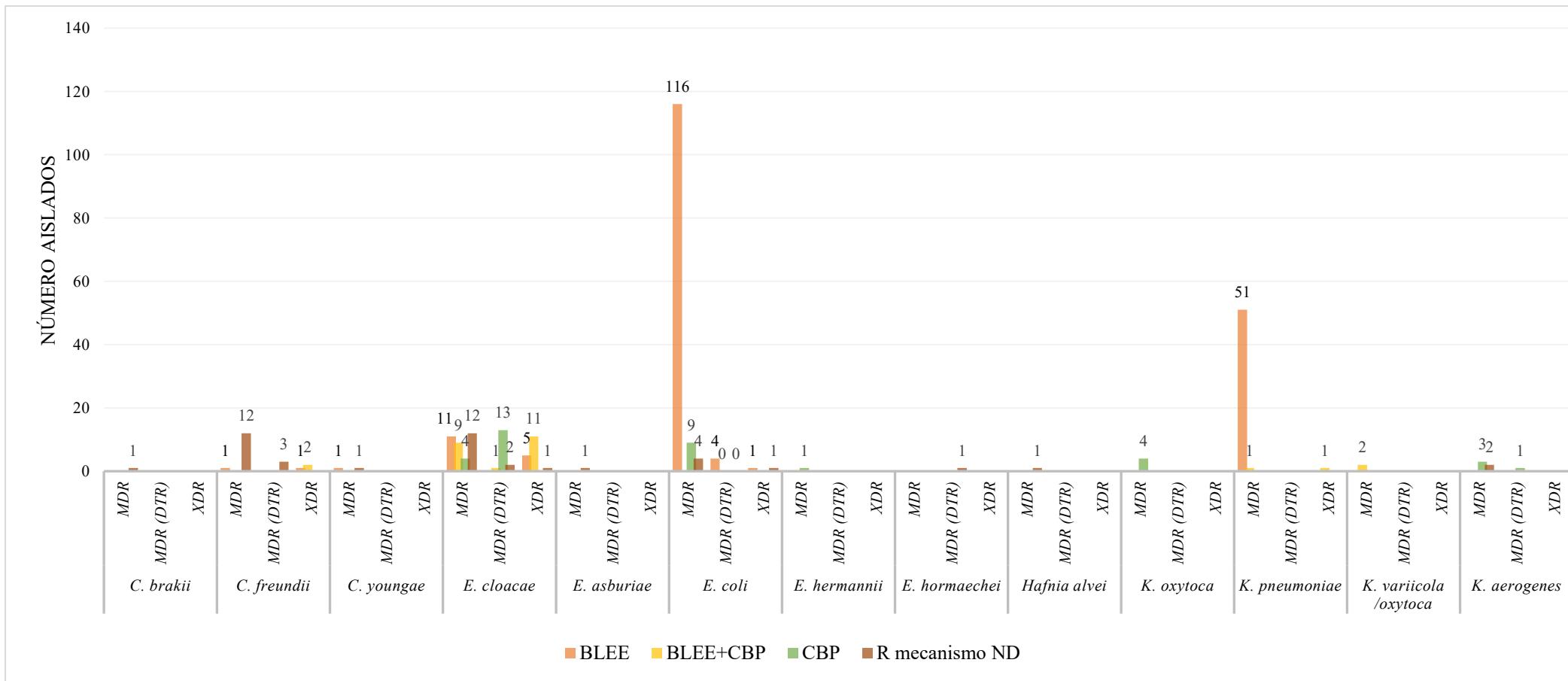


Figura 24. Distribución del grado y tipo de resistencia detectados por cepa de enterobacteria aislada durante el seguimiento.

MDR, multirresistente (“multidrug-resistant”); DTR, difícil de tratar (“difficult-to-treat”); XDR, extremadamente resistente (“extensively drug-resistant”); BLEE, betalactamasas de espectro extendido; CBP, carbapenemasas; R mecanismo ND, resistencia con mecanismo no determinado.

De las 218 cepas en las que se detectaron genes codificantes de BLEE, el 79,36% (173) portaban, al menos, genes codificantes de CTX-M; el 64,22% (140) para TEM y el 35,78% (78) para SHV.

En cuanto al tipo de carbapenemasa, el 53,23% (33) eran tipo GES, el 25,81% (16) OXA, el 19,35% (12) IMP y 1 (1,61%) de las cepas era portadora de KPC.

Respecto a otros mecanismos, se detectaron enzimas modificadoras de aminoglucósidos en 178 (60,34%) de las cepas analizadas, siendo el gen de la acetiltransferasa *aac(6')-Ib* el más prevalente (67,42%), seguido de *aac(3')-IIa* (42,13%) y de la fosfotransferasa *aph(3')-Ia* (27,53%). El 53,90% de las cepas eran portadoras de genes *qnr* de resistencia a quinolonas, siendo los genes más prevalente *qnrB* (60,67%) y *oqxAB* (52,25%). En relación con los genes codificantes de AmpC plasmídica, se encontraron en el 7,12% (21/295) de las cepas analizadas. CIT fue el tipo de enzima más frecuente (85,71%; 18/21).

4.3.2. Aislamiento en muestras clínicas de infección

Se obtuvieron 33 cepas de EMR en muestras clínicas de 21 pacientes causantes de un episodio de infección. Los microorganismos aislados se pueden ver en la figura 25. A modo de resumen, las especies mayoritarias fueron *E. coli* y *E. cloacae* representando ambas el 36,36% (12/33) de los aislados.

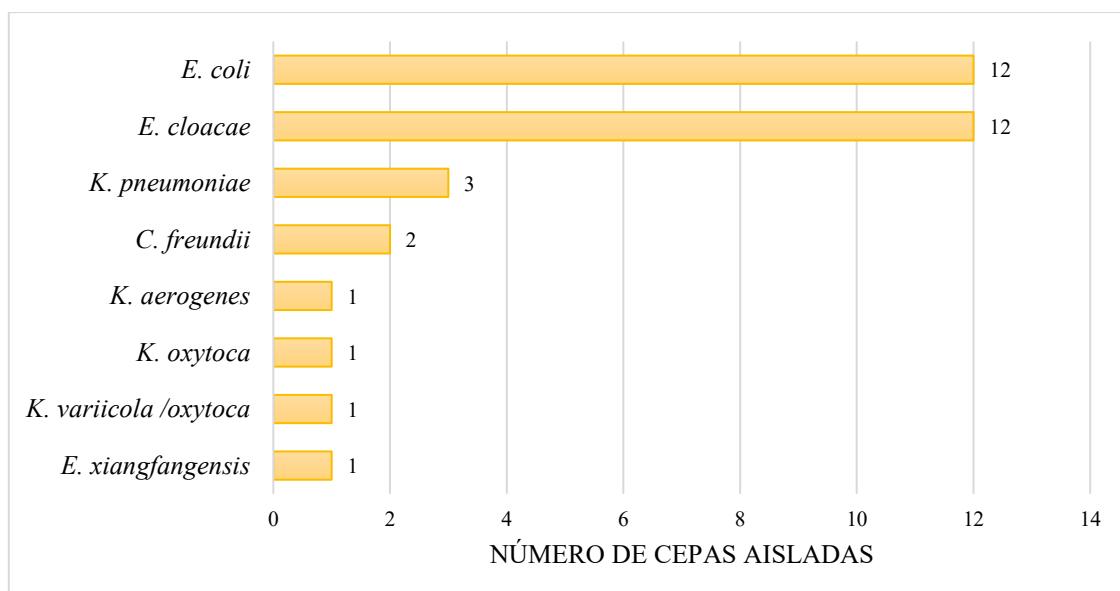


Figura 25. Especies de EMR aisladas en muestras clínicas causantes de episodios de infección.

En las figura 26 y figura 27 se observa el grado de resistencia y la distribución de los diferentes mecanismos detectados, respectivamente, siguiendo la misma clasificación que la empleada en las EMR de los frotis rectales de seguimiento. Su distribución en función de la especie de enterobacteria se encuentra en la figura 28.

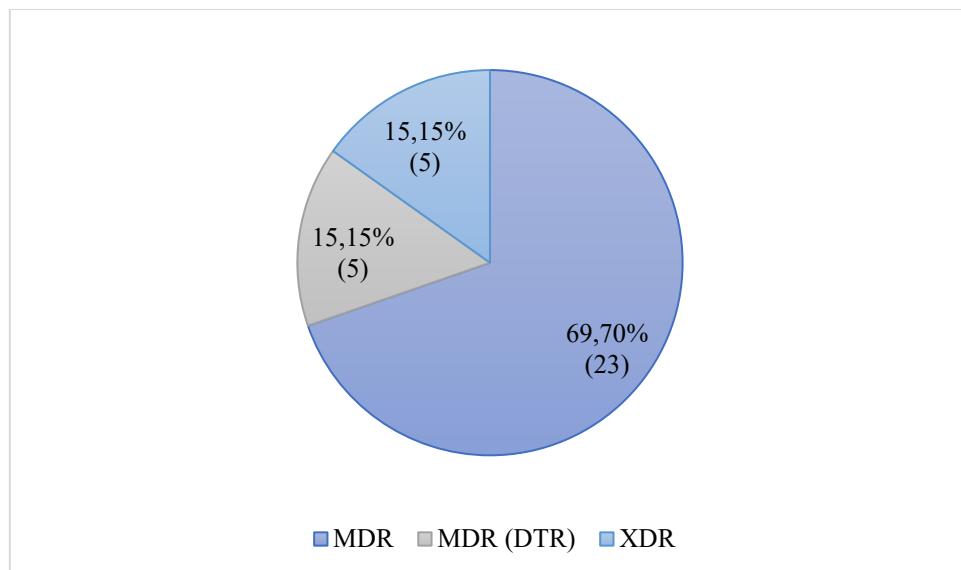


Figura 26. Distribución del grado de resistencia encontrado en las cepas de enterobacterias aisladas.

MDR, multirresistente (“*multidrug-resistant*”); DTR, difícil de tratar (“*difficult-to-treat*”); XDR, extremadamente resistente (“*extensively drug-resistant*”).

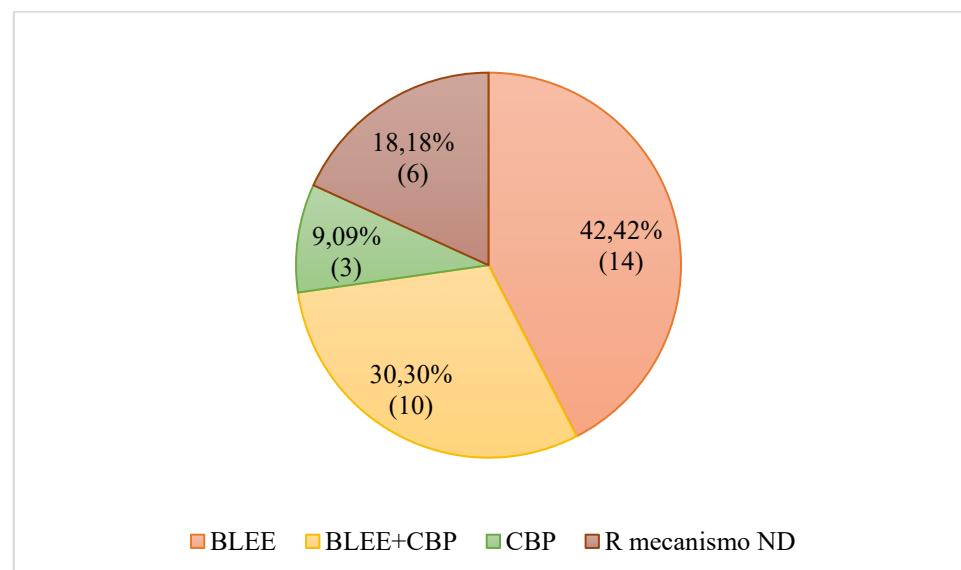


Figura 27. Distribución de los mecanismos de resistencia encontrados en las cepas de enterobacterias aisladas.

BLEE, betalactamasas de espectro extendido; CBP, carbapenemasas; R mecanismo ND, resistencia con mecanismo no determinado.

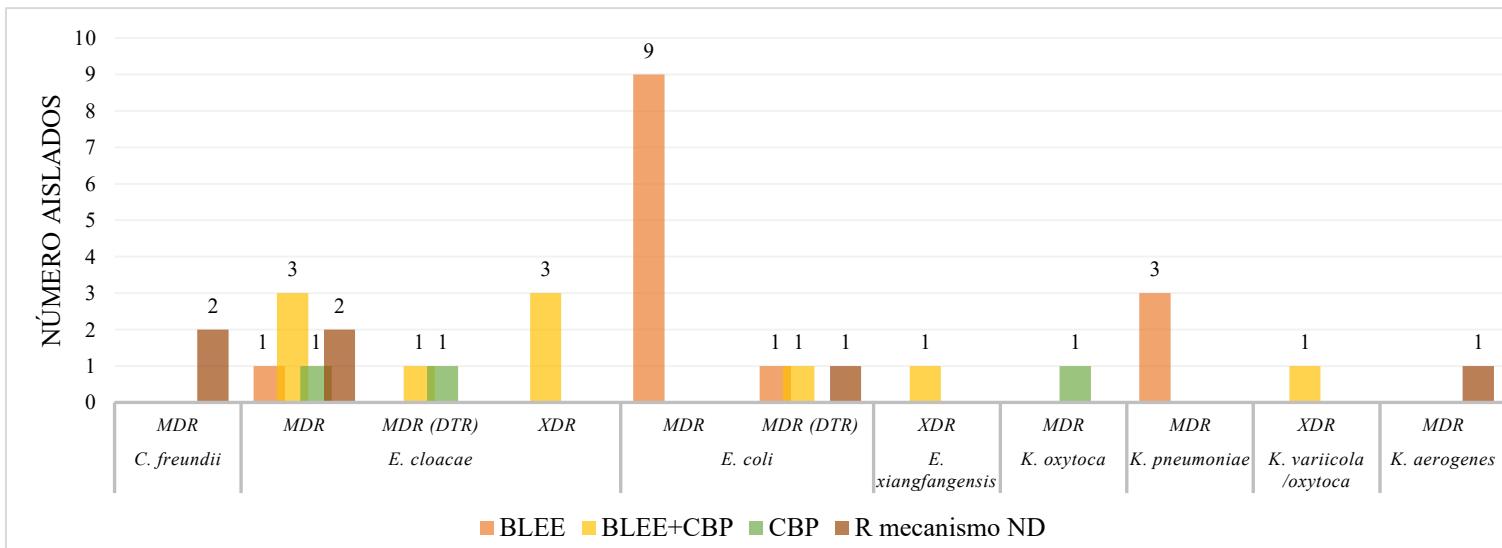


Figura 28. Distribución del grado y tipo de resistencia detectados por cepa de enterobacteria aislada en muestras clínicas de infección durante el seguimiento.

MDR, multirresistente (“multidrug-resistant”); DTR, difícil de tratar (“difficult-to-treat”); XDR, extremadamente resistente (“extensively drug-resistant”); BLEE, betalactamasas de espectro extendido; CBP, carbapenemasas; R mecanismo ND, resistencia con mecanismo no determinado.

De las 24 cepas en las que se detectaron genes codificantes de BLEE, el 91,67% (22/24) portaban, al menos, genes codificantes de CTX-M; el 62,50% (15/24) para TEM y el 16,67% (4/24) para SHV.

En cuanto al tipo de carbapenemasa, el 61,54% (8/13) eran tipo GES, el 23,08% (3/13) OXA y el 15,38% (2/13) IMP.

Se detectaron enzimas modificadoras de aminoglucósidos y genes *qnr* en 17 (51,524%) de las cepas analizadas. Los genes más prevalentes fueron *aac(6')-Ib* (88,24%; 15/17) en el primer caso, y *qnrB* (76,47%; 13/17) en el segundo. Únicamente una de las cepas presentó genes codificantes de AmpC plasmídica tipo CIT.

La mayoría de las cepas se obtuvieron en hemocultivos (51,52%; 17/33), seguido de urocultivos (30,30%; 10/33). En la figura 29 se puede ver el detalle de las diferentes muestras clínicas de las que se aislaron cepas de EMR.

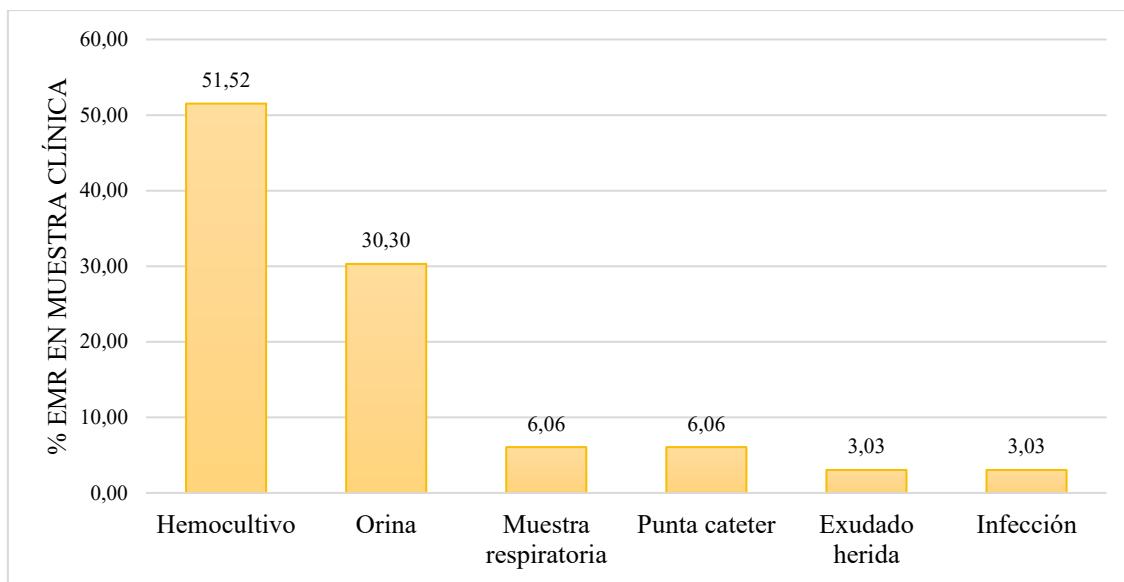


Figura 29. Porcentaje de EMR obtenidas en función del tipo de muestra clínica.

EMR, enterobacteria multirresistente.

*En el caso de la categoría “Infección”, se desconoce el tipo de muestra clínica en la que se aisló la cepa de EMR.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

4.4.1. Análisis descriptivo de los pacientes

Se recogieron un total de 519 muestras de heces de 107 pacientes receptores de un alo-TPH en los centros participantes en el estudio: HUMV, HUCA y HUSAL. Tras excluir a 12 pacientes por cantidad insuficiente de muestras o problemas bioinformáticos, se analizaron 409 muestras de 95 pacientes (figura 14). Las características clínicas de los pacientes y del trasplante se resumen en la tabla 18.

Tabla 18. Características de la población incluida en el estudio de microbiota intestinal (n=95).

Características de la población de estudio	n	%
Características basales		
Sexo		
Hombre	61	64,21
Mujer	34	35,79
Edad en el momento del alo-TPH (años), mediana [rango]	53,69	[18,09–82,50]
Score HCT-CI, mediana [RIQ]	2	[1–3]
Score EBMT, media ± DE	3,64±1,27	
DRI index		

bajo	13	13,68
intermedio	54	56,84
alto	25	26,32
Enfermedad de base		
Tipo de enfermedad		
Leucemia mieloide aguda	24	25,26
Leucemia linfoblástica aguda	19	20,00
Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	15	15,79
Linfoma no Hodgkin	10	10,53
Mielofibrosis primaria	7	7,37
Linfoma de Hodgkin	5	5,26
Discrasía de células plasmáticas	4	4,21
Leucemia linfoblástica crónica	3	3,16
Leucemia mieloide crónica	2	2,11
Otras ¹	6	6,32
Número de líneas de tratamiento previas, mediana [RIQ]	1	[1-3]
Estadio de la enfermedad de base		
Remisión completa	45	47,37
Remisión completa con enfermedad mínima residual+	16	16,84
Respuesta parcial	13	13,68
Enfermedad estable	15	15,79
Progresión	6	6,32
Respuesta		
Pacientes en primera respuesta	56	58,95
Pacientes en segunda y posteriores respuestas	21	22,11
Datos del trasplante		
Fuente de progenitores hematopoyéticos		
Médula ósea	40	42,11
Sangre periférica	55	57,89
Donante		
HLA-Idéntico	60	63,16
HLA No idéntico	6	6,32
HLA-Haploidéntico	29	30,53
Tipo de acondicionamiento		
Mieloablativo	58	61,05
No mieloablativo	37	38,95
Profilaxis frente a EICH		
Ciclofosfamida/ICN/MMF	32	33,68
ICN/MTX	30	31,58
ICN/MMF	20	21,05
Ciclofosfamida	11	11,58
Otras	2	2,11

Profilaxis antibiótica	11	11,58
Colonización	47	49,47
Colonización pretrasplante	10	10,53
Colonización postrasplante	46	48,42
Tiempo desde el alo-TPH hasta detección de colonización (días), mediana [RIQ]	28	[14–58]
Clínica de los pacientes durante el seguimiento		
Hospitalización (días), media ± DE	30,45±17,62	
Episodio de fiebre neutropénica	82	86,32
Episodio de toxicidad digestiva	83	87,37
Mucositis	61	64,21
Diarrea	70	73,68
Estancia en UCI	16	16,84
Reingreso hospitalario	62	65,26
EICHa		
Grado máximo alcanzado ≤2	42	72,41
Grado máximo alcanzado >2	16	27,59
Tiempo hasta grado máximo (días), mediana [RIQ]	41	[33–70]
Afectación gastrointestinal	19	32,76
EICHc		
Grado leve	10	27,03
Grado moderado/severo	27	72,97
Tiempo hasta grado máximo (días), mediana [RIQ]	179	[133–255]
Diagnóstico de episodio de infección por EMR	18	18,95
Bacteriemia por EMR	9	50,00
Estatus a los 360 días tras el alo-TPH		
Inmunosupresión activa (pacientes con ICN activo)	14	14,74
Tiempo con ICN activo (meses), mediana [RIQ]	4,73	[1,84–7,39]
Remisión	69	72,63
Recidiva	16	16,84
Exitus	21	22,11
Causa primaria del exitus		
EICH	7	33,33
Recurrencia de la enfermedad de base	6	28,57
Infección	6	28,57
Infección por EMR	1	4,76
Fallo orgánico	1	4,76
Seguimiento (meses), mediana [RIQ]	12,22	[7,10–12,25]

Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; HCT-CI, índice de comorbilidad específico para el trasplante de células hematopoyéticas; RIQ, rango intercuartílico; EBMT, Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula Ósea; DE, desviación estándar; DRI, índice de riesgo de enfermedad; HLA, antígeno leucocitario humano; EICH, enfermedad injerto contra huésped; ICN, inhibidor de calcineurina; MMF, micofenolato mofetilo; MTX, metotrexato; EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica.

¹Incluye: aplasia medular (2), mielofibrosis secundaria (1), otras entidades (3).

4.4.2. Perfil taxonómico de la microbiota

Para la caracterización del perfil taxonómico de la microbiota intestinal, en un primer paso se calculó la abundancia relativa media de cada taxón a nivel de filo y género en todo el conjunto de muestras y se seleccionaron los 10 taxones más abundantes (tabla 19). Posteriormente, se empleó un modelo GLMM con una distribución beta para evaluar los cambios en la abundancia relativa de dichos taxones a lo largo del tiempo. Para determinar si la variable visita tenía un efecto significativo a nivel global, se realizó una prueba de razón de verosimilitud comparando el modelo completo (con la variable “visita”) con un modelo nulo. Los valores obtenidos en este análisis se muestran en la tabla 20. Se llevaron a cabo comparaciones pareadas post-hoc entre las diferentes visitas mediante la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas con la corrección FDR.

Se observaron cambios estadísticamente significativos en la abundancia de diferentes taxones a lo largo del seguimiento del estudio (tabla 20 y figura 30).

Tabla 19. Abundancia relativa media de los taxones a nivel de filo y género más abundantes en las muestras de microbiota intestinal.

Filo	Abundancia media	Género	Abundancia media
<i>Firmicutes_A</i>	0,4335	<i>Streptococcus</i>	0,1189
<i>Firmicutes_D</i>	0,3016	<i>Blautia_A_141781</i>	0,1179
<i>Bacteroidota</i>	0,0964	<i>Enterococcus_B</i>	0,0596
<i>Actinobacteriota</i>	0,0625	<i>Escherichia_710834</i>	0,0376
<i>Proteobacteria</i>	0,0539	<i>Akkermansia</i>	0,0361
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,0355	<i>Bacteroides_H</i>	0,0347
<i>Firmicutes_C</i>	0,0137	<i>Bifidobacterium_388775</i>	0,0329
<i>Desulfobacterota_I</i>	0,0008	<i>Phocaeicola_A_858004</i>	0,0314
<i>Fusobacteriota</i>	0,0006	<i>Ruminococcus_B</i>	0,0263
<i>Synergistota</i>	0,0005	<i>Gemmiger_A_73129</i>	0,0258

Tabla 20. Abundancia relativa media de los filos y géneros más abundantes a lo largo del seguimiento del estudio.

	Basal	Día+14	Día+30	Día+60	Día+100	p-valor
Filo						
<i>Firmicutes_A</i>	0,5449	0,2985	0,3449	0,4446	0,5281	<0,001*
<i>Firmicutes_D</i>	0,1960	0,3676	0,4211	0,3087	0,2260	<0,001*
<i>Bacteroidota</i>	0,1158	0,1357	0,0553	0,0731	0,0953	0,012*
<i>Actinobacteriota</i>	0,0841	0,0586	0,0552	0,0523	0,0576	0,002*
<i>Proteobacteriota</i>	0,0269	0,0679	0,0619	0,0621	0,0557	0,494
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,0197	0,0530	0,0470	0,0441	0,0140	0,979
Género						
<i>Streptococcus</i>	0,0813	0,1164	0,1965	0,1027	0,1038	<0,001*
<i>Blautia_A_141781</i>	0,1555	0,0686	0,0846	0,1235	0,1559	<0,001*
<i>Enterococcus_B</i>	0,0292	0,1335	0,0673	0,0611	0,0040	0,365
<i>Escherichia_710834</i>	0,0206	0,0295	0,0434	0,0520	0,0472	0,913
<i>Akkermansia</i>	0,0200	0,0537	0,0475	0,0455	0,0143	0,990
<i>Bacteroides_H</i>	0,0378	0,0383	0,0243	0,0255	0,0476	0,083
<i>Bifidobacterium_388775</i>	0,0478	0,0243	0,0295	0,0297	0,0307	<0,001*
<i>Phocaeicola_A_858004</i>	0,0331	0,0639	0,0139	0,0227	0,0203	0,119
<i>Ruminococcus_B</i>	0,0311	0,0123	0,0374	0,0219	0,0292	0,013*
<i>Gemmiger_A_73129</i>	0,0257	0,0247	0,0287	0,0262	0,0235	0,179

*Valor estadísticamente significativo.

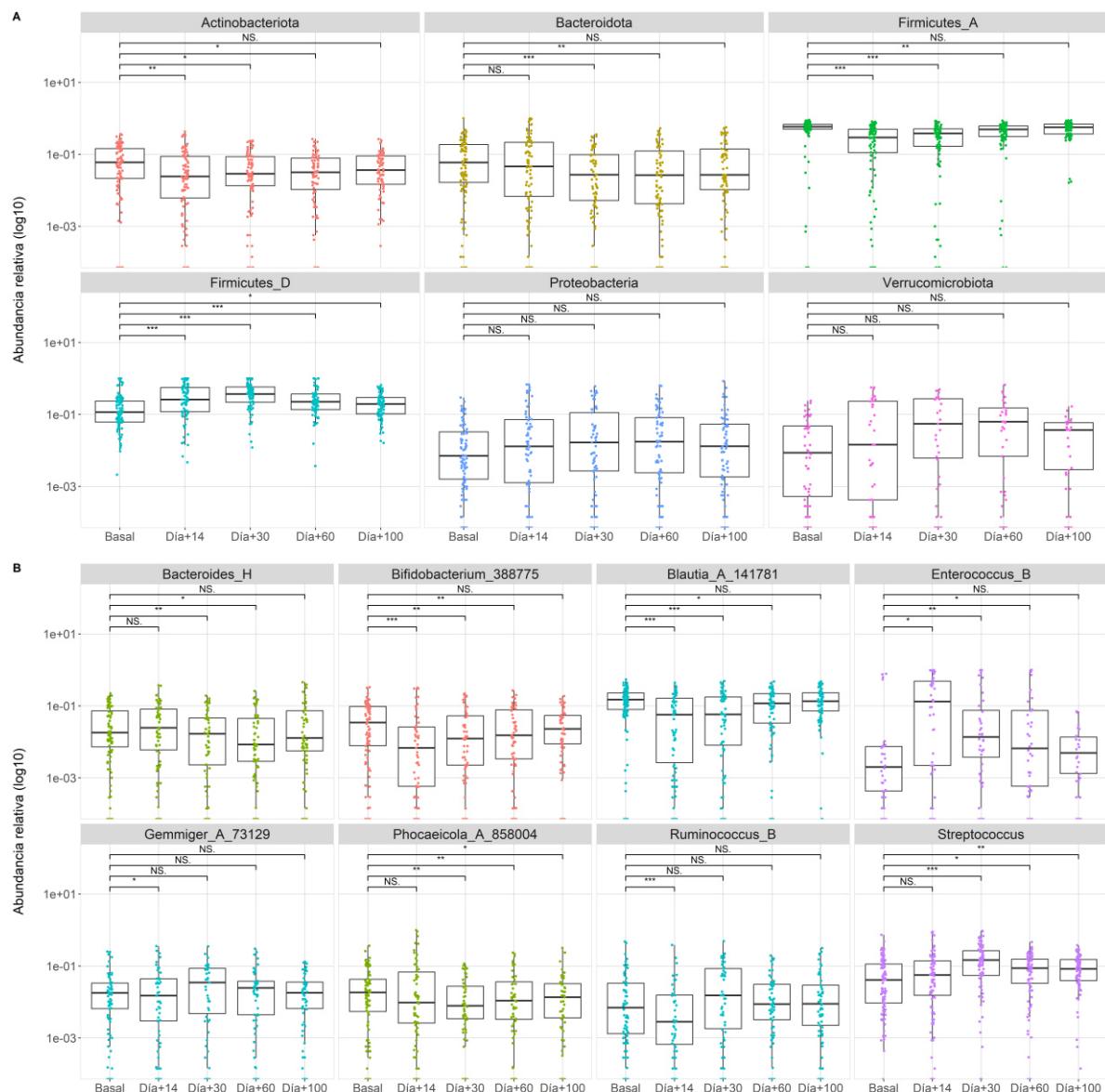


Figura 30. Abundancia relativa por visita de los taxones más abundantes a nivel de filo (A) y género (B).

La abundancia relativa se representa en escala logarítmica (log10). Los filos *Synergistota*, *Fusobacteriota*, *Desulfovacteriota* y *Firmicutes_C* no se han incluido por encontrarse en muy baja proporción. Los géneros *Escherichia* y *Akkermansia* no han sido incluidos por no encontrarse diferencias significativas en su abundancia durante el seguimiento.

***, p-valor<0,001; **, p-valor<0,01; *, p-valor>0,05; NS, no significativo.

4.4.2.1. Perfil taxonómico y colonización

Se analizaron los cambios en la abundancia relativa de los taxones más abundantes en función del estado de colonización intestinal por EMR de los pacientes (tabla 21). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los taxones evaluados a nivel de género. Sin embargo, a nivel de filo, se observó una abundancia

significativamente mayor de *Proteobacteria* en los pacientes colonizados frente a los no colonizados (media \pm DE= 0,0692 \pm 0,1435 vs. 0,0382 \pm 0,0893; p=0,015) y una abundancia menor de *Firmicutes_A* (0,3969 \pm 0,2588 vs. 0,4710 \pm 0,2213; p=0,017).

Tabla 21. Abundancia relativa media de los filos y géneros más abundantes en función del estado de colonización intestinal por EMR.

	No colonizados	Colonizados	p-valor
Filo			
<i>Firmicutes_A</i>	0,4710	0,3969	0,017*
<i>Firmicutes_D</i>	0,2688	0,3336	0,137
<i>Bacteroidota</i>	0,1035	0,0894	0,298
<i>Actinobacteriota</i>	0,0616	0,0633	0,661
<i>Proteobacteria</i>	0,0382	0,0692	0,015*
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,0420	0,0290	0,114
Género			
<i>Streptococcus</i>	0,1110	0,1265	0,853
<i>Blautia_A_141781</i>	0,1121	0,1236	0,144
<i>Enterococcus_B</i>	0,0508	0,0681	0,862
<i>Escherichia_710834</i>	0,0290	0,0459	0,111
<i>Akkermansia</i>	0,0428	0,0296	0,155
<i>Bacteroides_H</i>	0,0341	0,0353	0,865
<i>Bifidobacterium_388775</i>	0,0343	0,0316	0,320
<i>Phocaeicola_A_858004</i>	0,0324	0,0306	0,553
<i>Ruminococcus_B</i>	0,0346	0,0182	0,070
<i>Gemmiger_A_73129</i>	0,0318	0,0199	0,311

*Valor estadísticamente significativo.

4.4.3. Análisis de diversidad alfa

Se evaluó la diversidad alfa global en cada visita utilizando el índice inverso de Simpson, observándose una diversidad significativamente mayor en la visita basal (media \pm DE= 19,46 \pm 12,73) en comparación con los días +14 (8,69 \pm 6,78, p<0,001), +30 (10,34 \pm 6,97, p<0,001) y +60 (13,64 \pm 8,48, p=0,002) post-TPH. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el valor de la diversidad alfa al día +100 respecto a la basal (media \pm DE= 15,87 \pm 7,59, p=0,175) (figura 31). Con un p-valor global <0,001.

Resultados similares se encontraron empleando el índice de Shannon: visita basal (media \pm DE= 3,36 \pm 0,77) en comparación con los días +14 (2,46 \pm 0,90, p<0,001), +30

($2,72 \pm 0,79$, $p < 0,001$) y +60 ($3,03 \pm 0,80$, $p = 0,003$), sin observarse diferencias significativas en la visita al día +100 ($3,31 \pm 0,56$, $p = 0,244$).

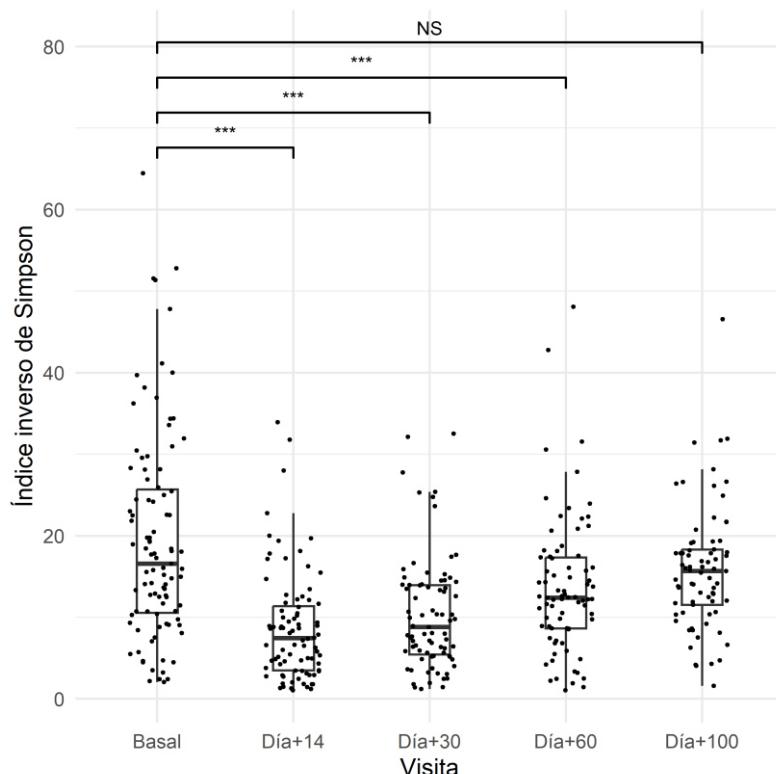


Figura 31. Análisis de alfa diversidad, según el índice inverso de Simpson, por visita.

***, p -valor < 0,001; **, p -valor < 0,01; *, p -valor > 0,05; NS, no significativo.

4.4.3.1. Análisis de diversidad basal y durante el periodo de neutropenia

A continuación, se analizó la diversidad alfa según el índice inverso de Simpson en el subconjunto de muestras pretrasplante y el subconjunto de neutropenia (muestras recogidas desde el momento post-TPH hasta el día 17,67), correlacionándolas con variables clínicas observadas en pacientes con alo-TPH durante el trasplante y el seguimiento.

Se examinó la diversidad alfa de las 95 muestras de heces recogidas antes del trasplante. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas basadas en el hospital donde se realizó el trasplante (media \pm DE = $18,29 \pm 11,97$ en el HUMV, $29,11 \pm 15,67$ en el HUCA y $15,50 \pm 7,77$ en el HUSAL, $p = 0,064$), ni por sexo (mujer: $20,10 \pm 14,40$ vs. hombre: $19,10 \pm 11,80$, $p = 0,886$), enfermedad de base ($p = 0,462$), número de líneas de tratamiento

previas recibidas ($p=0,099$) o puntuaciones de riesgo teniendo en cuenta el HCT-CI score ($p=0,535$) y EBMT score ($p=0,458$). Sin embargo, los pacientes que habían experimentado un episodio de infección en los 3 meses previos ($13,75\pm8,68$ vs. $22,36\pm13,51$), un episodio previo de bacteriemia ($11,87\pm7,56$ vs. $20,88\pm13,03$) o habían recibido tratamiento antibiótico previo ($16,08\pm10,25$ vs. $22,91\pm14,13$) mostraron una diversidad significativamente menor en comparación con aquellos que no lo presentaron ($p=0,002$, $0,008$, $0,018$, respectivamente).

Respecto a las variables relacionadas con la evolución clínica de los pacientes, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad alfa basal de las muestras de pacientes que experimentaron EICHa (media \pm DE= $18,97\pm11,99$ vs. $20,23\pm13,95$), EICHa gastrointestinal (EICHa-GI) ($18,27\pm9,26$ vs. $20,23\pm13,95$) o EICHc ($19,31\pm10,21$ vs. $19,55\pm14,19$) y aquellos que no la experimentaron ($p=0,858$, $0,983$ y $0,564$, respectivamente); episodios de infección ($p=0,758$) o episodios de bacteriemia ($p=0,638$), ni episodios de infección ($p=0,861$) o bacteriemia por EMR ($p=0,638$). Del mismo modo, no se observó una diferencia significativa en la diversidad alfa entre las muestras de pacientes que experimentaron recaída de su enfermedad de base en comparación con aquellos que no la experimentaron ($23,04\pm14,95$ vs. $18,73\pm12,20$, $p=0,358$), ni en aquellos que fallecieron durante el seguimiento ($18,44\pm13,39$ vs. $19,75\pm12,62$, $p=0,533$).

Respecto al análisis de la diversidad durante el periodo de neutropenia, se realizó un análisis en 79 muestras de 77 pacientes recogidas desde el trasplante hasta 18 días después del TPH, un periodo caracterizado por neutropenia y típicamente asociado con una disminución de la diversidad de la microbiota intestinal. El objetivo fue correlacionar esta disminución de la diversidad con variables específicas peri-trasplante y resultados posteriores del paciente. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la diversidad alfa de estas muestras y la evolución de los pacientes, en términos de supervivencia (media \pm DE= $9,55\pm7,86$ en los pacientes que sobrevivieron en comparación con $7,16\pm3,47$ en los que no, $p=0,506$) ni en otras características clínicas estudiadas como episodios de EICHa ($p=0,768$), EICHa-GI ($p=0,674$), EICHc ($0,822$), episodios de fiebre neutropénica ($0,601$), infección ($p=0,357$) o bacteriemia ($0,795$), ni episodios de infección o bacteriemia por EMR ($p=0,415$ y $p=0,392$, respectivamente).

Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la alfa diversidad en este periodo de aquellos pacientes que presentaron colonización intestinal

por EMR post-TPH en comparación con aquellos que no (media \pm DE= 7,06 \pm 6,05 vs. 10,66 \pm 7,75, p=0,010).

4.4.3.2. Análisis de supervivencia en función de la diversidad

Para estudiar la supervivencia en función de la diversidad en el momento previo al trasplante y durante el periodo de neutropenia, se calculó la mediana de la diversidad alfa en dichos momentos (mediana=16,547 y 8,055, respectivamente) y la población de estudio se estratificó en dos grupos: aquellos con baja diversidad basal (diversidad alfa \leq mediana) y aquellos con alta diversidad (diversidad alfa $>$ mediana).

Durante el periodo de seguimiento, el 22,92% (11/48) de los pacientes con baja diversidad basal falleció en comparación con el 21,28% (10/47) de los pacientes con alta diversidad basal. La supervivencia global estimada fue del 78,72% \pm 5,97% (error estándar [EE]) en el grupo de mayor diversidad y del 76,16% \pm 6,29% en el grupo de menor diversidad. Aunque la mortalidad fue mayor entre aquellos con menor diversidad basal, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0,798).

En el caso del periodo de neutropenia, el 25,00% (10/40) de los pacientes con baja diversidad falleció en comparación con el 16,22% (6/37) de los pacientes con alta diversidad (supervivencia global estimada: 74,68% \pm 6,93% vs. 83,78% \pm 6,06%; p=0,296). La figura 32 representa las curvas de supervivencia estratificadas en función de la diversidad de la microbiota intestinal en dichos periodos.

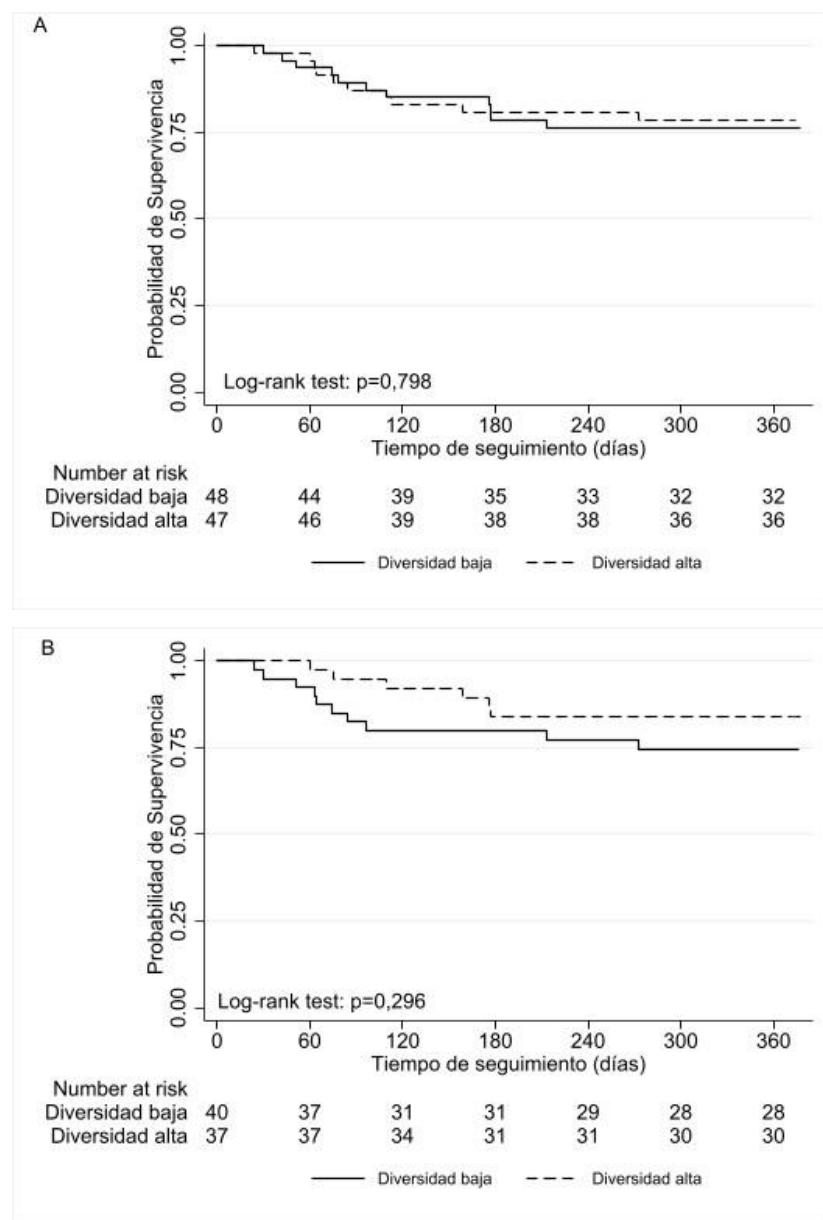


Figura 32. Curva de supervivencia global en función de la diversidad de la microbiota intestinal en la visita basal (A) y durante el periodo de neutropenia (B).

La línea continua representa los datos de los pacientes con diversidad baja y la línea discontinua a los pacientes con diversidad alta.

4.4.3.3. Diversidad alfa y colonización

Se evaluó la diversidad alfa global en función del estado de colonización intestinal por EMR utilizando el índice inverso de Simpson. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la alfa diversidad de los pacientes colonizados frente a los que no lo estaban ($p=0,226$), pero sí en el caso de los pacientes que presentaron colonización en el momento pretrasplante (media \pm DE= $9,88\pm5,84$ vs. $18,46\pm11,03$;

$p=0,011$). En la figura 33 se observan las diferencias en la alfa diversidad de los pacientes en función del estado de colonización que presentaban en cada visita de seguimiento, para ello se ha tenido en cuenta la primera visita en la que se detectó el estado de colonización intestinal por EMR.

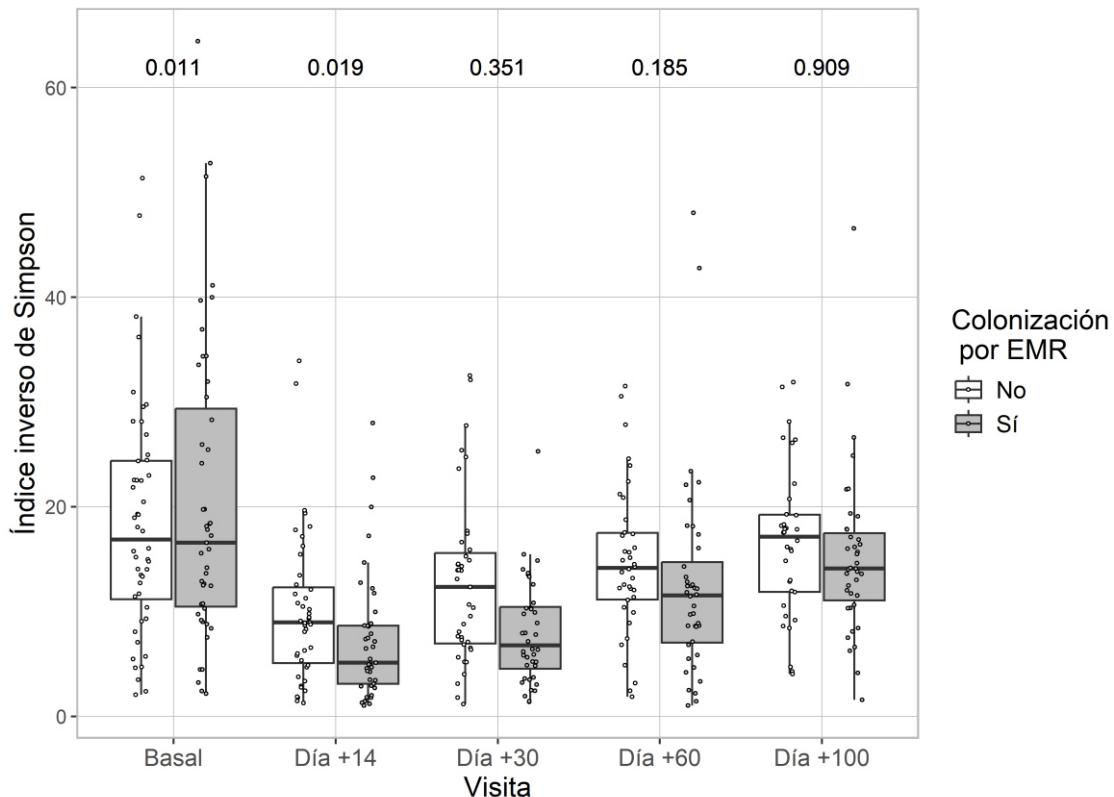


Figura 33. Alfa diversidad de la población de estudio en función de su estado de colonización durante el seguimiento.

En cada visita se muestran los datos de la diversidad alfa de las muestras de los pacientes no colonizados frente a la de los pacientes en los que se detectó el estatus de colonizados por primera vez en ese periodo.

EMR, enterobacteria multirresistente.

4.4.4. Análisis de diversidad beta

Se realizó un análisis de PCoA basado en las distancias de Bray-Curtis entre los perfiles microbianos a nivel de género presentados en la visita basal, con el objetivo de buscar asociaciones entre estos perfiles y características relacionadas con peores resultados, como haber tenido un episodio de EICHa-GI, un episodio de bacteriemia o fallecer durante el seguimiento. Este análisis no mostró separación entre los grupos de muestras para ninguna de las variables estudiadas (prueba de adonis, $p=0,856$, $0,481$ y $0,224$,

respectivamente). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la diversidad beta en las visitas basales entre pacientes con y sin tratamiento antibiótico previo ($p=0,023$) (figura 34) y entre pacientes con baja y alta diversidad basal ($p=0,001$).

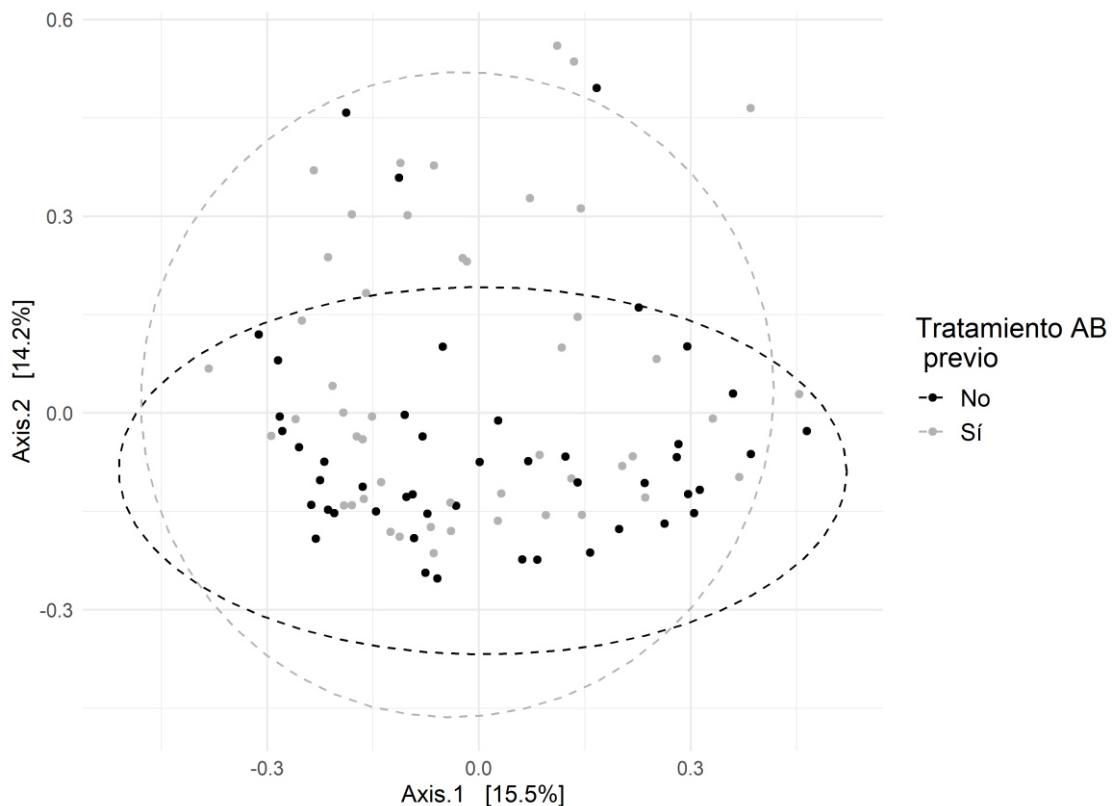


Figura 34. Análisis de beta diversidad de las muestras pretrasplante en función de haber recibido tratamiento antibiótico durante los 3 meses previos.
AB, antibiótico.

Se realizó el mismo análisis durante el periodo de neutropenia. Se encontraron diferencias significativas en las muestras de pacientes que experimentaron bacteriemia durante el seguimiento ($p=0,017$) (figura 35) y entre aquellos clasificados como de baja vs. alta diversidad durante este periodo ($p=0,001$). Pero no hubo diferencias en los pacientes que presentaron un EICHa-GI ($p=0,997$) o fallecieron ($p=0,447$) frente a los que no.

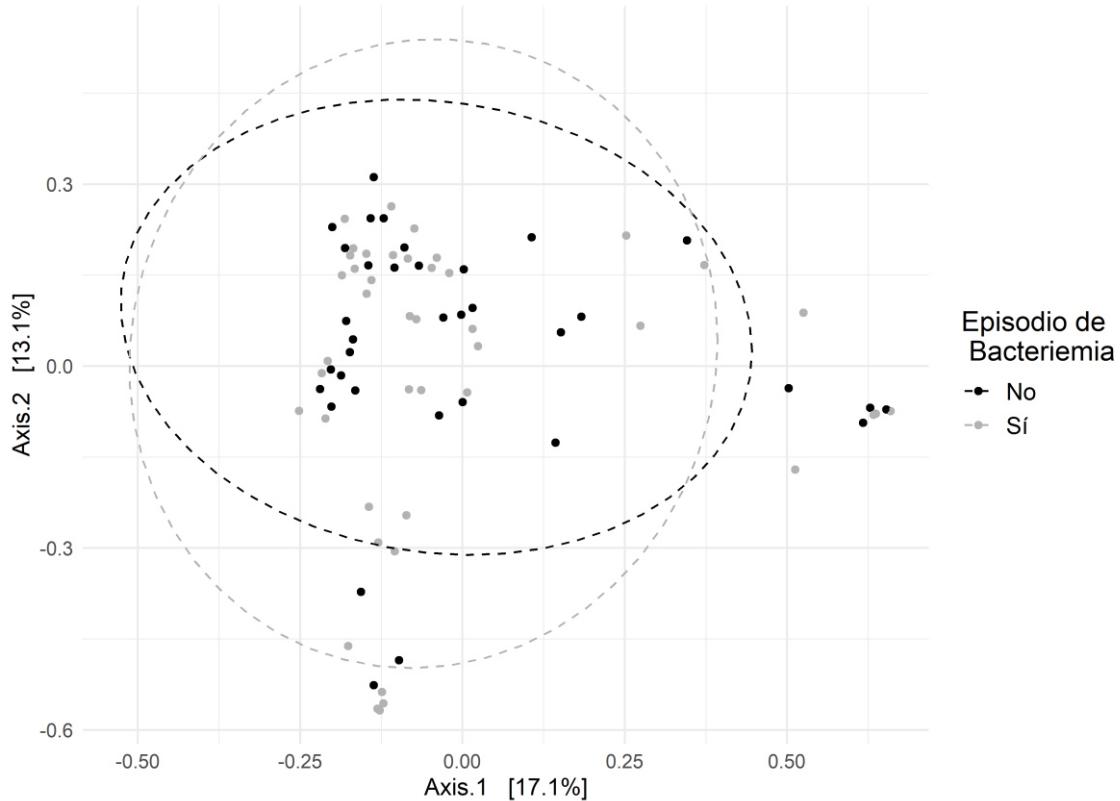


Figura 35. Análisis de beta diversidad durante el periodo de neutropenia en relación con el episodio de bacteriemia.

4.4.4.1. Diversidad beta y colonización

En el análisis de diversidad beta se observaron diferencias significativas en la composición de las muestras basales de los pacientes en función de su estado de colonización en el momento pretrasplante ($p=0,003$). Si bien, no hubo diferencias al comparar la composición de los pacientes con colonización post-TPH ($p=0,520$) ni en aquellos que posteriormente presentaron un episodio de infección por EMR ($p=0,126$).

En el análisis de las muestras recogidas en el periodo de neutropenia, no se observaron diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre los pacientes en función de su estado de colonización post-TPH ($p=0,141$), ni en el desarrollo o no de un episodio de infección por EMR ($p=0,377$).

4.4.5. Análisis de abundancia diferencial

Se realizó un análisis LEfSe para identificar taxones que pudieran servir como marcadores diferenciales entre los pacientes que fallecieron durante el seguimiento y aquellos que sobrevivieron (figura 36). Utilizando una puntuación LDA de 2 y un umbral de valor p de 0,05, se identificaron veintidós marcadores. Se seleccionaron los taxones que exhibieron las señales más fuertes para explorar la asociación entre su abundancia y la evolución clínica de los pacientes, específicamente episodios de EICHa-GI, episodios de bacteriemia y mortalidad. Los géneros incluidos fueron *Blautia*, *Enterococcus_H*, *Enterococcus_A*, *Ruminococcus*, *Gemmiger*, *Akkermansia* y *Staphylococcus* (figura 37).

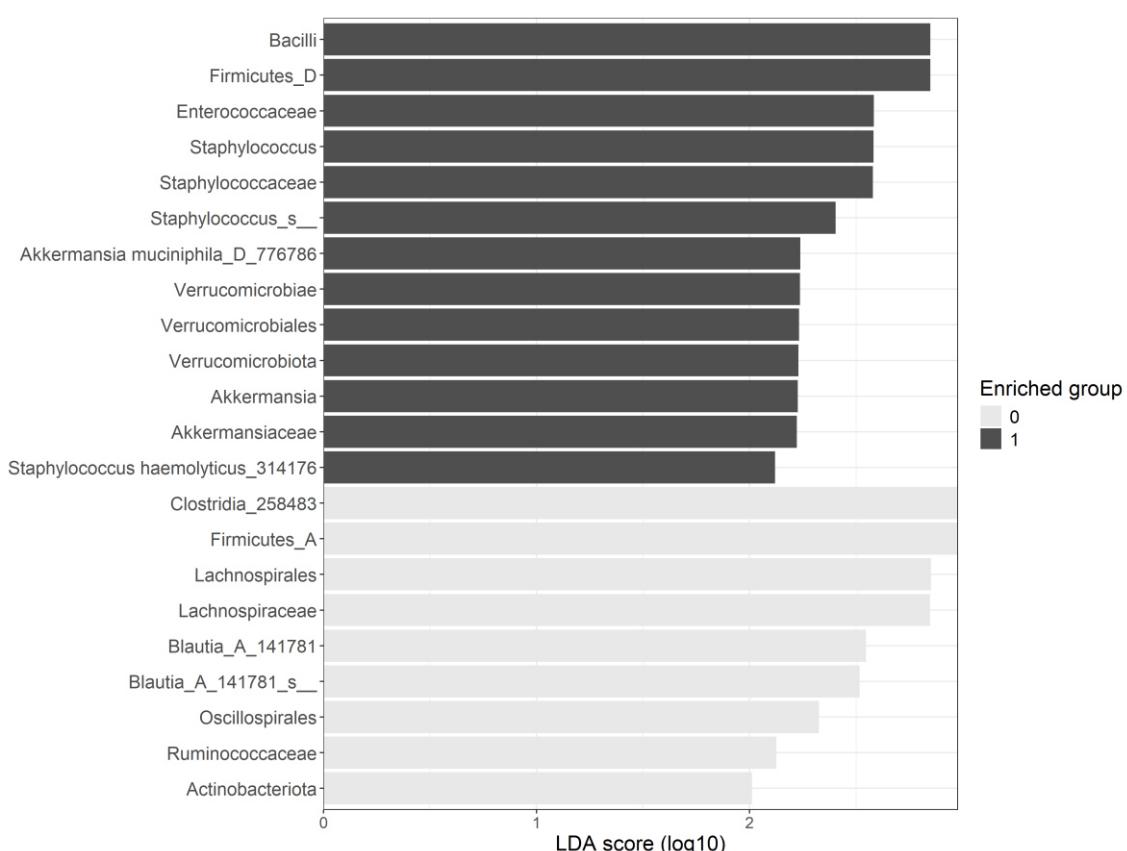


Figura 36. Análisis de abundancia diferencial entre los pacientes fallecidos (0) y los que sobrevivieron (1).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de los distintos géneros en función de la gravedad del episodio de EICHa-GI, a excepción de *Enterococcus_A*, que fue mayor en pacientes con grado >2 en comparación con aquellos con grado ≤ 2 o sin EICHa-GI ($p=0,013$). Por el contrario, la abundancia de *Gemmiger* fue menor en pacientes con EICHa-GI de grado >2 ($p=0,043$) (figura 37A).

Los pacientes con bacteriemia exhibieron abundancias relativas significativamente mayores de *Enterococcus_H* y *Staphylococcus* ($p=0,043$ y $p=0,009$, respectivamente). La abundancia de *Ruminococcus* fue mayor en pacientes sin bacteriemia, lo que sugiere un posible efecto protector ($p<0,001$) (figura 37B).

Los pacientes que fallecieron durante el seguimiento del estudio mostraron una mayor abundancia de posibles patógenos *Enterococcus_H* (media=0,015 vs. 0,009, $p=0,026$), *Enterococcus_A* (0,008 vs. 0,001, $p=0,019$) y *Staphylococcus* (0,027 vs. 0,005, $p=0,009$). Del mismo modo, la abundancia de *Akkermansia* también fue mayor en los pacientes que no sobrevivieron (0,054 vs. 0,032, $p=0,017$). Por el contrario, los supervivientes mostraron una abundancia significativamente mayor de *Gemmiger* (0,028 vs. 0,017, $p<0,001$) (figura 37C).

Centrándonos en la abundancia de *Blautia*, la figura 37 muestra niveles más bajos en pacientes con EICHa-GI de grado 2 o superior (media \pm DE= 0,132 \pm 0,130 en pacientes sin EICHa-GI, 0,108 \pm 0,112 en EICHa-GI de grado ≤ 2 y 0,069 \pm 0,090 en EICHa-GI de grado > 2 , $p=0,009$), bacteriemia (0,131 \pm 0,121 en pacientes sin bacteriemia vs. 0,108 \pm 0,121 en aquellos con bacteriemia, $p=0,014$) o muerte (0,127 \pm 0,126 en pacientes que sobrevivieron vs. 0,076 \pm 0,090 en aquellos que fallecieron, $p<0,001$).

Para corroborar esta asociación, se realizó un análisis multivariable ajustado por edad, sexo, intensidad del acondicionamiento, fuente de progenitores, puntuación HCT-CI score y tratamiento antibiótico previo a la recogida de cada una de las muestras de microbiota intestinal. Para ello se utilizó un modelo lineal generalizado ajustado según la prueba AIC con una selección por pasos hacia atrás para el análisis multivariable de cada uno de los resultados clínicos: A) Presencia de un episodio de EICHa-GI; B) Episodio de bacteriemia durante el seguimiento; C) Exitus (figura 38).

Los resultados siguieron siendo significativos después del ajuste tanto para la EICHa-GI (OR: 0,046; IC del 95%: 0,003 a 0,508) como para la mortalidad (OR: 0,010; IC del 95%: 0,000 a 0,234). Aunque no se alcanzó significación estadística para la bacteriemia, se mantuvo la tendencia observada (OR: 0,448; IC del 95%: 0,037 a 5,427) (figura 38).

En el caso del desarrollo de EICHa-GI (figura 38A), la abundancia relativa de *Blautia* se correlacionó inversamente con la presencia de EICHa-GI durante el seguimiento ($p=0,015$), lo que sugiere un papel protector de *Blautia* contra el desarrollo de este tipo

de eventos. También se observó una correlación negativa entre el sexo femenino ($p=0,045$) y una puntuación baja en el HCT-CI ($p=0,017$) con la presencia de EICHa-GI. Por el contrario, el acondicionamiento no mieloablativo se asoció positivamente con la EICHa-GI ($p=0,003$).

Con respecto a los episodios de bacteriemia (figura 38B), aunque no se alcanzó la significación estadística, se observó una correlación inversa entre la abundancia de *Blautia* y la presencia de bacteriemia ($p=0,527$). La interacción entre la abundancia de *Blautia* y la exposición previa a antibióticos, aunque no significativa ($p=0,145$), sugiere un efecto diferente de la abundancia de *Blautia* dependiendo del tratamiento antibiótico previo, lo que justifica un análisis más profundo.

En cuanto al efecto de la abundancia de *Blautia* en la mortalidad de los pacientes (figura 38C), se observó una correlación inversa, lo que indica un efecto protector de *Blautia* ($p=0,007$), similar al sexo femenino ($p=0,017$) y a una puntuación baja en el HCT-CI ($p=0,025$). Por el contrario, el acondicionamiento no mieloablativo y la fuente de células de sangre periférica se asociaron positivamente con la mortalidad.

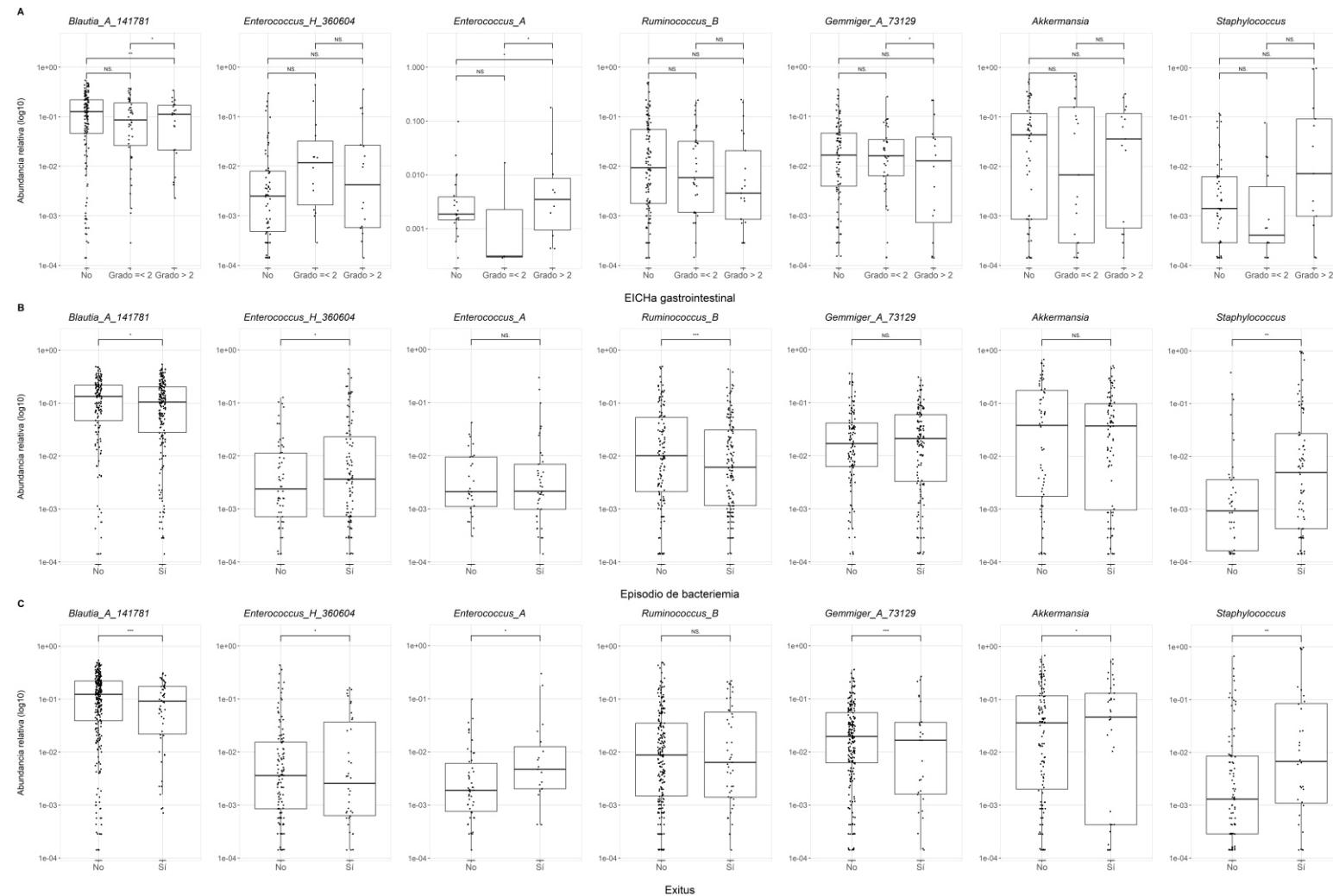


Figura 37. Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en relación con características de los pacientes asociadas a peor evolución.

***, p-valor<0,001; **, p-valor<0,01; *, p-valor>0,05; NS, no significativo; EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda.

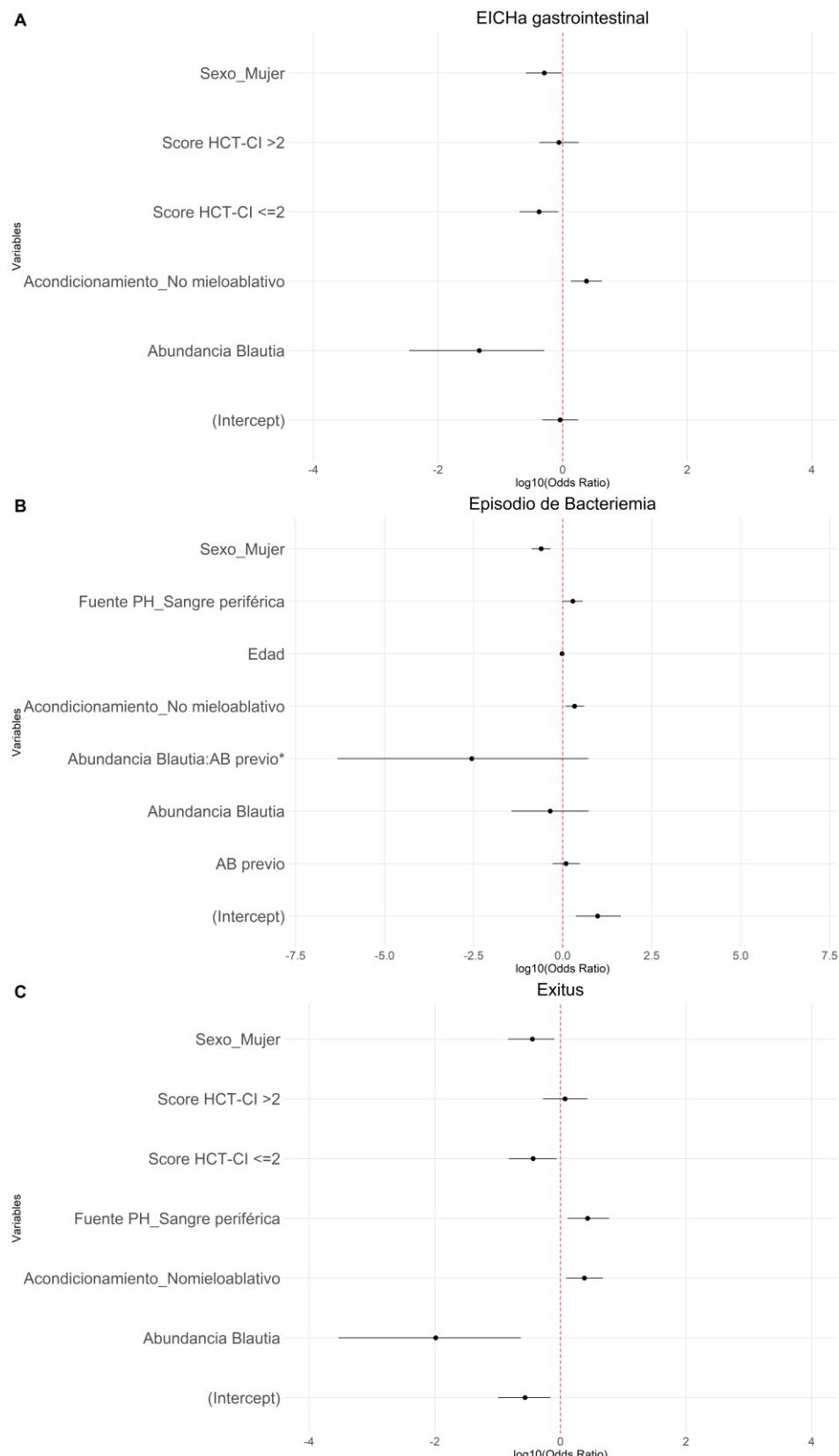


Figura 38. Asociación de la abundancia de *Blautia* con la evolución clínica de los pacientes.
Las OR y los intervalos de confianza se representan en una escala logarítmica de base 10.

EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; HCT-CI, índice de comorbilidad específico para el trasplante de células hematopoyéticas; PH, progenitores hematopoyéticos; AB, antibiótico.

*Abundancia Blautia:AB previo, representa el término de interacción entre ambas variables.

4.4.5.1. Abundancia diferencial y colonización

Para evaluar si existía algún taxón que se expresara de forma diferencial en los pacientes colonizados frente a los no colonizados, se llevó a cabo un análisis LEfSE en función de esta variable, empleando los mismos parámetros que en el análisis realizado anteriormente: una puntuación LDA de 2 y un umbral de p-valor de 0,05, identificándose veintidós marcadores (figura 39).

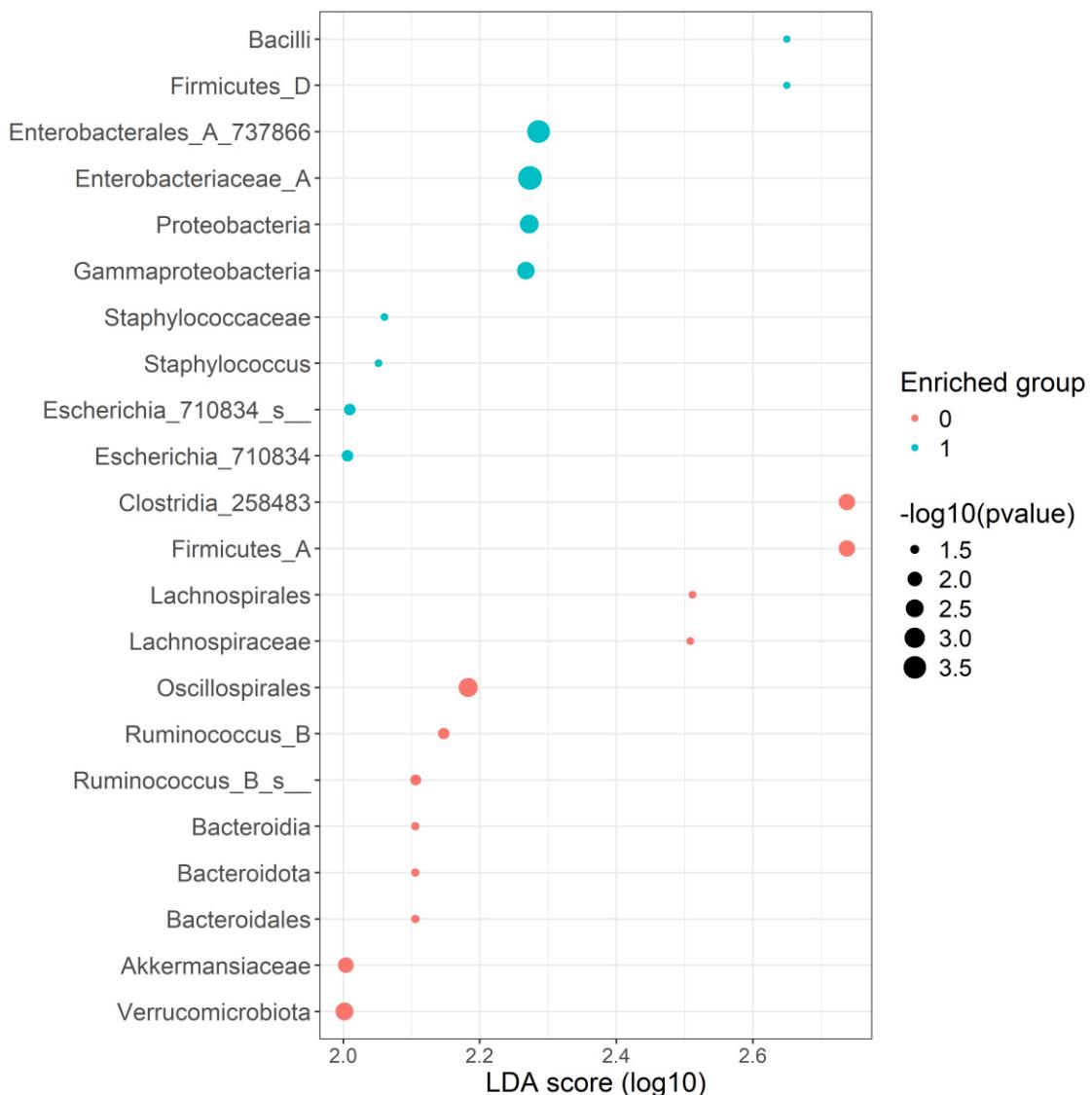


Figura 39. Análisis de abundancia diferencial en función del estado de colonización intestinal por EMR (0 (rojo), no colonizados; 1 (turquesa), colonizados).
 El eje horizontal representa la magnitud de la diferencia en la abundancia y el eje vertical enumera los diferentes taxones. La significación estadística de la diferencia en la abundancia de un taxón se representa mediante el tamaño del punto en escala $-\log_{10}(p\text{-valor})$.

Tras la normalización de los datos para un análisis más preciso, no se identificó ningún marcador diferencial entre ambos grupos. No obstante, observando el resultado previo, se quiso evaluar el efecto de la abundancia de los taxones pertenecientes al orden *Enterobacteriales* y, concretamente, del género *Escherichia*, en la evolución de los pacientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de estos taxones entre los pacientes que presentaron eventos de EICHa-GI ($p=0,339$ y $0,260$, respectivamente), episodios de bacteriemia ($p=0,288$ y $0,450$), episodio de infección por EMR ($p=0,402$ y $0,261$) o que fallecieron ($p=0,842$ y $0,343$) durante el seguimiento y los que no (figura 40).

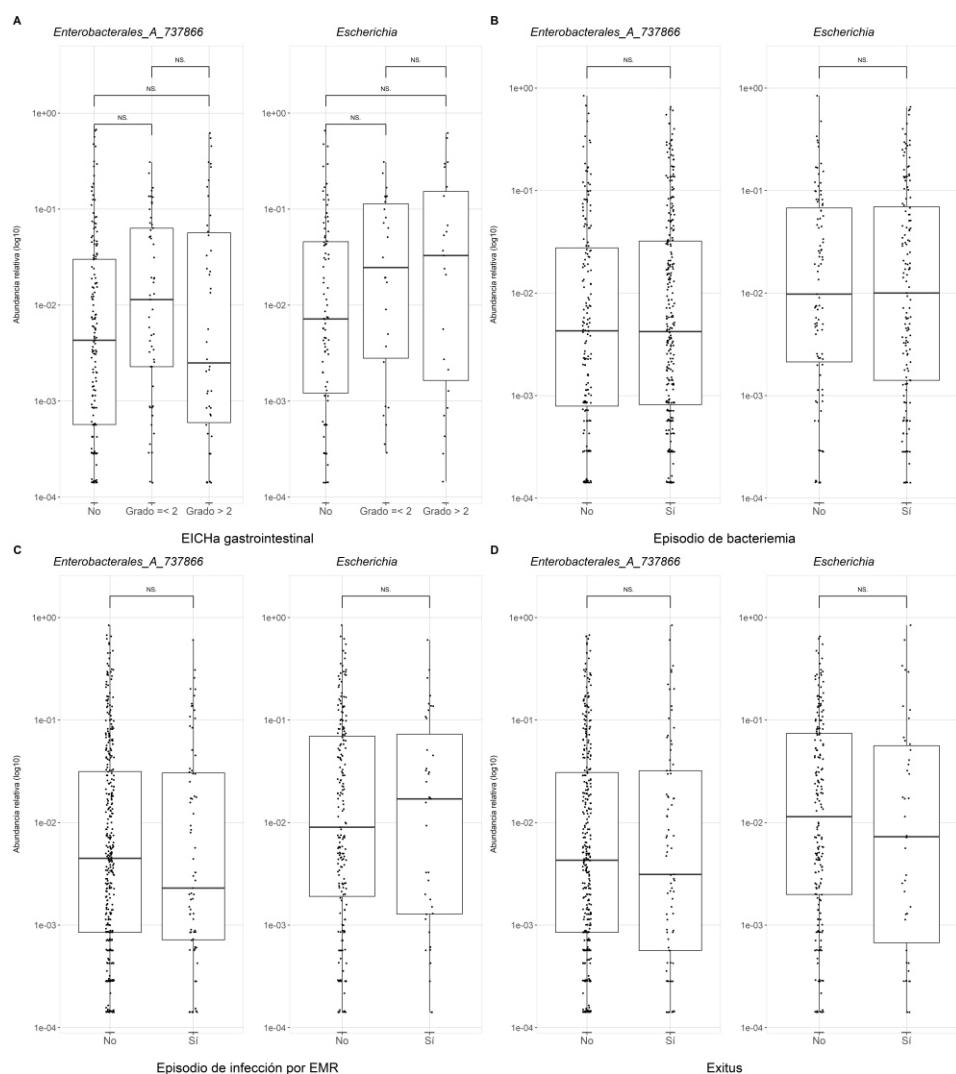


Figura 40. Abundancia relativa de *Enterobacteriales* y *Escherichia* en relación con características de los pacientes asociadas a peor evolución.

***, p-valor<0,001; **, p-valor<0,01; *, p-valor>0,05; NS, no significativo. EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EMR, enterobacterias multirresistentes.

Respecto al papel de *Blautia*, se analizó su abundancia en función del estado de colonización teniendo en cuenta la primera visita en la que se detectó dicha colonización. Los resultados mostraron una abundancia relativa media significativamente mayor en los pacientes no colonizados en el momento basal (media \pm DE= 0,1350 \pm 0,0967 vs. 0,0698 \pm 0,0674) y a los 14 días post-TPH (0,0882 \pm 0,1076 vs. 0,0401 \pm 0,1066) en comparación con los pacientes colonizados (figura 41).

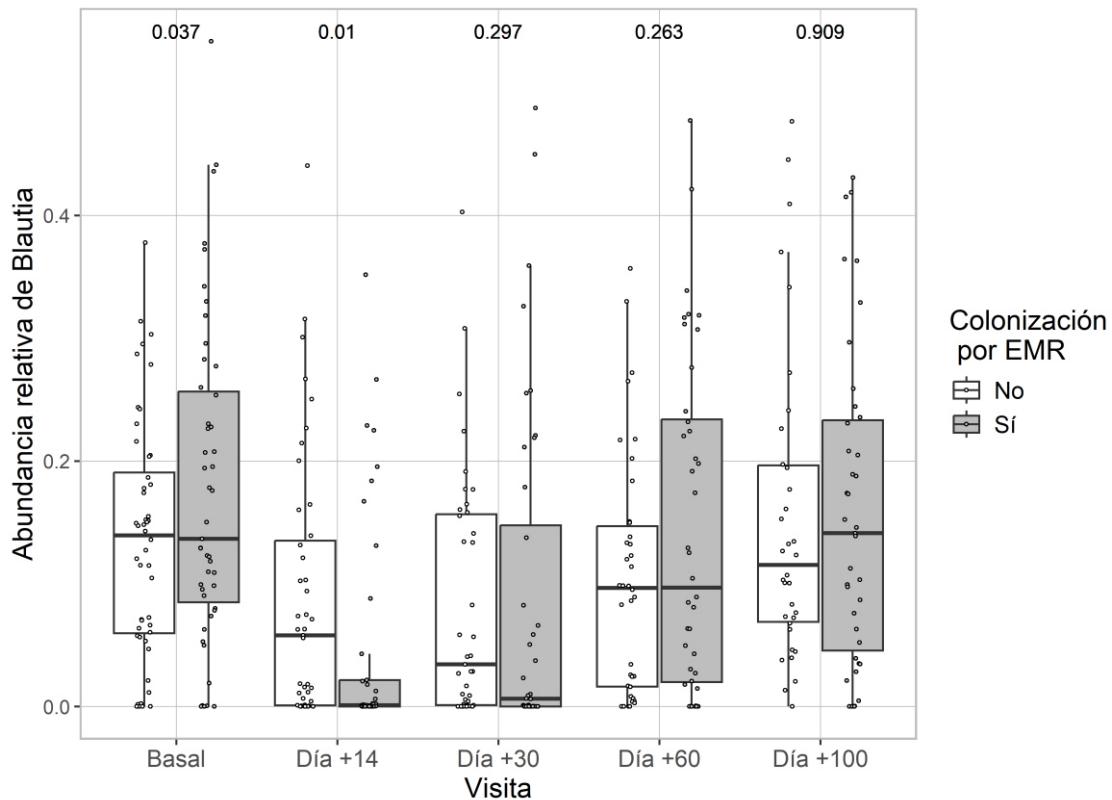


Figura 41. Abundancia relativa de *Blautia* por visita en función del estado de colonización intestinal por EMR.

En cada visita se muestran los datos de la abundancia relativa de *Blautia* de las muestras de los pacientes no colonizados frente a la de los pacientes en los que se detectó el estatus de colonizados por primera vez en ese periodo.

EMR, enterobacterias multirresistentes.

4.4.6. Tratamiento antibiótico y microbiota intestinal

Para conocer el impacto del uso del tratamiento antibiótico en la diversidad de la microbiota intestinal, se realizó una revisión del tratamiento recibido por los pacientes en los 30 días previos a la recogida de la muestra de microbiota basal y en los 7 días anteriores a cualquier recogida de muestra de heces durante el seguimiento post-TPH del

estudio. De las 409 muestras de microbiota intestinal analizadas, 84 (20,54%) se obtuvieron de pacientes que habían recibido tratamiento antibiótico antes de la toma de la muestra. Estas muestras incluyeron 4 muestras basales y 80 muestras de seguimiento (58 de la visita 2 (día +14), 11 del día +30, 7 del día +60, 4 del día +100 post-TPH).

Aunque la diferencia en la diversidad alfa basada en la exposición a antibioterapia antes de la recogida de la muestra de heces fue estadísticamente significativa en el conjunto total de muestras ($\text{media} \pm \text{DE} = 9,63 \pm 8,01$ vs. $14,80 \pm 9,93$, $p < 0,001$), estos hallazgos no se confirmaron al tener en cuenta en el análisis multivariable la visita en la que se recogió la muestra ($p = 0,831$). En la figura 42 se muestran las diferencias en la alfa diversidad de las muestras en función de si habían recibido tratamiento antibiótico previo a su recogida. Se observaron resultados significativos en las visitas del día +60 y +100 post-TPH, probablemente debido a la gran diferencia entre en el número de muestras expuestas a tratamiento antibiótico previo (7 y 4 muestras, respectivamente) frente a las muestras que no estuvieron expuestas (71 y 69 muestras, respectivamente).

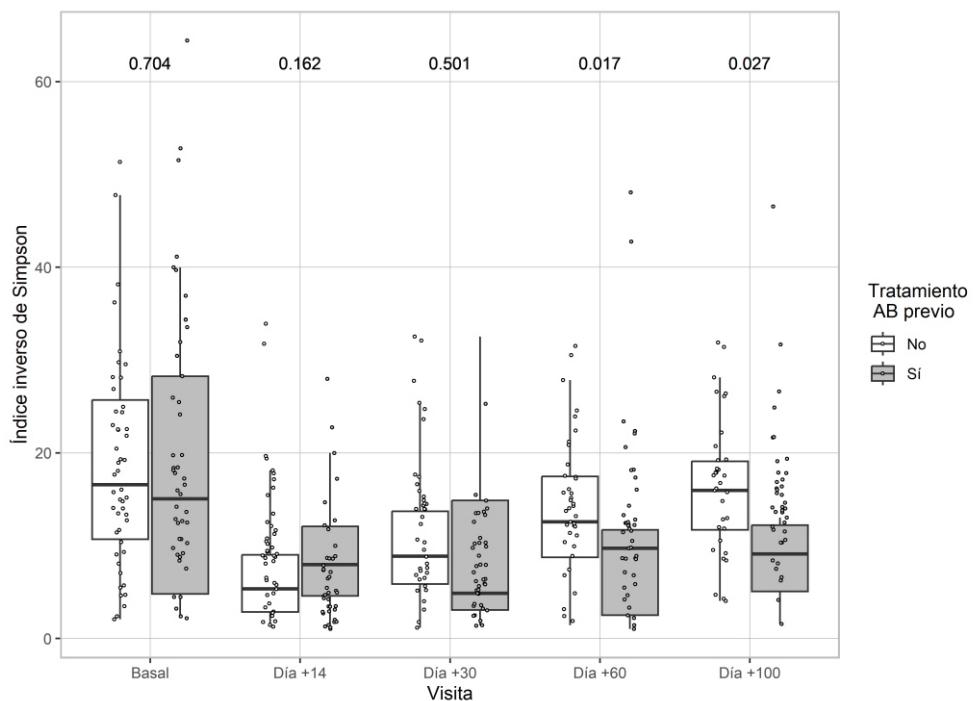


Figura 42. Alfa diversidad de la microbiota intestinal por visita en función de la exposición a antibioterapia antes de la recogida de la muestra.

AB, antibiótico.

4.4.7. Ánalisis de microbiota intestinal al año postrasplante

Para caracterizar la composición de la microbiota intestinal hasta el año postrasplante se llevó a cabo un análisis de las 159 muestras pertenecientes a los 25 pacientes que participaron en el estudio NVAL21/18. Un breve resumen de las características de esta cohorte se presenta en la tabla 22.

Tabla 22. Características de la población incluida en el estudio de microbiota intestinal hasta el año post-TPH (n=25).

Características de la población de estudio	n	%
Características basales y del trasplante		
Sexo		
Hombre	15	60,00
Mujer	10	40,00
Edad en el momento del alo-TPH (años), mediana [rango]	59,55	[18,31–73,16]
Tipo de enfermedad de base		
Leucemia mieloide aguda	2	8,00
Leucemia linfoblástica aguda	6	24,00
Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	6	24,00
Otras	11	44,00
Fuente de progenitores hematopoyéticos		
Sangre periférica	18	72,00
Tipo de acondicionamiento		
Mieloablativo	16	64,00
No mieloablativo	9	36,00
Profilaxis antibiótica		
Colonización intestinal por EMR	6	24,00
Colonización intestinal por EMR		
Clínica de los pacientes durante el seguimiento		
Episodio de EICHa	16	64,00
Episodio de EICHc	6	24,00
Diagnóstico de episodio de infección por EMR	5	20,00
Bacteriemia por EMR	1	20,00
Estatus a los 360 días tras el alo-TPH		
Inmunosupresión activa (pacientes con ICN activo)	5	20,00
Tiempo con ICN activo (meses), mediana [RIQ]	6,24	[4,14–8,28]
Remisión	19	76,00

Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; EMR, enterobacterias multirresistentes; EICHa, enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica; ICN, inhibidor de calcineurina; RIQ, rango intercuartílico.

4.4.7.1. Caracterización del perfil taxonómico

En cuanto al perfil taxonómico, se observaron variaciones en los taxones a nivel de género que presentaban mayor abundancia relativa media respecto a la cohorte global analizada hasta los 100 días post-TPH, mientras que la distribución de los principales taxones a nivel de filo se mantuvo (tabla 23, tabla 24 y figura 43). Tras un análisis lineal generalizado mixto, en el que se incluyó el efecto de evaluar muestras pareadas, aquellos filos y géneros en los que se encontraron variaciones significativas de abundancia a lo largo del seguimiento se representan en la figura 44. Observamos que la mayoría de las variaciones significativas se concentran en los 100 primeros días post-TPH.

En la figura 45 se representa la trayectoria individual de la abundancia taxonómica de cada paciente correspondiente a la muestra pretrasplante y a la muestra del mes 12 post-TPH, lo que permite una mejor visualización de los cambios en la abundancia de cada taxón en cada paciente en dichas visitas. Como se ha comentado previamente, no se encontraron diferencias significativas entre ambas visitas, pero si se observó una alta varianza inter-paciente, especialmente a nivel de género.

Tabla 23. Abundancia relativa media de los taxones a nivel de filo y género más abundantes en las muestras de microbiota intestinal hasta el año post-TPH.

Filo	Abundancia media	Género	Abundancia media
<i>Firmicutes_A</i>	0,4410	<i>Blautia_A_141781</i>	0,0965
<i>Firmicutes_D</i>	0,2270	<i>Streptococcus</i>	0,0865
<i>Bacteroidota</i>	0,2021	<i>Bacteroides_H_B</i>	0,0770
<i>Actinobacteriota</i>	0,0470	<i>Phocaeicola_A_858004</i>	0,0622
<i>Proteobacteria</i>	0,0391	<i>Enterococcus_B</i>	0,0480
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,0278	<i>Bifidobacterium_388775</i>	0,0315
<i>Firmicutes_C</i>	0,0127	<i>Parabacteroides_B_862066</i>	0,0315
<i>Desulfobacterota_I</i>	0,0014	<i>Faecalibacterium</i>	0,0315
<i>Firmicutes_B_370539</i>	0,0010	<i>Lactobacillus</i>	0,0311
<i>Synergistota</i>	0,0003	<i>Akkermansia</i>	0,0282

Tabla 24. Abundancia relativa media por visita de los filos y géneros más abundantes en las muestras de microbiota intestinal hasta el año post-TPH.

	Basal	Día+14	Día+30	Día+60	Día+100	Día+180	Mes+9	Mes+12	p-valor
Filo									
<i>Firmicutes_A</i>	0.5548	0.2919	0.3377	0.4109	0.4685	0.4727	0.5077	0.5224	<0,001*
<i>Firmicutes_D</i>	0.1119	0.3161	0.4288	0.2732	0.2199	0.1568	0.1219	0.1119	<0,001*
<i>Bacteroidota</i>	0,2271	0,2251	0,1007	0,1584	0,1997	0,2543	0,2662	0,2428	0,017*
<i>Actinobacteriota</i>	0,0449	0,0434	0,0552	0,0438	0,0406	0,0408	0,0532	0,0523	0,790
<i>Proteobacteria</i>	0,0346	0,0687	0,0287	0,0499	0,0347	0,0123	0,0196	0,0321	0,963
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,0153	0,0472	0,0358	0,0446	0,0113	0,0265	0,0177	0,0203	0,997
<i>Firmicutes_C</i>	0,0080	0,0053	0,0097	0,0150	0,0218	0,0321	0,0117	0,0145	<0,001*
<i>Desulfobacterota_I</i>	0,0010	0,0013	0,0024	0,0016	0,0013	0,0043	0,0006	0,0012	0,358
<i>Firmicutes_B_370539</i>	0,0008	0,0009	0,0007	0,0009	0,0016	0,0000	0,0001	0,0015	0,980
<i>Synergistota</i>	0,0011	0,0000	0,0000	0,0008	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,100
<i>Blautia_A_141781</i>	0,1149	0,0784	0,0857	0,0847	0,0822	0,1074	0,1378	0,1039	<0,001*
<i>Streptococcus</i>	0,0664	0,1096	0,1426	0,0992	0,0880	0,1012	0,0228	0,0576	<0,001*
<i>Bacteroides_H_B</i>	0,0686	0,0665	0,0462	0,0544	0,0981	0,0703	0,1171	0,1012	0,004*
<i>Phocaeicola_A_858004</i>	0,0588	0,1014	0,0162	0,0491	0,0498	0,0716	0,0936	0,0717	0,065
<i>Enterococcus_B</i>	0,0005	0,1538	0,0916	0,0503	0,0047	0,0003	0,0433	0,0012	0,912
<i>Bifidobacterium_388775</i>	0,0277	0,0256	0,0395	0,0324	0,0287	0,0235	0,0340	0,0362	0,488
<i>Parabacteroides_B_862066</i>	0,0614	0,0288	0,0249	0,0208	0,0317	0,0432	0,0233	0,0228	0,456
<i>Faecalibacterium</i>	0,0305	0,0149	0,0072	0,0206	0,0428	0,0032	0,0625	0,0551	<0,001*
<i>Lactobacillus</i>	0,0023	0,0025	0,0816	0,0355	0,0584	0,0174	0,0221	0,0206	0,371
<i>Akkermansia</i>	0,0156	0,0478	0,0363	0,0454	0,0118	0,0267	0,0179	0,0206	0,998

*Valor estadísticamente significativo.

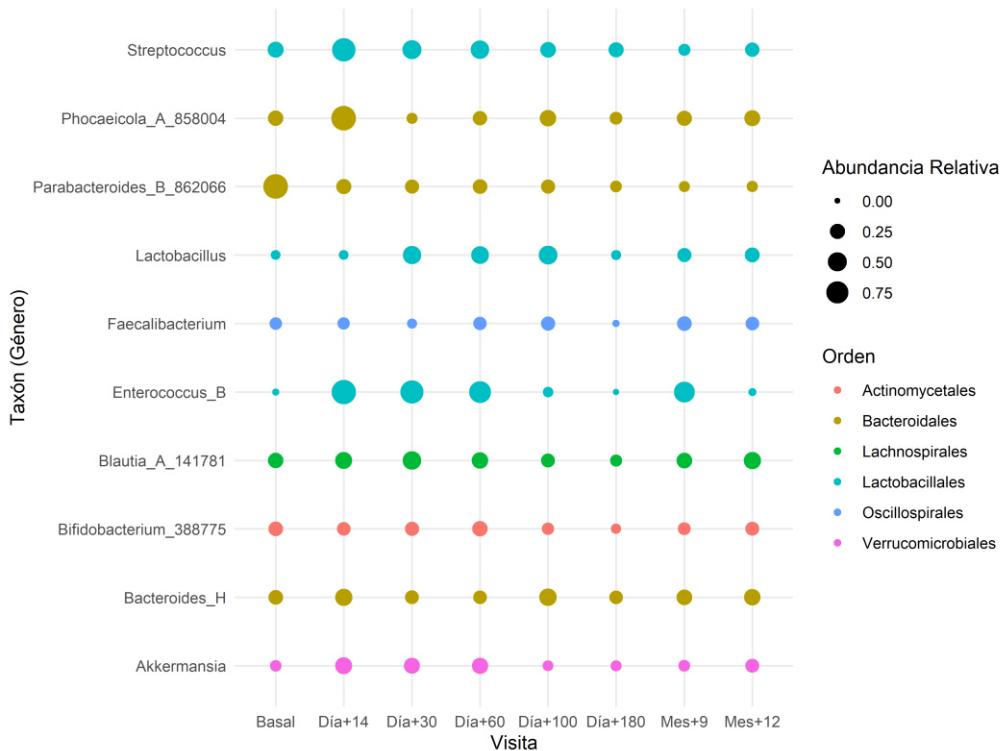


Figura 43. Perfil taxonómico de las muestras recogidas hasta el año post-TPH a nivel de género.

La abundancia relativa de los distintos taxones por visita se representa en función del tamaño de los puntos. Se colorea en función del orden taxonómico al que pertenecen los géneros.

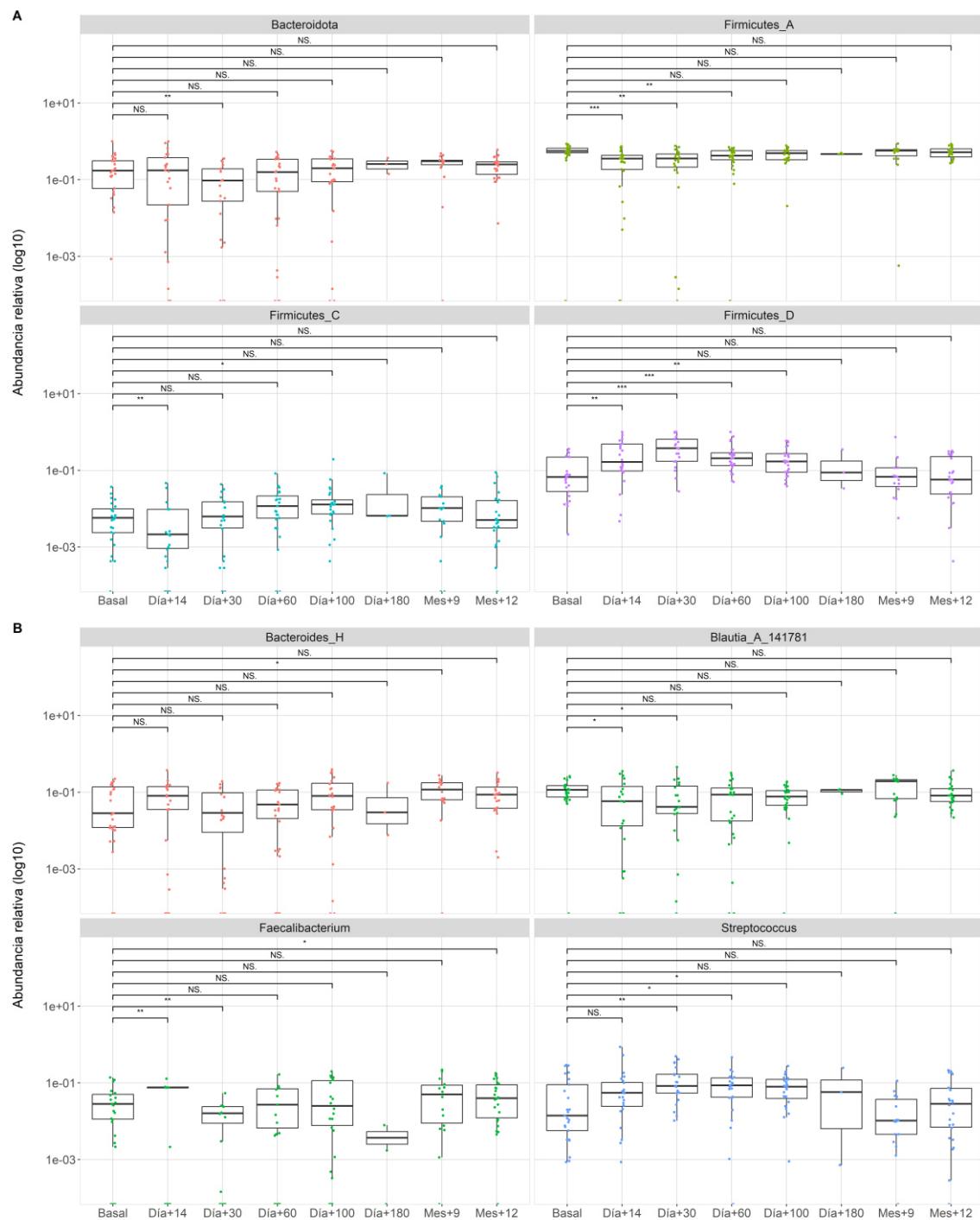


Figura 44. Abundancia relativa por visita de los taxones a nivel de filo (A) y género (B) en los que se observaron cambios significativos en la población estudiada hasta el año post-TPH.

La abundancia relativa se representa en escala logarítmica.

***, p-valor<0,001; **, p-valor<0,01; *, p-valor>0,05; NS, no significativo.

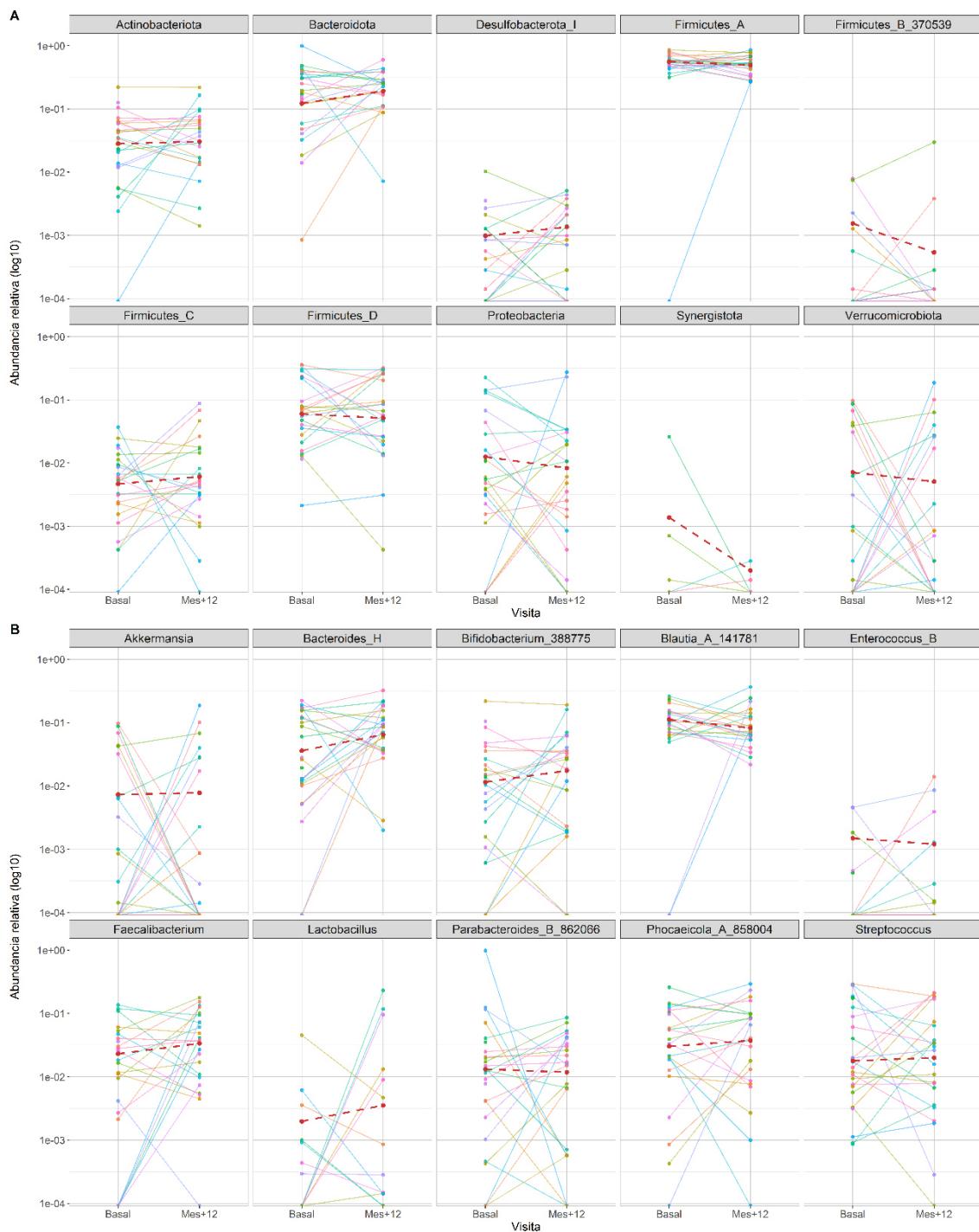


Figura 45. Evolución de la abundancia relativa por paciente de los taxones más abundantes a nivel de filo (A) y género (B).

La abundancia relativa se representa en escala logarítmica. Cada punto representa la abundancia de un taxón específico en un paciente en la visita correspondiente y cada línea conecta los puntos individuales de un mismo paciente para representar la trayectoria individual. La línea discontinua en color rojizo representa la trayectoria promedio de todos los pacientes en el grupo.

4.4.7.2. Análisis de diversidad alfa

La diversidad alfa según el índice inverso de Simpson se representa en la figura 46 ($p<0,001$). En comparación con la alfa diversidad de la visita pretrasplante (media \pm DE= $26,53\pm13,94$), se observó una disminución significativa en su valor en las visitas del día 14 ($11,11\pm9,23$; $p<0,001$) y 30 ($12,88\pm9,40$; $p<0,001$) post-TPH. No encontrándose diferencias a lo largo del resto del seguimiento.

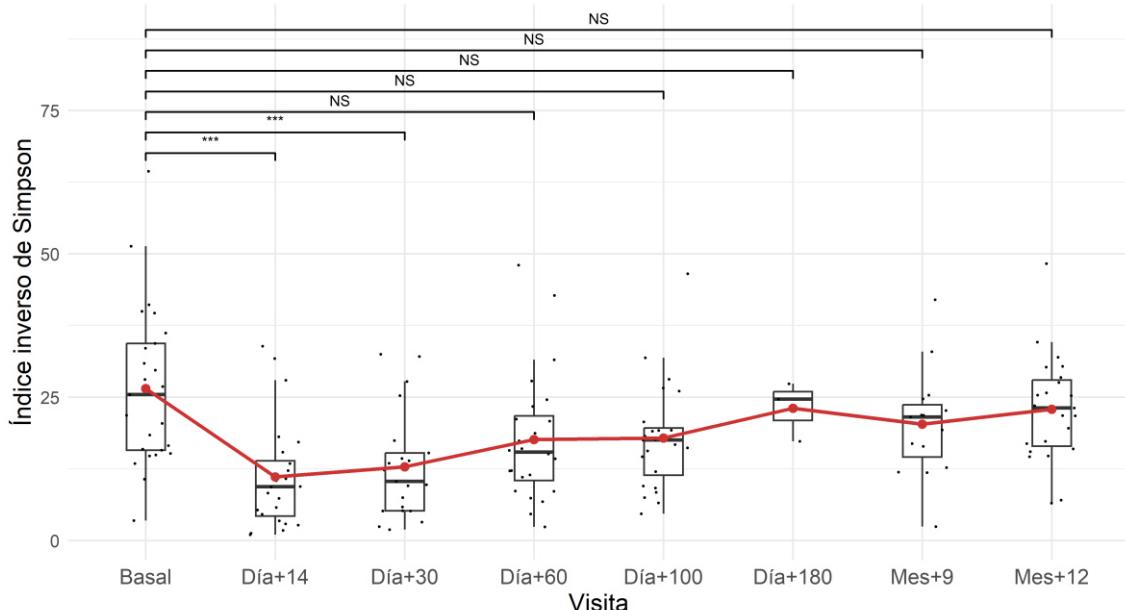


Figura 46. Análisis de alfa diversidad, según el índice inverso de Simpson, por visita de la cohorte con seguimiento hasta el año post-TPH.

El punto rojo representa el valor medio de la alfa diversidad según el índice inverso de Simpson por visita.

***, p -valor $<0,001$; **, p -valor $<0,01$; *, p -valor $>0,05$; NS, no significativo.

4.4.7.3. Microbiota e inmunosupresión

Para analizar el efecto de la inmunosupresión en la microbiota intestinal, se tuvo en cuenta tanto la variable continua de días de exposición de los pacientes a estos tratamientos, como la variable discreta que dividía a los pacientes en dos grupos, finalización de la inmunosupresión con inhibidores de calcineurina antes o después de los 180 días post-TPH.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la alfa diversidad en función del número de días de exposición a esos tratamientos ($p=0,621$), ni en el análisis

de la variable binaria antes o después de los 180 días post-TPH (media \pm DE= 17,49 \pm 9,87 vs. 19,45 \pm 12,52; p=0,524).

4.4.7.4. *Microbiota y profilaxis antibiótica*

Para evaluar el impacto de la profilaxis antibiótica en la microbiota intestinal se compararon la alfa diversidad y el perfil taxonómico de las muestras recogidas tras el trasplante hasta el día 14, donde el efecto de la profilaxis antibiótica podría verse más acentuado, entre los pacientes que habían recibido o no profilaxis antibiótica. Se analizaron 24 muestras de microbiota intestinal de 24 pacientes, de los que 6 (25,00%) habían recibido profilaxis antibiótica con ciprofloxacino. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la alfa diversidad (media \pm DE= 11,06 \pm 8,66 vs. 11,27 \pm 11,68; p=0,758) (figura 47) ni diferencias en la abundancia de los taxones que resultaron más abundantes en la cohorte (figura 48) con relación a la utilización de profilaxis antibiótica. Si bien en el gráfico aparecen como significativas las diferencias en los taxones *Proteobacteria* y *Streptococcus*, estas diferencias desaparecieron al llevar a cabo un análisis GLMM (p=0,117 y p=0,352, respectivamente).

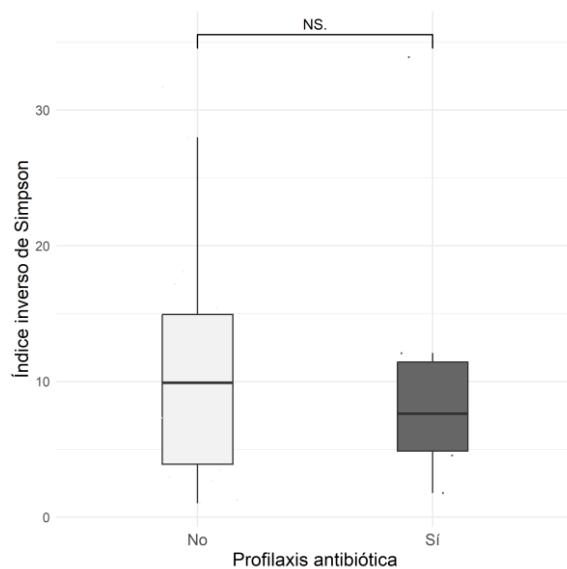


Figura 47. Análisis de la diversidad alfa, medida según el índice inverso de Simpson, de las muestras recogidas hasta el día 14 post-TPH en función de si los pacientes habían recibido o no profilaxis antibiótica.

***, p-valor<0,001; **, p-valor<0,01; *, p-valor>0,05; NS, no significativo.

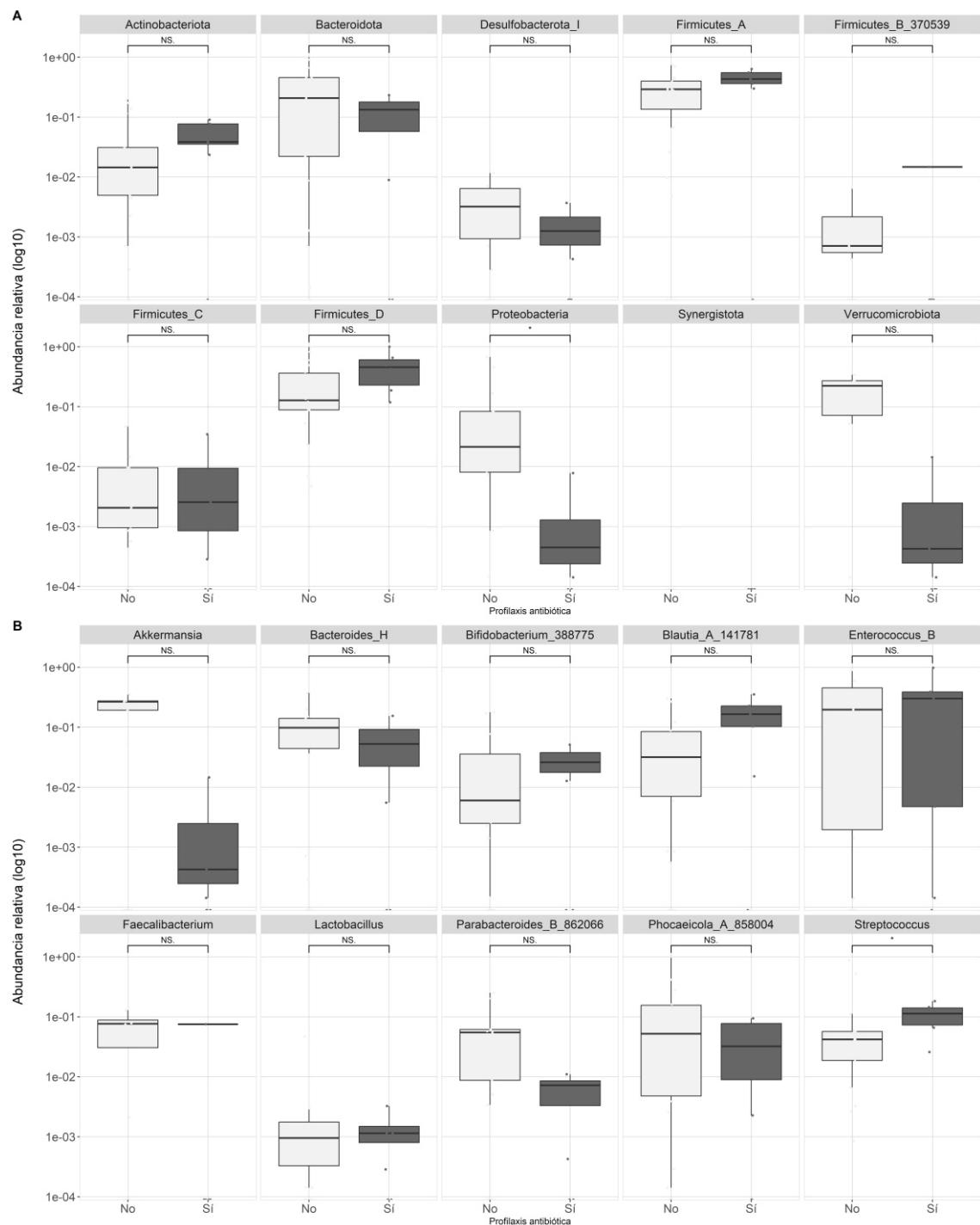


Figura 48. Abundancia relativa de los taxones a nivel de filo (A) y género (B) de las muestras recogidas hasta el día 14 post-TPH en función de si los pacientes habían recibido o no profilaxis antibiótica.

La abundancia relativa se representa en escala logarítmica.

***, p-valor<0,001; **, p-valor<0,01; *, p-valor>0,05; NS, no significativo.

5. DISCUSIÓN

A pesar de que los avances en el cuidado de pacientes con inmunosupresión grave han reducido la morbi-mortalidad por complicaciones infecciosas (17), su incidencia ha aumentado debido a la realización de trasplantes en pacientes de mayor riesgo y al uso de inmunosupresores más potentes (20, 24). Además, la resistencia antibiótica y las infecciones por microorganismos MR complican la elección de un tratamiento empírico adecuado (25, 26, 36, 46, 47). Por todo ello, las complicaciones infecciosas continúan constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad temprana en el alo-TPH (17, 21).

En este escenario, conocer el perfil de resistencias locales y la presencia o no de colonización por microorganismos MR en estos pacientes parece clave para un tratamiento precoz adecuado (46, 47).

La microbiota intestinal juega un papel importante en diversos aspectos de la salud, entre ellos, la protección frente a la colonización por posibles patógenos (50, 51, 54–56). Durante el alo-TPH se produce una disbiosis de la microbiota, habiéndose relacionado su desequilibrio con distintos estados patológicos, como trastornos inflamatorios crónicos (57–59), y en el campo del TPH, con mayores eventos de EICH y mayor mortalidad (64, 65, 67). Caracterizar su composición durante el alo-TPH y su relación con la colonización por microorganismos MR es un factor importante en la evolución de los pacientes receptores de alo-TPH.

En este estudio se presentan los resultados de un proyecto de investigación multicéntrico nacional sobre la incidencia de colonización intestinal por microorganismos MR, concretamente EMR, y la caracterización de la microbiota intestinal, durante el primer año tras un alo-TPH, para conocer su papel en la evolución clínica de estos pacientes. Aunque el efecto de la colonización por EMR ya ha sido objeto de estudio, este es el primer estudio español, hasta donde sabemos, que evalúa la composición de la microbiota intestinal en esta población y su relación con la colonización.

Para facilitar la compresión, la discusión de los resultados se hará por apartados, en el mismo orden en el que estos han sido presentados, atendiendo en cada uno de ellos a los diferentes objetivos establecidos al inicio del trabajo.

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El TPH ha experimentado un notable progreso en los últimos años, lo que se ha traducido en una mejora en los resultados clínicos y en una ampliación de las indicaciones, incluyendo a pacientes que anteriormente no se consideraban aptos para este procedimiento. Como consecuencia, las características clínicas de los pacientes receptores de un TPH han cambiado de manera importante a lo largo del tiempo.

Un estudio longitudinal retrospectivo publicado en 2024 analizó la evolución de los resultados de los alo-TPH en una institución durante más de cuatro décadas, identificando los cambios en las prácticas clínicas y su impacto en la supervivencia y la mortalidad de los pacientes. Los autores observaron un incremento en la edad de los receptores, así como una mayor proporción de pacientes con comorbilidades y con estadíos más avanzados de la enfermedad, lo que refleja una creciente complejidad clínica (21). En cuanto a los procedimientos, se ha observado un aumento en el uso de donantes no emparentados y haploidénticos, de sangre periférica como fuente de injerto, y una reducción en el uso de regímenes de acondicionamiento mieloablativos en favor de esquemas de intensidad reducida. En relación con las causas de muerte no relacionadas con la recidiva, si bien se ha visto una disminución en su frecuencia, las infecciones continúan representando una de las principales causas de mortalidad en esta población (21).

De los 186 pacientes incluidos en nuestro estudio, únicamente un 4,3% (8/186) no completaron el seguimiento, principalmente por haber continuado su control en otro centro hospitalario (62,5%, 5/8). La cohorte se caracterizó por su homogeneidad entre los distintos centros participantes, no encontrándose diferencias significativas en la distribución por edad, sexo o tipo de enfermedad hematológica de los pacientes. La enfermedad de base más frecuente fue la leucemia mieloide aguda seguida de la leucemia linfoblástica aguda. La metodología del trasplante empleada fue comparable a la descrita en otras cohortes nacionales (21, 47, 128) e internacionales (66, 81) ya publicadas.

No obstante, la exposición previa a antibioterapia, un factor de riesgo conocido para infecciones posteriores, fue ligeramente inferior a la descrita en cohortes similares (46, 126). En el estudio retrospectivo publicado por Puerta-Alcalde P et al. (126), en el que analizan la epidemiología de episodios de bacteriemia en pacientes receptores de TPH en los últimos 25 años, la exposición previa a antibióticos osciló entre el 50,7% y el 76,6%,

dependiendo del periodo analizado, con un uso de profilaxis antibiótica entre el 31,5% y el 35,8%. De forma similar, en la cohorte de Chumbita M et al. (46), el 58,1% de los pacientes hematológicos habían recibido antibioterapia previa y el 29,2% profilaxis con quinolonas. En nuestra cohorte, el 41,4% de los pacientes habían recibido algún tipo de antibiótico durante los tres meses previos al ingreso para el alo-TPH, y sólo el 21% recibió profilaxis antibiótica durante el trasplante; concretamente, el 11,8% profilaxis con quinolonas.

El uso de quinolonas como profilaxis durante el alo-TPH es aún objeto de debate, no habiendo un consenso sobre su aplicación. Su indicación está sujeta a la consideración de los datos epidemiológicos locales y a la monitorización de la aparición de resistencias, con un nivel de evidencia AIII. En este sentido, el estudio multicéntrico de Averbuch D et al. (46), que incluyó datos de 655 episodios de bacteriemia en receptores de TPH de 65 centros en 25 países, cuestiona la recomendación del uso de profilaxis con fluoroquinolonas al observar una elevada tasa de resistencia, aproximadamente el 50% de las bacterias eran resistentes a fluoroquinolonas. En nuestro estudio, sólo dos centros empleaban quinolonas de forma rutinaria y su reclutamiento contribuyó al 17,7% de la población de estudio, por lo que estas diferencias en su uso pueden ser debidas a una baja representación de esta metodología en nuestra población.

Respecto a los episodios de infección en este tipo de pacientes, Puerta-Alcalde P et al. (128) identificaron un 7,5% de microorganismos MR, mayoritariamente bacilos gramnegativos MR (5,6%), responsables de episodios de bacteriemia, con una media de 55 días desde el TPH hasta su detección. Estos casos se concentraron en el periodo post-injerto precoz. En nuestro estudio, aunque la incidencia de infección y bacteriemia por EMR fue similar (13,4% y 7,5%, respectivamente), los episodios se concentraron en el periodo pre-implante, con una mediana de 14 días desde el alo-TPH hasta el primer episodio infeccioso.

La mortalidad global registrada durante el primer año en nuestro estudio fue del 24,2%, y la no relacionada con la recidiva de la enfermedad de base alcanzó el 16,7%, cifras comparables a las descritas en otras cohortes (65, 79). Las principales causas de fallecimiento fueron la recidiva, las infecciones y la EICH. En un estudio observacional retrospectivo de 2019, que analizó las causas de muerte tras el TPH en 114.491 pacientes incluidos en la base de datos EBMT entre 1980 y 2015, se observó un 45,8% de

mortalidad global: la recidiva representó el 42,9%, las infecciones el 22,3% y la EICH el 15,9%.

En el subgrupo de alo-TPH, las cifras fueron del 38,7% para recidiva, 23,8% para infecciones y 19% para EICH, valores muy próximos a los de nuestra cohorte. En dicho estudio, el 35,1% de las muertes tras el alo-TPH se produjeron en los primeros 100 días, principalmente por causas infecciosas (127). De manera similar, en nuestra población, el 51,1% de los fallecimientos ocurrieron dentro de los primeros 100 días post-TPH, siendo la mayoría debidos a procesos infecciosos (30,4%).

5.2. COLONIZACIÓN INTESTINAL EN EL TRASPLANTE

La tasa de colonización intestinal por microorganismos MR varía en las distintas cohortes publicadas. Bilinski J et al. (81) detectaron un 31% de colonización antes del trasplante, mientras que otras series, como la de Forcina A et al. (129) informaron una colonización intestinal del 16,9% en pacientes receptores de alo-TPH previo al procedimiento. En una revisión sistemática y metaanálisis, publicada en 2024, Luo H et al. (130) evaluaron la prevalencia y los factores de riesgo asociados a la colonización intestinal por bacilos gramnegativos MR, específicamente EMR, en pacientes con enfermedades hematológicas. Los autores observaron una prevalencia global de colonización del 22% por *Enterobacteriales* resistentes a carbapenemes y del 19,2% por productores de betalactamasas. Por otra parte, la cohorte de Gallardo-Pizarro A et al. (131), publicada en 2025, que analizó la colonización intestinal por bacterias gramnegativas MR en pacientes hematológicos en un hospital de Barcelona entre enero de 2020 y septiembre de 2022, informó de una prevalencia de colonización del 27,5%, con detección al ingreso en el 14,1% de los casos. Las diferencias observadas entre estudios destacan la importancia de mantener una vigilancia activa de la resistencia, especialmente en poblaciones de riesgo.

En nuestro estudio, la incidencia de colonización previa al trasplante fue inferior a la descrita en la literatura (10,22%). Sin embargo, la incidencia global de colonización durante el seguimiento alcanzó el 39,2%, con una mediana de 28 días desde el TPH hasta la detección del primer aislamiento. Estos resultados sugieren que los pacientes mantienen un riesgo continuo de colonización durante su hospitalización por el TPH, especialmente en el periodo cercano a la recuperación granulocitaria, momento en el que

hay un mayor riesgo de infecciones por los daños producidos en la barrera mucocutánea (16) y una mayor exposición a tratamientos antimicrobianos empíricos.

En este contexto, nuestros hallazgos coinciden con las observaciones de Gallardo-Pizarro A et al. (131), quienes sugieren que un cribado únicamente al ingreso resulta insuficiente. En su estudio, la prevalencia al ingreso fue del 14,1%, mientras que, con un programa de vigilancia activa se identificó al 27,5% de los pacientes hematológicos como portadores rectales de bacilos gramnegativo MR, lo que respalda la implementación de un cribado semanal rutinario. Además, estos autores señalan que en centros sin vigilancia activa se debe considerar la posible aparición de *Enterobacteriales* resistentes a carbapenemes y *P. aeruginosa* difícil de tratar a partir de la segunda semana de hospitalización.

La relevancia de estos hallazgos radica en que una detección precoz de la colonización puede influir directamente en la elección de la antibioterapia empírica inicial. En este sentido, diversos estudios, como los de Averbuch D et al. y Chumbita M et al. (46, 47), han demostrado que el uso de tratamientos empíricos inadecuados, más frecuente en infecciones por microorganismos MR, se asocia a unas tasas de mortalidad más elevadas.

En cuanto a las características epidemiológicas según el estado de colonización, y en consonancia con estudios previos (81, 129), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en variables basales como el sexo, la edad, la enfermedad de base o los distintos scores de riesgo evaluados. Sin embargo, los pacientes colonizados presentaron en mayor frecuencia episodios de infección y bacteriemia previos al ingreso para el TPH. Asimismo, se observó un mayor uso previo de antibióticos en este grupo, aunque no se alcanzó la significación estadística, siendo considerado éste un factor de riesgo relevante en el estudio de Luo H et al. (130).

La relación entre la colonización intestinal y un posterior episodio de infección continúa siendo objeto de investigación (48, 49). Recientemente, Woodhouse EW et al. (132), publicaron los datos de una revisión exhaustiva de revisiones sistemáticas y metaanálisis, “revisión umbrella”, sobre el riesgo de infección en personas colonizadas por bacterias gramnegativas MR, especialmente por *Enterobacteriales* productores de BLEE o resistentes a carbapenemes. Los datos mostraron una incidencia combinada de infección en pacientes colonizados hospitalizados del 22%. El análisis de riesgos reveló que la probabilidad de desarrollar infección en individuos colonizados es aproximadamente

15,68 veces mayor que en los no colonizados. Concretamente, los pacientes receptores de un trasplante de órgano sólido colonizados por *Enterobacteriales* productores de BLEE mostraron un aumento de riesgo de infección de 9,09 a 11,7 veces en comparación con los no colonizados. Aunque la gran heterogeneidad en los datos y variabilidad en las metodologías empleadas limitan la generalización de los resultados, estos hallazgos resaltan la alta carga clínica asociada a la colonización por bacterias gramnegativas MR. Los autores subrayan la necesidad de estrategias de intervención precoz y de diseño de futuras investigaciones con mayor consistencia metodológica.

En línea con estas observaciones, Gallardo-Pizarro et al. (131), evaluaron el rendimiento diagnóstico del cribado de colonización rectal por bacilos gramnegativos MR como predictor de bacteriemia. Sus resultados mostraron que la colonización rectal posee un alto valor predictivo negativo (99,9% para *Enterobacteriales* resistentes a carbapenemes y *P. aeruginosa* difícil de tratar), lo que indica que la ausencia de colonización se asocia a un riesgo muy bajo de bacteriemia. Mientras que, los valores predictivos positivos del 25% para *Enterobacteriales* resistentes a carbapenemes y del 36,4% para *P. aeruginosa* difícil de tratar, respaldan su valor en la identificación de pacientes de alto riesgo.

De forma concordante, en nuestra cohorte el análisis multivariable mostró que la colonización intestinal por EMR se asoció de manera significativa con una mayor duración de la estancia hospitalaria y con una odds 8 veces superior de desarrollar episodios de infección y bacteriemias por EMR, en comparación con los pacientes no colonizados. Estos resultados refuerzan y complementan los hallazgos previamente descritos en otras cohortes y revisiones (81, 131, 132), confirmando la relevancia clínica de la colonización intestinal como marcador de riesgo en pacientes sometidos a TPH.

Respecto a la supervivencia global, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el estado de colonización. Sin embargo, los pacientes que desarrollaron episodios de infección por EMR presentaron una tasa de riesgo de exitus 4,5 veces mayor que aquellos sin infección, alcanzando un valor de 5,9 veces en los casos de fallecimiento no relacionado con la recidiva de la enfermedad de base. Estos datos coinciden con los publicados por Forcina A et al. (129), cuyos resultados principales muestran que la colonización por bacilos gramnegativos MR no tuvo un impacto significativo en la supervivencia global, mortalidad relacionada con el trasplante, ni en la mortalidad por infecciones. En contraste, Bilinski J et al. (81), sí observaron un efecto

negativo de la colonización en la supervivencia global, siendo significativamente menor en los pacientes colonizados (34%) comparada con los no colonizados (74%).

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES

En 2022, “*The Lancet*” publicó el análisis más completo realizado hasta la fecha sobre la estimación de la carga global de resistencia antimicrobiana correspondiente al año 2019 (26). Según este estudio, aproximadamente 4,95 millones de muertes estuvieron relacionadas con infecciones por bacterias resistentes a antimicrobianos, de las cuales 1,27 millones fueron directamente atribuibles a la resistencia. Seis patógenos concentraron el 73,4% de las muertes atribuibles, destacando el papel de las enterobacterias como los principales agentes implicados: *E. coli* y *K. pneumoniae* ocuparon el primer y tercer lugar, respectivamente. Las implicaciones derivadas de este trabajo subrayan la necesidad de implementar políticas concretas que se dirijan a la expansión de los programas de prevención y control de infecciones, la mejora del acceso a antibióticos esenciales y el desarrollo de vacunas y antibióticos. No obstante, alcanzar estos objetivos constituye un desafío debido a las variaciones en la tasa de resistencia observada entre regiones.

Estas variaciones no sólo se evidencian entre países, sino también entre territorios de un mismo país. Si bien nuestros datos se alinean con los descritos en otros estudios (36, 131) en cuanto a las EMR más frecuentemente aisladas, encontramos diferencias a nivel de los mecanismos de resistencia más prevalentes. Este hallazgo refuerza la importancia de conocer la epidemiología local para ayudar en la adecuada toma de decisiones, especialmente para el tratamiento de un proceso infeccioso.

En relación con la carga de resistencia a antimicrobianos existente en el territorio nacional, en el muestreo realizado por Peñalva G et al. (36), en todas las muestras clínicas enviadas para diagnóstico de infección de pacientes ingresados, se observó que los *Enterobacteriales* MR aislados correspondían principalmente a *E. coli* productor de BLEE (25,8% en el último año registrado) y *K. pneumoniae* productor de BLEE (12,9%). La infección del tracto urinario fue la más frecuente (42,7%). Por su parte, en el trabajo de Gallardo-Pizarro A et al. (131), centrado en los pacientes hematológicos, los microorganismos predominantes identificados en los frotis rectales fueron *E. coli*

(49,3%), *K. pneumoniae complex* (24,9%), *P. aeruginosa* (7,2%) y *E. cloacae complex* (6%). El 11,7% de las cepas aisladas eran productores de algún tipo de carbapenemasa, principalmente OXA-48, sin representación de carbapenemasa tipo GES. La mayoría de los episodios de bacteriemia estudiados fueron debidos a *E. coli* (36,1%) y *K. pneumoniae complex* (20,5%), ambos resistente a cefalosporinas de tercera generación (36,7% y 35,3%, respectivamente).

Aunque las EMR aisladas se mantienen en las distintas cohortes, los mecanismos de resistencia, en particular la producción de carbapenemasas, varían. En nuestra cohorte encontramos una mayor prevalencia de EMR productoras de carbapenemasas, predominantemente de tipo GES. Nuevamente, estos hallazgos hacen hincapié en la importancia de conocer la epidemiología local.

5.4. MICROBIOTA INTESTINAL EN EL TRASPLANTE

Un estudio reciente de Latorre-Pérez et al. (53) caracterizó la microbiota intestinal de 530 individuos en España, con el objetivo de definir una microbiota intestinal "normal" para nuestro país. A nivel de filo, *Firmicutes* y *Bacteroidota* fueron predominantes, seguidos por *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiota* y *Actinobacteriota*, lo que es consistente con el perfil taxonómico de la microbiota intestinal descrito por Rajilić-Stojanović y M de Vos (52). A nivel de género, *Bacteroides* fue el taxón dominante.

El análisis de las características basales de la población de nuestro estudio reveló una composición taxonómica común entre los pacientes, independientemente de su centro de origen, que difería de la descrita por Latorre-Pérez et al. (53), incluso antes del trasplante. Nuestros pacientes mostraron una baja diversidad, medida por el número de taxones identificados, la cual disminuyó aún más durante los primeros 30 días post-TPH. Estos cambios incluyeron desplazamientos en la abundancia relativa de los taxones dominantes y alteraciones en la diversidad alfa, medida por el índice inverso de Simpson. A nivel de filo, la composición basal estaba dominada por *Firmicutes*, seguidos por *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobiota*; mientras que, a nivel de género, *Blautia* y *Streptococcus* fueron los taxones dominantes. A lo largo del estudio, la composición global de la microbiota intestinal estuvo dominada por el género *Streptococcus*, lo que indica alteraciones dinámicas en los perfiles taxonómicos y la

diversidad alfa de la microbiota intestinal. Se observó un aumento en la abundancia relativa de la clase *Bacilli*, dominada por los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, llegando a ser estadísticamente significativo en el primer caso. Este cambio fue particularmente evidente durante el periodo de neutropenia y hasta los 30 días post-TPH, y condujo a una reducción significativa en la diversidad alfa en comparación con los niveles pretrasplante, como se refiere en estudios previos como los de Peled et al. (66) y Masetti et al. (133), así como a una disminución en la abundancia de ciertos taxones asociados con mejores resultados clínicos, como el género *Blautia* (67, 72).

Nuestros resultados fueron similares a los de Peled et al. (66), quienes describieron una composición de la microbiota intestinal común en estos pacientes, independientemente del centro de origen, y señalaron que difería significativamente de la composición encontrada en individuos sanos.

Estos hallazgos sugieren que la composición de la microbiota en estos pacientes puede estar influenciada principalmente por su enfermedad subyacente y los tratamientos asociados, independientemente de la región geográfica y las variaciones dietéticas.

Un historial de infección pretrasplante, bacteriemia o tratamiento antibiótico previo se asoció significativamente con una menor alfa diversidad de la microbiota intestinal en el momento pretrasplante. Estudios previos han relacionado de manera consistente una reducción en la diversidad de la microbiota con una peor evolución de los pacientes (48, 68) y una supervivencia general deteriorada (64–66). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en la alfa diversidad, ni en el momento pretrasplante ni en el periodo de neutropenia, en relación con las variables clínicas asociadas a un peor pronóstico de los pacientes, como el desarrollo de episodios de EICH o la aparición de episodios de infección o bacteriemia. En cuanto a su impacto en la supervivencia, aunque no se alcanzó significación estadística, se observó una tendencia hacia una menor supervivencia al año en los pacientes con menor diversidad en ambos periodos, en comparación con aquellos con mayor diversidad, tal como fue informado previamente por Masetti et al. (133).

El uso de las características de la microbiota intestinal como predictor de la evolución de los pacientes sometidos a TPH es un área de creciente interés (66, 67, 69, 70, 72, 132, 133). Un ejemplo es el trabajo de Han L et al. (133), quienes emplearon el valor de la alfa

diversidad y la abundancia de cuatro familias bacterianas, estadísticamente relacionadas con mejores o peores resultados clínicos, para crear un score predictivo de supervivencia. Para ello analizaron 209 muestras de microbiota intestinal de pacientes receptores de un alo-TPH en el día +15 postrasplante en dos centros de China. Los resultados mostraron que una puntuación baja se asoció con una mayor supervivencia a 3 años (88,5%) y menor mortalidad (7,1%), mientras que una puntuación alta fue un factor independiente de riesgo para mortalidad. La capacidad predictiva del score alcanzó un área bajo la curva de 0.836, lo que indica una alta precisión en la predicción de supervivencia ($p<0,001$). Estos resultados refuerzan la importancia de la microbiota en el pronóstico postrasplante. Es importante destacar que, en este estudio, la familia *Enterobacteriaceae* se identificó como un factor predictor de un peor pronóstico, relacionándose su mayor abundancia con peores resultados, posiblemente debido a su papel en la disbiosis y en la producción de metabolitos que pueden promover inflamación y daño intestinal.

Complementando el análisis de alfa diversidad, el estudio de la diversidad beta mediante un análisis de PCoA, basado en las abundancias relativas a nivel de género, no reveló una agrupación distintiva de las muestras de los pacientes según las características antes mencionadas, ni en el momento basal ni durante el periodo de neutropenia. Biagi et al. (67) informaron hallazgos similares con respecto al desarrollo o ausencia de EICH, que asociaron con la presencia y abundancia de taxones específicos. Aunque en nuestro análisis no se identificaron grupos claramente diferenciados basados en características asociadas con peores resultados clínicos, sí se observó una agrupación significativa entre las muestras de pacientes con y sin exposición previa a antibióticos en el momento basal, así como entre las muestras recogidas durante el periodo de neutropenia de pacientes que desarrollaron episodios de bacteriemia frente a los que no. Además, encontramos diferencias en la beta diversidad entre los grupos con alta y baja diversidad alfa en ambos periodos.

Aunque estos hallazgos explican un pequeño porcentaje de la variabilidad total en la composición de la microbiota, junto con los resultados previamente expuestos sobre el perfil taxonómico y la diversidad alfa, apoyan la existencia de cambios significativos en los perfiles taxonómicos de la microbiota intestinal de nuestros pacientes.

Centrándonos en el análisis de taxones específicos, observamos que los pacientes con características asociadas a peores resultados clínicos, como bacteriemia, EICHa-GI o

fallecimiento durante el seguimiento, presentaban una mayor abundancia de géneros potencialmente patógenos como *Enterococcus* y *Staphylococcus*, en concordancia con lo descrito en la literatura (63, 68, 72, 134, 135). Asimismo, se observó una disminución significativa en la abundancia de géneros como *Blautia* y *Ruminococcus*, taxones que contribuyen a mantener la homeostasis intestinal y a inducir tolerancia inmunológica mediante la producción de metabolitos, y que están relacionados con un menor riesgo de complicaciones (67, 71, 72, 133, 135).

El papel que desempeñan los distintos taxones en la evolución de estos pacientes continúa siendo objeto de estudio. En algunos casos, se ha descrito un comportamiento dual, como el de *Akkermansia*, que parece ejercer un efecto protector sobre la barrera intestinal y participar en la modulación del sistema inmunológico. Sin embargo, modelos murinos sugieren que su actividad mucolítica podría exacerbar la EICH bajo determinadas circunstancias (75). En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas en su abundancia a lo largo del seguimiento, aunque sí se observó una mayor abundancia en los pacientes fallecidos. Estos hallazgos reflejan la elevada complejidad de los análisis de la microbiota y subrayan la influencia de distintos factores y del contexto clínico concreto en la interpretación de los resultados.

5.4.1. Microbiota intestinal y colonización

Una de las funciones principales de la microbiota intestinal es su efecto protector frente a la colonización por microorganismos potencialmente patógenos (50, 54). Se han identificado ciertos patrones microbianos asociados a una menor susceptibilidad a la colonización por microorganismos MR. En particular, se ha observado una mayor abundancia de géneros y familias bacterianas como *Bacteroides*, *Blautia*, *Lachnospiraceae*, *Prevotella* y *Ruminococcaceae* en individuos no colonizados (78). Estos taxones se consideran potencialmente protectores por su capacidad para mantener la integridad de la mucosa intestinal, producir ácidos grasos de cadena corta que modulan la respuesta inflamatoria, y competir por recursos y espacio con patógenos resistentes.

Por otro lado, algunos taxones como *Lactobacillus* desempeñan un papel clave en la resistencia a la colonización intestinal por EMR, al favorecer la expansión de *Clostridiales* productores de butirato, lo que se ha asociado con una reducción en la carga de estos microorganismos (136).

La disbiosis que se produce durante el TPH se ha relacionado con una disminución de bacterias productoras de butirato, implicadas en la preservación de la integridad del epitelio intestinal. Esta alteración se correlacionó con una mayor gravedad de los eventos de EICH y se ha identificado como un factor de riesgo para la colonización y posterior expansión de microorganismos MR. Stoma et al. (48), en un análisis de 4.768 muestras de heces de 708 pacientes receptores de alo-TPH, observaron que la dominancia intestinal de bacterias gramnegativas estaba significativamente asociada con un mayor riesgo de bacteriemia posterior por estos microorganismos. Los géneros más prevalentes fueron *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. En contraste, la presencia de grupos como *Ruminococcaceae* y *Bacteroidetes*, tuvieron un papel protector, asociándose con un menor riesgo de dominancia por gramnegativos.

En nuestro estudio, si bien no se encontraron diferencias en el perfil taxonómico a nivel de género entre los pacientes colonizados y no colonizados, sí se observó una abundancia significativamente mayor del filo *Proteobacteria* en los pacientes con colonización intestinal por EMR. Además, los pacientes colonizados en el momento pretrasplante o que se colonizaron durante el periodo de neutropenia presentaron una diversidad alfa menor que aquellos en los que no se detectó colonización, mostrando estos últimos una mayor abundancia de *Blautia*. Estos hallazgos se correlacionan con el resto de los resultados del estudio, vinculando la disbiosis que se produce a lo largo del TPH y la disminución de la abundancia de *Blautia* con la presencia de colonización.

En resumen, una microbiota con elevada diversidad y con abundancia de géneros relacionados con la producción de metabolitos antimicrobianos y la competencia por recursos se asocia con una menor susceptibilidad a la colonización por microorganismos MR. Por el contrario, la disbiosis caracterizada por la dominancia de ciertos géneros oportunistas incrementa dicho riesgo (78). Mantener o restaurar una microbiota saludable podría ser clave para disminuir el riesgo de colonización y posterior infección por EMR (54).

5.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Si bien nuestro estudio presenta una base metodológica sólida, es importante reconocer ciertas limitaciones que deben ser tomadas en cuenta.

El estudio realizado es un estudio de cohortes prospectivo longitudinal, uno de los diseños más utilizados en la investigación biomédica. Una de las limitaciones a considerar es la falta de un grupo control, en el caso del análisis de la microbiota intestinal. Sin embargo, es un campo actualmente en expansión, en el que aún se está definiendo lo que podría considerarse una microbiota “normal”. Asimismo, ya hay diversas cohortes publicadas con las que se podría hacer una comparativa, y el interés de este estudio radica en caracterizar la composición de la microbiota intestinal a lo largo del trasplante. Otra limitación que puede presentarse en el aspecto metodológico es inherente a los estudios multicéntricos en los que se incluyen centros con distintos protocolos para el tratamiento y seguimiento de los pacientes. No obstante, el campo del TPH está muy estandarizado, siguiéndose las recomendaciones establecidas por las sociedades científicas nacionales e internacionales.

La siguiente limitación son los posibles sesgos debidos a la propia manipulación de las muestras, especialmente para el estudio de la microbiota, dado que no se cuenta con un protocolo estandarizado. Por ello todas las muestras fueron procesadas y analizadas por personal familiarizado con estos procedimientos y con experiencia acreditada en el análisis de muestras de microbiota.

La pérdida de muestras durante el seguimiento, ya sea por muerte del paciente o por fallos en su recolección, puede haber ocasionado un sesgo metodológico provocando una pérdida de poder estadístico al no alcanzar valores significativos en algunos de los análisis realizados, a pesar de las tendencias observadas.

Los posibles factores de confusión debidos a las características propias de cada paciente y el tratamiento recibido según su evolución fueron controlados mediante el uso de análisis estratificado y multivariable.

Con respecto a la selección de los pacientes, el bajo reclutamiento en centros que tenían implantado un protocolo de profilaxis antibiótica con fluoroquinolonas durante el alo-TPH puede haber contribuido a una pérdida de poder estadístico impidiendo evaluar el impacto real de esta práctica.

Para evitar un sesgo de información, todos los datos se recogieron a partir de la historia clínica de los pacientes por el personal responsable de cada centro. A continuación, toda

la información fue recopilada en la base de datos y revisada por una única persona, evitando sesgos en su interpretación.

5.6. FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio multicéntrico que incorpora centros con amplia experiencia en el abordaje del alo-TPH.

El enfoque novedoso del estudio, que evalúa un tema de actualidad, como es la resistencia a los antibióticos por su problemática a nivel global, e incorpora el estudio de la microbiota intestinal, un campo actualmente en auge.

6. CONCLUSIONES

1. La incidencia de colonización intestinal por EMR en receptores de alo-TPH fue mayor de la esperada, siendo del 40,9%, con una prevalencia del 10,2% en el pretrasplante y del 39,2% en el postrasplante.
2. Se observó una disminución significativa de la diversidad de la microbiota intestinal entre los 14 y 30 días y hasta los 60 días post-TPH, con recuperación a los 100 días respecto al periodo pretrasplante. Esta recuperación continuó observándose al año postrasplante.
3. Las cepas de EMR aisladas con mayor frecuencia en los frotis rectales fueron *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae*, con resistencia principalmente por BLEEs (CTX-M) y carbapenemas tipo GES. En la microbiota intestinal predominaron los filos *Firmicutes* y *Bacteroidota*, y a nivel de género, *Streptococcus* y *Blautia*.
4. Los pacientes con colonización intestinal por EMR presentaron una menor diversidad alfa y menor abundancia de *Blautia* que los no colonizados, de forma estadísticamente significativa, en el momento pretrasplante y durante el periodo de neutropenia.
5. La incidencia de infección por EMR fue significativamente mayor en pacientes colonizados frente a no colonizados.
6. No se detectaron diferencias en la diversidad alfa y beta de la microbiota intestinal de los pacientes en función de si habían presentado un evento de EICH, pero sí en taxones concretos. La abundancia de *Blautia* fue significativamente menor en aquellos pacientes con EICHa-GI de grado 2 o superior.
7. La profilaxis antibiótica utilizada no afectó al estado de colonización intestinal por EMR ni a la composición ni la diversidad de la microbiota intestinal.
8. No se hallaron diferencias significativas en la supervivencia según la colonización intestinal ni la diversidad de la microbiota. Sin embargo, la infección por EMR se asoció con un mayor riesgo de mortalidad de forma estadísticamente significativa. Asimismo, se identificaron taxones diferencialmente expresados entre los pacientes fallecidos y los supervivientes. Encontrándose en los primeros, una mayor abundancia de posibles patógenos, como *Enterococcus* y *Staphylococcus*, y una disminución de *Blautia*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. van Bekkum DW, de Vries MJ. The Radiation Chimeras. London: Logos Press; **1967**.
2. Cap. Libro: Conde García E, Pérez Simón JA. Trasplante de progenitores hematopoyéticos. En: Moraleda Jiménez JM. Pregrado de Hematología. 4.^a ed. Madrid: Luzán 5; **2017**. p. 511-58.
3. Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E. The EBMT Handbook. Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies. 8^a ed. Cham: Springer Nature; **2024**. DOI: 10.1007/978-3-031-44080-9.
4. Cap. Libro: Foucar K. Hematopoiesis and Bone Marrow Histology. En: Foucar K, Chabot-Richards D, Czuchlewski DR, Karner KH, Reichard KK, Vasef MA, et al. Diagnostic Pathology: Blood and Bone Marrow. 2^a ed. Philadelphia: Elsevier; **2018**. p. 4-13.
5. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* **1957**;257(11):491-6. DOI: 10.1056/NEJM195709122571102.
6. MATHE G, JAMMET H, PENDIC B, SCHWARZENBERG L, DUPLAN JF, MAUPIN B, et al. Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés à haute dose accidentellement [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol.* **1959**;226-38.
7. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation.* **1970**;9(6):571-87. DOI: 10.1097/00007890-197006000-00006.
8. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med.* **1975**;292(16):832-43. DOI: 10.1056/NEJM197504172921605.
9. Carreras E. Guía del trasplante de médula ósea para el paciente [Internet]. Fundación Josep Carreras contra la Leucemia; **2016** [acceso 22/08/2024]. Disponible en: <https://fcarreras.org/documentacion-pdf/guia-del-trasplante-de-medula-osea-para-pacientes/>.

10. Carreras E, Rovira M, Valcárcel D. Manual de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular [Internet]. 6^a ed. Escofet; **2022** [acceso 25/08/2024]. Disponible en: <https://www.manual-tph.com/>.
11. Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. **2005**;106(8):2912-9. DOI: 10.1182/BLOOD-2005-05-2004.
12. Gratwohl A, Stern M, Brand R, Apperley J, Baldomero H, De Witte T, et al. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer*. **2009**;115(20):4715-26. DOI: 10.1002/CNCR.24531.
13. Armand P, Gibson CJ, Cutler C, Ho VT, Koreth J, Alyea EP, et al. A disease risk index for patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. **2012**;120(4):905-13. DOI: 10.1182/BLOOD-2012-03-418202.
14. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant*. **2019**;54(10):1525-52. DOI: 10.1038/S41409-019-0516-2.
15. Snowden JA, Sánchez-Ortega I, Corbacioglu S, Basak GW, Chabannon C, de la Camara R, et al. Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022. *Bone Marrow Transplant*. **2022**;57(8):1217-39. DOI: 10.1038/s41409-022-01691-w.
16. Sable CA, Donowitz GR. Infections in Bone Marrow Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. **1994**;18:273-84. DOI: 10.1093/clinids/18.3.273.
17. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. **2009**;15(10):1143-238. DOI: 10.1016/j.bbmt.2009.06.019.

18. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* **2015**;21(3):389-401.e1. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001.
19. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* **2005**;11(12):945-56. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.09.004.
20. Junghanss C, Marr KA. Infectious risks and outcomes after stem cell transplantation: are nonmyeloablative transplants changing the picture? *Curr Opin Infect Dis.* **2002**;15(4):347-53. DOI: 10.1097/00001432-200208000-00001.
21. Sanz MÁ, Montoro J, Balaguer-Roselló A, Chorão P, Villalba M, Gómez I, et al. Longitudinal outcome over four decades of allogeneic stem cell transplantation: a single center experience. *Bone Marrow Transplant.* **2024**;59(10):1376-86. DOI: 10.1038/s41409-024-02319-x.
22. Fundación Josep Carreras contra la Leucemia. Memoria REDMO 2024 [Internet]. **2024** [acceso 14/08/2025]. Disponible en: <https://fcarreras.org/documentacion-pdf/memoria-redmo-2024/>.
23. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria de Actividad de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos. España. 2024 [Internet]. **2024** [acceso 02/07/2025]. Disponible en: <https://www.ont.es/wp-content/uploads/2025/07/Memoria-TPH-2024.pdf>.
24. Moreno Camacho A, Ruiz Camps I. Infección nosocomial en el paciente receptor de un trasplante de órgano sólido o de precursores hematopoyéticos. *Enferm Infect Microbiol Clin.* **2014**;32(6):386-95. DOI: 10.1016/j.eimc.2014.05.002.
25. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance [Internet]. **2023** [acceso 28/11/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

26. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* **2022**;399(10325):629-55. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
27. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). Sobre la Resistencia [Internet]. [acceso 28/11/2024]. Disponible en: <https://www.resistenciaantiboticos.es/es/sobre-la-resistencia>.
28. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect.* **2015**;6:22-9. DOI: 10.1016/j.nmni.2015.02.007.
29. World Health Organization (WHO). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. **2017** [acceso 28/11/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
30. World Health Organization (WHO). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis [Internet]. Geneva; **2017** sep [acceso 28/11/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>.
31. Center for Infectious Disease Research and Policy (CIDRAP). WHO identifies antibiotic-resistant «priority pathogens» [Internet]. **2017** [acceso 03/12/2024]. Disponible en: <https://www.cidrap.umn.edu/antimicrobial-stewardship/who-identifies-antibiotic-resistant-priority-pathogens>.
32. World Health Organization (WHO). WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health [Internet]. **2024** [acceso 03/12/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>.
33. World Health Organization (WHO). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. Geneva;

- 2024 may [acceso 03/12/2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>.
34. Center for Infectious Disease Research and Policy (CIDRAP). WHO updates bacterial priority pathogens list [Internet]. 2024 [acceso 03/12/2024]. Disponible en: <https://www.cidrap.umn.edu/antimicrobial-stewardship/who-updates-bacterial-priority-pathogens-list>.
35. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2023 [Internet]. Stockholm; 2024 nov [acceso 03/12/2024]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-ears-net-annual-epidemiological-report-2023#:~:text=In%202023%2C%20the%20estimated%20total,4.79%20per%20100000%20population>.
36. Peñalva G, Cantón R, Pérez-Rodríguez MT, González-López JJ, Rodríguez-Baño J, Barrio-Tofiño E del, et al. Burden of bacterial antimicrobial resistance among hospitalised patients in Spain: findings from three nationwide prospective studies. *Lancet Reg Health Eur.* 2025;51. DOI: 10.1016/j.lanepe.2025.101220.
37. Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, Livermore DM, Averbuch D, Cordonnier C, et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect.* 2014;68(4):321-31. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.12.006.
38. Mikulska M, Del Bono V, Viscoli C. Bacterial infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(6):451-8. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000088.
39. Gudiol C, Bodro M, Simonetti A, Tubau F, González-Barca E, Cisnal M, et al. Changing aetiology, clinical features, antimicrobial resistance, and outcomes of bloodstream infection in neutropenic cancer patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(5):474-9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03879.x.
40. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, Muñoz A, et al. Analysis of 4758 *Escherichia coli* bacteraemia episodes: Predictive factors for isolation of

- an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. *J Antimicrob Chemother.* **2009**;63(3):568-74. DOI: 10.1093/jac/dkn514.
41. Oliveira AL, de Souza M, Carvalho-Dias VMH, Ruiz MA, Silla L, Tanaka PY, et al. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug-resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **2007**;39(12):775-81. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705677.
 42. Gudiol C, Calatayud L, Garcia-Vidal C, Lora-Tamayo J, Cisnal M, Duarte R, et al. Bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. *J Antimicrob Chemother.* **2010**;65(2):333-41. DOI: 10.1093/JAC/DKP411.
 43. Bousquet A, Malfuson J V, Sanmartin N, Konopacki J, Macnab C, Souleau B, et al. An 8-year survey of strains identified in blood cultures in a clinical haematology unit. *Clin Microbiol Infect.* **2014**;20(1). DOI: 10.1111/1469-0691.12294.
 44. Satlin MJ, Jenkins SG, Chen L, Helfgott D, Feldman EJ, Kreiswirth BN, et al. Septic shock caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacter gergoviae* in a neutropenic patient with leukemia. *J Clin Microbiol.* **2013**;51(8): 2794-6. DOI: 10.1128/JCM.00004-13.
 45. Gudiol C, Tubau F, Calatayud L, Garcia-Vidal C, Cisnal M, Sánchez-Ortega I, et al. Bacteraemia due to multidrug-resistant gram-negative bacilli in cancer patients: Risk factors, antibiotic therapy and outcomes. *J Antimicrob Chemother.* **2011**;66(3):657-63. DOI: 10.1093/jac/dkq494.
 46. Averbuch D, Tridello G, Hoek J, Mikulska M, Akan H, Yañez San Segundo L, et al. Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Rods Causing Bacteremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Intercontinental Prospective Study of the Infectious Diseases Working Party of the European Bone Marrow Transplantation Group. *Clin Infect Dis.* **2017**;65(11):1819-28. DOI: 10.1093/cid/cix646.
 47. Chumbita M, Puerta-Alcalde P, Yañez L, Cuesta MA, Chinea A, Morales IE, et al. Resistance to empirical β -lactams recommended in febrile neutropenia guidelines

- in Gram-negative bacilli bloodstream infections in Spain: A multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* **2022**;77(7):2017-23. DOI: 10.1093/jac/dkac135.
48. Stoma I, Littmann ER, Peled JU, Giralt S, van den Brink MRM, Pamer EG, et al. Compositional Flux Within the Intestinal Microbiota and Risk for Bloodstream Infection With Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* **2021**;73(11):E4627-35. DOI: 10.1093/cid/ciaa068.
49. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* **2012**;55(7):905-14. DOI: 10.1093/cid/cis580.
50. del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martínez M. Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference. *Enferm Infect Microbiol Clin.* **2018**;36(4):241-5. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.02.007.
51. Sebastián-Domingo JJ, Sánchez-Sánchez C. From the intestinal flora to the microbiome. *Rev Esp Enferm Dig.* **2018**;110(1):51-6. DOI: 10.17235/REED.2017.4947/2017.
52. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* **2014**;38(5):996-1047. DOI: 10.1111/1574-6976.12075.
53. Latorre-Pérez A, Hernández M, Iglesias JR, Morán J, Pascual J, Porcar M, et al. The Spanish gut microbiome reveals links between microorganisms and Mediterranean diet. *Sci Rep.* **2021**;11(1). DOI: 10.1038/s41598-021-01002-1.
54. Le Guern R, Stabler S, Gosset P, Pichavant M, Grandjean T, Faure E, et al. Colonization resistance against multi-drug-resistant bacteria: a narrative review. *J Hosp Infect.* **2021**;118:48-58. DOI: 10.1016/J.JHIN.2021.09.001.
55. Olofsson LE, Bäckhed F. The Metabolic Role and Therapeutic Potential of the Microbiome. *Endocr Rev.* **2022**;43(5):907-26. DOI: 10.1210/ENDREV/BNAC004.

56. Gebrayel P, Nicco C, Al Khodor S, Bilinski J, Caselli E, Comelli EM, et al. Microbiota medicine: towards clinical revolution. *J Transl Med.* **2022**;20(1). DOI: 10.1186/S12967-022-03296-9.
57. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li H Bin. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci.* **2015**;16(4):7493-519. DOI: 10.3390/ijms16047493.
58. Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* **2016**;375(24):2369-79. DOI: 10.1056/nejmra1600266.
59. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* **2014**;16(7):1024-33. DOI: 10.1111/cmi.12308.
60. Laterza L, Rizzatti G, Gaetani E, Chiusolo P, Gasbarrini A. The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* **2016**;8(1). DOI: 10.4084/MJHID.2016.025.
61. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med.* **2016**;8(339). DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2311.
62. Taur Y, Pamer EG. The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* **2013**;26(4):332-7. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3283630dd3.
63. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* **2014**;20(5):640-5. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.01.030.
64. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic

- hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. **2014**;124(7):1174-82. DOI: 10.1182/blood-2014-02-554725.
65. Kusakabe S, Fukushima K, Maeda T, Motooka D, Nakamura S, Fujita J, et al. Pre- and post-serial metagenomic analysis of gut microbiota as a prognostic factor in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. **2020**;188(3):438-49. DOI: 10.1111/bjh.16205.
66. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. **2020**;382(9):822-34. DOI: 10.1056/NEJMoa1900623.
67. Biagi E, Zama D, Rampelli S, Turroni S, Brigidi P, Consolandi C, et al. Early gut microbiota signature of aGvHD in children given allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological disorders. *BMC Med Genomics*. **2019**;12(1). DOI: 10.1186/s12920-019-0494-7.
68. Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garcia K, et al. Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease after Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*. **2017**;65(12):1984-91. DOI: 10.1093/cid/cix699.
69. Peled JU, Devlin SM, Staffas A, Lumish M, Khanin R, Littmann ER, et al. Intestinal microbiota and Relapse after hematopoietic-Cell transplantation. *J Clin Oncol*. **2017**;35(15):1650-9. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.3348.
70. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. **2015**;21(8):1373-83. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016.
71. Masetti R, Zama D, Leardini D, Muratore E, Turroni S, Brigidi P, et al. Microbiome-derived metabolites in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Mol Sci*. **2021**;22(3):1-13. DOI: 10.3390/ijms22031197.

72. Kouidhi S, Souai N, Zidi O, Mosbah A, Lakhal A, Ben Othmane T, et al. High throughput analysis reveals changes in gut microbiota and specific fecal metabolomic signature in hematopoietic stem cell transplant patients. *Microorganisms*. **2021**;9(9). DOI: 10.3390/microorganisms9091845.
73. Weber D, Jenq RR, Peled JU, Taur Y, Hiergeist A, Koestler J, et al. Microbiota Disruption Induced by Early Use of Broad-Spectrum Antibiotics Is an Independent Risk Factor of Outcome after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. **2017**;23(5):845-52. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.02.006.
74. Morjaria S, Schluter J, Taylor BP, Littmann ER, Carter RA, Fontana E, et al. Antibiotic-induced shifts in fecal microbiota density and composition during hematopoietic stem cell transplantation. *Infect Immun*. **2019**;87(9). DOI: 10.1128/IAI.00206-19.
75. Wolter M, Grant ET, Boudaud M, Pudlo NA, Pereira G V., Eaton KA, et al. Diet-driven differential response of Akkermansia muciniphila modulates pathogen susceptibility. *Mol Syst Biol*. **2024**;20(6):596-625. DOI: 10.1038/s44320-024-00036-7.
76. Van Lier YF, Van Den Brink MRM, Hazenberg MD, Markey KA. The post-hematopoietic cell transplantation microbiome: Relationships with transplant outcome and potential therapeutic targets. *Haematologica*. **2021**;106(8):2042-53. DOI: 10.3324/haematol.2020.270835.
77. Wuethrich I, W. Pelzer B, Khodamoradi Y, Vehreschild MJGT. The role of the human gut microbiota in colonization and infection with multidrug-resistant bacteria. *Gut Microbes*. **2021**;13(1):1-13. DOI: 10.1080/19490976.2021.1911279.
78. Isles NS, Mu A, Kwong JC, Howden BP, Stinear TP. Gut microbiome signatures and host colonization with multidrug-resistant bacteria. *Trends Microbiol*. **2022**;30(9):853-65. DOI: 10.1016/j.tim.2022.01.013.
79. Innes AJ, Mullish BH, Ghani R, Szydlo RM, Apperley JF, Olavarria E, et al. Fecal Microbiota Transplant Mitigates Adverse Outcomes Seen in Patients Colonized With Multidrug-Resistant Organisms Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell

- Transplantation. Front Cell Infect Microbiol. **2021**;11. DOI: 10.3389/fcimb.2021.684659.
80. Saha S, Tariq R, Tosh PK, Pardi DS, Khanna S. Faecal microbiota transplantation for eradicating carriage of multidrug-resistant organisms: a systematic review. Clin Microbiol Infect. **2019**;25(8):958-63. DOI: 10.1016/J.CMI.2019.04.006.
81. Bilinski J, Robak K, Peric Z, Marchel H, Karakulska-Prystupiuk E, Halaburda K, et al. Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study. Biol Blood Marrow Transplant. **2016**;22(6):1087-93. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.02.009.
82. Copelan E, Casper JT, Carter SL, van Burik JAH, Hurd D, Mendizabal AM, et al. A Scheme for Defining Cause of Death and Its Application in the T Cell Depletion Trial. Biol Blood Marrow Transplant. **2007**;13(12):1469-76. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.08.047.
83. Hahn T, Sucheston-Campbell LE, Preus L, Zhu X, Hansen JA, Martin PJ, et al. Establishment of Definitions and Review Process for Consistent Adjudication of Cause-specific Mortality after Allogeneic Unrelated-donor Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. **2015**;21(9):1679-86. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.05.019.
84. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. **2012**;18(3):268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
85. Tabah A, Buetti N, Staiquly Q, Ruckly S, Akova M, Aslan AT, et al. Epidemiology and outcomes of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care unit patients: the EUROBACT-2 international cohort study. Intensive Care Med. **2023**;49(2):178-90. DOI: 10.1007/s00134-022-06944-2.
86. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, Spaulding AB, Ricotta E, Rebecca Prevots D, et al. Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals:

- Retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. *Clin Infect Dis.* **2018**;67(12):1803-14. DOI: 10.1093/cid/ciy378.
87. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* **1994**;(5):25-40.
88. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol.* **2003**;41(9):4264-9. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003.
89. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* **1997**;41(3):647-53. DOI: 10.1128/AAC.41.3.647.
90. Ruiz Del Castillo B, Vinué L, Román EJ, Guerra B, Carattoli A, Torres C, et al. Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum β -lactamases. *BMC Microbiol.* **2013**;13(1). DOI: 10.1186/1471-2180-13-84.
91. Galani I, Souli M, Chryssouli Z, Orlandou K, Giamarellou H. Characterization of a new integron containing bla(VIM-1) and aac(6')-IIC in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother.* **2005**;55(5):634-8. DOI: 10.1093/JAC/DKI073.
92. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist.* **2013**;19(2):94-9. DOI: 10.1089/MDR.2012.0125.
93. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* **2013**;57(12):6344-7. DOI: 10.1128/AAC.01513-13.

94. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sánchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2001**;45(4):1151-61. DOI: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.
95. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother*. **2012**;67(12):2860-4. DOI: 10.1093/JAC/DKS299.
96. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2011**;70(1):119-23. DOI: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2010.12.002.
97. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. **2007**;60(2):394-7. DOI: 10.1093/JAC/DKM204.
98. Cano ME, Rodríguez-Martínez JM, Agüero J, Pascual A, Calvo J, García-Lobo JM, et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol*. **2009**;47(7):2033-9. DOI: 10.1128/JCM.02229-08.
99. Kraychete GB, Botelho LAB, Campana EH, Picão RC, Bonelli RR. Updated Multiplex PCR for Detection of All Six Plasmid-Mediated qnr Gene Families. *Antimicrob Agents Chemother*. **2016**;60(12):7524-6. DOI: 10.1128/AAC.01447-16.
100. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat*. **2016**;29:13-29. DOI: 10.1016/J.DRUP.2016.09.001.
101. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. **2006**;50(11):3953-5. DOI: 10.1128/AAC.00915-06.

102. Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, et al. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. **2015**;46(2):157-63. DOI: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2015.03.008.
103. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. **2002**;40(6):2153-62. DOI: 10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002.
104. Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno R, Ferrer Martínez M. MICROBIOTA. 59. Del Campo Moreno R (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) [Internet]. **2016** [acceso 13/09/2023]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia59mod.pdf>.
105. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. **2013**;41(1). DOI: 10.1093/nar/gks808.
106. Lee HB, Jeong DH, Cho BC, Park JS. Comparative analyses of eight primer sets commonly used to target the bacterial 16S rRNA gene for marine metabarcoding-based studies. *Front Mar Sci*. **2023**;10. DOI: 10.3389/fmars.2023.1199116.
107. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. **2019**;37(8):852-7. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.
108. Afgan E, Nekrutenko A, Grüning BA, Blankenberg D, Goecks J, Schatz MC, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res*. **2022**;50(W1):W345-51. DOI: 10.1093/nar/gkac247.

109. QIIME 2 development team. Overview of QIIME 2 Plugin Workflows [Internet]. **2016** [acceso 14/04/2025]. Disponible en: <https://docs.qiime2.org/2023.7/tutorials/overview/>.
110. Simon A. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. **2010** [acceso 09/04/2025]. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
111. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. **2016**;32(19):3047-8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354.
112. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. **2018**;34:i884-90. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.
113. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. **2016**;13(7):581-3. DOI: 10.1038/NMETH.3869.
114. McDonald D, Jiang Y, Balaban M, Cantrell K, Zhu Q, Gonzalez A, et al. Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree. *Nat Biotechnol*. **2023**; DOI: 10.1038/s41587-023-01845-1.
115. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. **2018**;6(1). DOI: 10.1186/s40168-018-0470-z.
116. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. **2013**;30(4):772-80. DOI: 10.1093/molbev/mst010.
117. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. **2010**;5(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.

118. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*. **2013**;8(4):e61217. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0061217.
119. Lahti L, Shetty S. Microbiome R package [Internet]. **2017** [acceso 19/09/2023]. Disponible en: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/microbiome.html>. DOI: 10.18129/B9.bioc.microbiome.
120. Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, et al. vegan: Community Ecology Package [Internet]. **2024** [acceso 20/06/2024]. Disponible en: <https://github.com/vegadevs/vegan>. DOI: 10.32614/CRAN.package.vegan.
121. Cao Y, Dong Q, Wang D, Zhang P, Liu Y, Niu C. microbiomeMarker: an R/Bioconductor package for microbiome marker identification and visualization. *Bioinformatics*. **2022**;38(16):4027-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac438.
122. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. [Internet]. New York: Springer-Verlag; **2016** [acceso 20/06/2024]. Disponible en: <https://ggplot2.tidyverse.org> DOI: 10.32614/CRAN.package.ggplot2.
123. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; **2023** [acceso 20/09/2023]. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
124. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 16 [Internet]. College Station, TX: StataCorp LLC; **2019** [acceso 20/09/2023]. Disponible en: <https://www.stata.com/>.
125. Anderson M. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol*. **2001**;26:32-46. DOI: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
126. Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology*. **1993**;18:117-43. DOI: 10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x.

127. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**;12(6). DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
128. Puerta-Alcalde P, Cardozo C, Marco F, Suárez-Lledó M, Moreno E, Morata L, et al. Changing epidemiology of bloodstream infection in a 25-years hematopoietic stem cell transplant program: current challenges and pitfalls on empiric antibiotic treatment impacting outcomes. *Bone Marrow Transplant.* **2020**;55(3):603-12. DOI: 10.1038/s41409-019-0701-3.
129. Forcina A, Lorentino F, Marasco V, Oltolini C, Marcatti M, Greco R, et al. Clinical Impact of Pretransplant Multidrug-Resistant Gram-Negative Colonization in Autologous and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* **2018**;24(7):1476-82. DOI: 10.1016/J.BBMT.2018.02.021.
130. Luo H, Chen X, Jiang Z, Yan Q. Prevalence of and risk factors for intestinal colonisation by multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients with haematological malignancies: A systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* **2024**;63(1):107043. DOI: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2023.107043.
131. Gallardo-Pizarro A, Lopera C, Peyrony O, Monzo-Gallo P, Aiello TF, Martinez-Urrea A, et al. Rectal colonization by multidrug-resistant Gram-negative bacteria and subsequent bacteraemia in haematological patients. *Clin Microbiol Infect.* **2025**;31(9):1579-1583. DOI: 10.1016/j.cmi.2025.05.033.
132. Woodhouse EW, Alsoubani M, Roach DJ, Flynn DB, Lavalley M, Sheridan K, et al. Infection Risk Associated with Colonization by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: An Umbrella Review and Meta-analysis. *Open Forum Infect Dis.* **2025**;12(7). DOI: 10.1093/ofid/ofaf365.
133. Masetti R, Leardini D, Muratore E, Fabbrini M, Zama D, Baccelli F, et al. Gut microbiota diversity before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as a predictor of mortality in children. *Blood.* **2023**;142(16):1387-98. DOI: 10.1182/blood.2023020026.

134. Stein-Thoeringer CK, Nichols KB, Lazrak A, Docampo MD, Slingerland AE, Slingerland JB, et al. Lactose drives *Enterococcus* expansion to promote graft-versus-host disease. *Science*. **2019**;366(6469):1143-1149. DOI: 10.1126/science.aax3760.
135. Han L, Zhang H, Ma P, Peng J, Li Y, Wu J, et al. Intestinal microbiota score could predict survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. **2022**;101(6):1283-94. DOI: 10.1007/s00277-022-04817-8.
136. Djukovic A, Garzón MJ, Canlet C, Cabral V, Lalaoui R, García-Garcera M, et al. Lactobacillus supports Clostridiales to restrict gut colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Nat Commun*. **2022**;13(1). DOI: 10.1038/s41467-022-33313-w.

8. ANEXOS

ANEXO I: ARTÍCULO ACEPTADO POR *INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES*

- *Carta de aceptación del editor.*

9/10/25, 9:27

[View Letter](#)

Date: 08 Oct 2025
To: "Maria Carmen Fariñas" mcarmen.farinas@scsalud.es
From: "Eskild Petersen" eskild.petersen@gmail.com
Subject: Manuscript Decision THEIJD-D-25-01843R1

Manuscript Number: THEIJD-D-25-01843R1
 Article Title: Changes in the bacterial profile and diversity of the gut microbiota in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients.

Corresponding Author: MD, PhD María Carmen Fariñas
International Journal of Infectious Diseases

08 Oct 2025

Dear MD, PhD Fariñas,

I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the International Journal of Infectious Diseases. Final comments of the reviewers are appended below.
 The manuscript will be forwarded to the Production department for typesetting. Proofs for approval will be sent to the corresponding author within the next 3 weeks.

We appreciate and value your contribution to International Journal of Infectious Diseases

Comments to Authors:

. We regularly invite authors of recently published manuscript to participate in the peer review process. If you were not already part of the journal's reviewer pool, you have now been added to it. We look forward to your continued participation in our journal, and we hope you will consider us again for future submissions.

Thank you for submitting your work to the journal.

Kind regards,

Eskild Petersen, MD, DMSc, MBA
 Editor-in-Chief
International Journal of Infectious Diseases

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5l8thD9XtE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript (https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/).

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/thejid/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.



- *Artículo.*

International Journal of Infectious Diseases 161 (2025) 108117



Changes in the bacterial profile and diversity of the gut microbiota in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients[☆]



Claudia González-Rico^{1,2}, Marta Hernández³, Jorge Rodríguez-Grande^{2,4}, Sara Fernández-Luis⁵, Arancha Bermúdez Rodríguez^{5,6}, Ana Julia González-Huerta⁷, Eugenia Llaneza Velasco^{8,9}, Lourdes Vázquez López¹⁰, Inmaculada García García¹¹, Francisco Arnaiz de las Revillas^{1,2,6}, Concepción Fariñas-Álvarez^{2,12}, Jorge Calvo Montes^{2,4}, Alain Ocampo-Sosa^{2,4}, Marta Fernández-Martínez^{13,†}, María Carmen Fariñas^{1,2,6,‡,*}, on Behalf of MICROBIOMA-SCT Study Group[¥]

¹ Infectious Diseases Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

² CIBER de Enfermedades Infectuosas, Instituto de Salud Carlos III (CIBERINFEC, ISCIII), Madrid, Spain

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Valladolid (UVa), Valladolid, Spain

⁴ Microbiology Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

⁵ Hematology Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

⁶ University of Cantabria, Santander, Spain

⁷ Hematology Service, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

⁸ Microbiology Service, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

⁹ Translational Microbiology Group, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain

¹⁰ Hematology Service, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

¹¹ Microbiology Service, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

¹² Division of Health Care Quality, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

¹³ Advanced Therapies Unit, Blood and Tissue Bank of Cantabria, Marqués de Valdecilla Foundation, Hospital de la Santa Cruz de Liencres, Liencres, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2025

Revised 3 October 2025

Accepted 8 October 2025

Keywords:

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
Gut microbiota
Diversity
16S rRNA gene sequencing
Differential abundance

ABSTRACT

Objectives: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is associated with significant alterations in gut microbiota (GM) composition, affecting transplant success. This study aimed to correlate these GM changes with post-transplant (post-HSCT) outcomes.

Methods: A prospective multicentre cohort study was conducted between June 2017 and December 2021 in three Spanish hospitals. Stool samples from allo-HSCT recipients were collected before HSCT, and at 14-, 30-, 60-, and 100-days post-HSCT. Bacterial 16S rRNA gene sequences were characterized and microbial diversity assessed.

Results: Analysis of 409 samples from 95 patients revealed significant longitudinal GM shifts. Alpha diversity significantly decreased at days 14 ($P < 0.001$), 30 ($P < 0.001$), and 60 ($P = 0.002$) compared to baseline. A distinct shift in dominant taxonomic profiles was observed, notably a significant decrease in *Blautia* abundance ($P < 0.001$). Patients with acute gastrointestinal graft-versus-host disease (GI-GVHD) ($P = 0.009$), bacteraemia ($P = 0.014$), or death ($P < 0.001$) exhibited significantly lower *Blautia* levels. LEfSe analysis identified 22 differential taxa between deceased and surviving patients; the former showed higher abundance of potential pathogens such as *Enterococcus_H* ($P = 0.026$), *Enterococcus_A* ($P = 0.019$), and *Staphylococcus* ($P = 0.009$).

[☆] Key point: Dysregulation of the gut microbiota composition is associated with a worse prognosis in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

^{*} Corresponding author. María Carmen Fariñas, Infectious Diseases Service, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Av. Valdecilla, s/n, 39008 Santander, Spain.

^{E-mail addresses:} claudia.glez.rico@gmail.com (C. González-Rico), mcarmen.farinash@scsalud.es, farinasc@unican.es (M.C. Fariñas).

[†] M. Carmen Fariñas Álvarez and Marta Fernández Martínez shared senior authorship.

[‡] The MICROBIOMA-SCT study group members are listed in the acknowledgements section.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2025.108117>

1201-9712/© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Conclusions: Significant variations in the GM's taxonomic profiles and relative abundances post-HSCT, particularly the decrease in *Blautia* and the increase in certain pathogens, are associated with poorer clinical outcomes.

© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a well-established therapy for bone marrow diseases [1]. Infections, graft-versus-host disease (GVHD), and hematological malignancy recurrence remain major causes of morbidity and mortality post-transplant (post-HSCT).

Recent studies have highlighted the critical role of the gut microbiota (GM), a complex ecosystem essential for maintaining human health [2–4]. The GM can be altered by numerous factors, such as diet, physical activity, and exposure to different treatments. Notably, the Mediterranean Diet, prevalent in our region and characterized by high fibre and unsaturated fat intake, has been shown to significantly impact the composition of the gut microbiome [5]. However, the potential influence of local dietary habits, alongside other regional factors, on the GM composition in allo-HSCT recipients remains underexplored. It is uncertain whether these factors could modulate the microbiota differently compared to cohorts from other geographic areas, where dietary and environmental conditions may vary.

On the other hand, during allo-HSCT, the gut microbiota undergoes substantial changes, leading to dysbiosis—a loss of diversity. This dysbiosis has been associated with an increased risk of systemic infections [6–10], higher GVHD frequency [11], and increased mortality [10,12,13]. Persistent dysbiosis during granulocyte recovery predicts poor overall survival and disease relapse [13–15].

Therefore, it is particularly relevant to characterize the intestinal microbiota in the context of allo-HSCT within our country to better understand its impact on clinical outcomes. In this line, the present study aimed to characterize GM composition and dynamics during the first 100 days post-HSCT, analysing its association with infectious episodes, GVHD, and mortality.

Methods

Study design and follow-up

A prospective cohort study was conducted between June 2017 and December 2021, including allo-HSCT recipients over 18 years. It was performed in three Spanish teaching hospitals: University Hospital Marqués de Valdecilla (HUMV) (coordinating centre), University Central Hospital of Asturias (HUCA), and University Hospital of Salamanca (HUSAL). All patients provided informed consent.

Follow-up extended from hospital admission to one-year post-HSCT or death. Stool samples were collected before allo-HSCT, upon the patient's admission, and at days 14, 30, 60, and 100 post-HSCT with a tolerance of ± 3 days. All centres followed standard recommendations [16], and samples were frozen at -80°C until DNA extraction at the coordinating centre.

Clinical data on patient demographics, transplant details, and post-transplantation clinical course were collected at each visit.

Patient management protocols

Each centre employed its own antibiotic prophylaxis protocol. HUMV used none, while HUCA and HUSAL used quinolones

(ciprofloxacin and levofloxacin, respectively) during the neutropenic period. No formal dietary restrictions were applied, though one centre recommended a low bacterial load diet avoiding raw meat/fish, unpasteurised cheese, and sausages.

Samples selection criteria

For data analysis and sample processing, we included patients with at least one pre-transplant sample and two collected during post-HSCT follow-up. Patients who died within 30 days post-HSCT were excluded unless at least one sample post-HSCT was available.

16S rRNA library preparation and sequencing

Stool sample DNA was extracted using the QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen, Germany), quantified with a Qubit fluorometer (Invitrogen) and stored at -20°C until library preparation.

The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was PCR-amplified [17]. Sample multiplexing, library purification, and sequencing followed the Illumina '16S Metagenomic Sequencing Library Preparation' guide (San Diego, CA, USA) at the molecular biology and microbiology laboratory of the Agricultural Technology Institute of Castilla and León. Libraries were sequenced on an Illumina MiSeq platform, providing 300-bp paired-end reads.

Bioinformatics and data analysis

Bioinformatics processing is detailed in the [Supplementary Material](#).

To investigate GM dynamics, distinct sample subsets were generated: (1) Longitudinal subset: samples from baseline and days 14, 30, 60, and 100 post-HSCT; (2) Baseline subset: only baseline samples for initial microbiota composition; (3) Neutropenia subset: samples collected from transplantation to day 17.67 post-HSCT (using the median number of days for 500 neutrophil recovery as the cutoff point).

Across subsets, the inverse Simpson index was used to evaluate the richness and evenness. The Bray-Curtis dissimilarity index was used to evaluate compositional dissimilarity between microbial communities, using genus-level relative abundances (filtered at mean >0.001). Principal Coordinate Analysis (PCoA) was utilized to plot beta diversity patterns in two dimensions, and data separation was assessed using a permutation test (adonis [18] or anosim [19], based on beta dispersions). Linear discriminant analysis effect size (LEFSe) [20] was used to identify microbial biomarkers differentiating study groups.

Statistical analysis

Continuous variables were summarised as median and interquartile range (IQR) or mean \pm standard deviation (SD). Categorical variables were summarised as number of observations and frequency. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Variables not exhibiting normal distribution were analysed using the Wilcoxon rank-sum test (two categorical levels) and Kruskal-Wallis test (more than two categorical levels), with FDR-corrected pairwise tests. Cumulative survival rates were estimated using

the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test (Mantel-Haenszel). For the multivariable analysis, a binomial generalised linear model, adjusted using AIC test with a step-backward selection, was employed. All *P*-values were considered two-sided with a significance level of 0.05. Statistical analyses were performed using either STATA SE 16 [21] or R environment version 4.3.3 (2024-02-29 ucrt) [22].

Ethical considerations

All procedures were performed in accordance with current legislation, Declaration of Helsinki principles and good clinical practice guidelines.

The study was approved by Clinical Research Ethics Committee of Cantabria (Ref: ENT-MFA-2016-01, ENTHERE-SCT; 2017.112, MICROBIOMA-SCT; and NVAL21/17, MITAPH), as reference committee, and Clinical Ethics Committee of the participating centres. Written informed consent was obtained from all patients for data use and follow-up samples collection.

Results

Characteristics of the patients

A total of 95 patients and 409 stool samples were analysed across the participating centres. The clinical and transplantation characteristics of the patients are summarized in Table 1.

Taxonomic profile of microbiota

A total of 519 faecal samples were collected from 107 allo-HSCT patients. After excluding 12 patients due to insufficient samples or bioinformatics issues, 409 samples from 95 patients were analysed. First, we characterized the GM by calculating the mean relative abundance of each taxon at the phylum and genus level across the entire sample set. The 10 most abundant phyla and genera were represented (Supplemental Figure S1), and we observed significant changes over time (Figure 1). Focusing on *Blautia* abundance, Figure 2 shows lower levels in patients with acute gastrointestinal GVHD (GI-GVHD) grade 2 or higher (mean \pm SD = 0.132 \pm 0.130 in non-acute GVHD, 0.108 \pm 0.112 in grade \leq 2 GI-GVHD, and 0.069 \pm 0.090 in grade $>$ 2 GI-GVHD, *P* = 0.009), bacteraemia (0.131 \pm 0.121 in patients without bacteraemia vs 0.108 \pm 0.121 in those with, *P* = 0.014), and death (0.127 \pm 0.126 in survived patients vs 0.076 \pm 0.090 those died, *P* < 0.001). A detailed analysis of *Blautia* abundance across visits and according to clinical variables was included in the Supplementary Material.

To corroborate this association, a multivariable analysis adjusted for age, sex, conditioning intensity, progenitor source, hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index (HCT-Cl) Score, and prior antibiotic treatment was performed (details on antibiotic exposure are presented in the Supplementary Material). The results remained significant after adjustment for both GI-GVHD (OR: 0.046; 95% CI: 0.003 to 0.508) and patient mortality (OR: 0.010; 95% CI: 0.000 to 0.234). Although statistical significance was not reached for bacteraemia, the observed trend was maintained (OR: 0.448; 95% CI: 0.037 to 5.427) (Figure S2).

Alpha diversity analysis

Alpha diversity was assessed at each visit, revealing significantly higher baseline diversity (mean \pm SD = 19.46 \pm 12.73) compared to days 14 (8.69 \pm 6.78, *P* < 0.001), 30 (10.34 \pm 6.97, *P* < 0.001), and 60 (13.64 \pm 8.48, *P* = 0.002). A recovery in diversity was observed by day 100 (mean \pm SD = 15.87 \pm 7.59, *P* = 0.175) (Figure 3).

Table 1
Clinical characteristics of the study population (N = 95).

Characteristic	Patients, no. (%)
Sex	
Male	61 (64.21)
Female	34 (35.79)
Age at allo-HSCT (year)	
Median	53.69
Range	18.09-82.50
HCT-Cl score, median [IQR]	2 [1-3]
EBMT score, mean \pm SD	3.64 \pm 1.27
Underlying Disease	
Acute myeloid leukaemia	24 (25.26)
Acute lymphoid leukaemia	19 (20.00)
Myelodysplastic or myeloproliferative syndrome	15 (15.79)
Non-Hodgkin's lymphoma	10 (10.53)
Primary myelofibrosis	7 (7.37)
Hodgkin's lymphoma	5 (5.26)
Plasma cell dyscrasias	4 (4.21)
Chronic lymphocytic leukaemia	3 (3.16)
Chronic myeloid leukaemia	2 (2.11)
Other	6 (6.32)
Number of pre-treatment lines, median [IQR]	1 [1-3]
Underlying disease status	
Complete response	45 (47.37)
Complete response with MRD+	16 (16.84)
Partial response	13 (13.68)
Stable disease	15 (15.79)
Progression	6 (6.32)
Type of conditioning	
Myeloablative	58 (61.05)
Non-myeloablative	37 (38.95)
Conditioning regimen	
Flu/Bu	29 (30.53)
Flu/Mel	13 (13.68)
Flu/Cy/TBI	12 (12.63)
Cy/TBI	10 (10.53)
Flu/TBI	7 (7.37)
Flu/Treо	6 (6.32)
Others	18 (18.95)
GVHD prophylaxis	
CNI+MMF+Cy	32 (33.68)
CNI+MTX	30 (31.58)
CNI+MMF	20 (21.05)
Cy post	11 (11.58)
Others	2 (2.11)
Cell source	
Bone marrow	40 (42.11)
Peripheral blood	55 (57.89)
Donor	
HLA-identical	60 (63.16)
HLA Non-identical	6 (6.32)
HLA-Haploidentical	29 (30.53)
Antibiotic prophylaxis	
Hospitalization (days), mean \pm SD	11 (11.58)
Acute GVHD	
Gastrointestinal involvement	58 (61.05)
Chronic GVHD	19 (32.76)
Death (1 year after HSCT)	
Main causes of death	37 (38.95)
GVHD	21 (22.11)
Disease recurrence	7 (33.33)
Infection	6 (28.57)
Follow-up of survivors (months)	
Median	6 (28.57)
IQR	12.22
	7.10-12.25

Data are presented as no. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: Bu, busulfan; CNI, calcineurin inhibitor; Cy, cyclophosphamide; EBMT, European group for blood and marrow transplantation; Flu, fludarabine; GVHD, graft-versus-host disease; HCT-Cl, hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index; IQR, interquartile range; Mel, melphalan; MMF, mycophenolate mofetil; MRD, minimal residual disease; MTX, methotrexate; SD, standard deviation; TBI, total body irradiation; Treо, treosulfan.

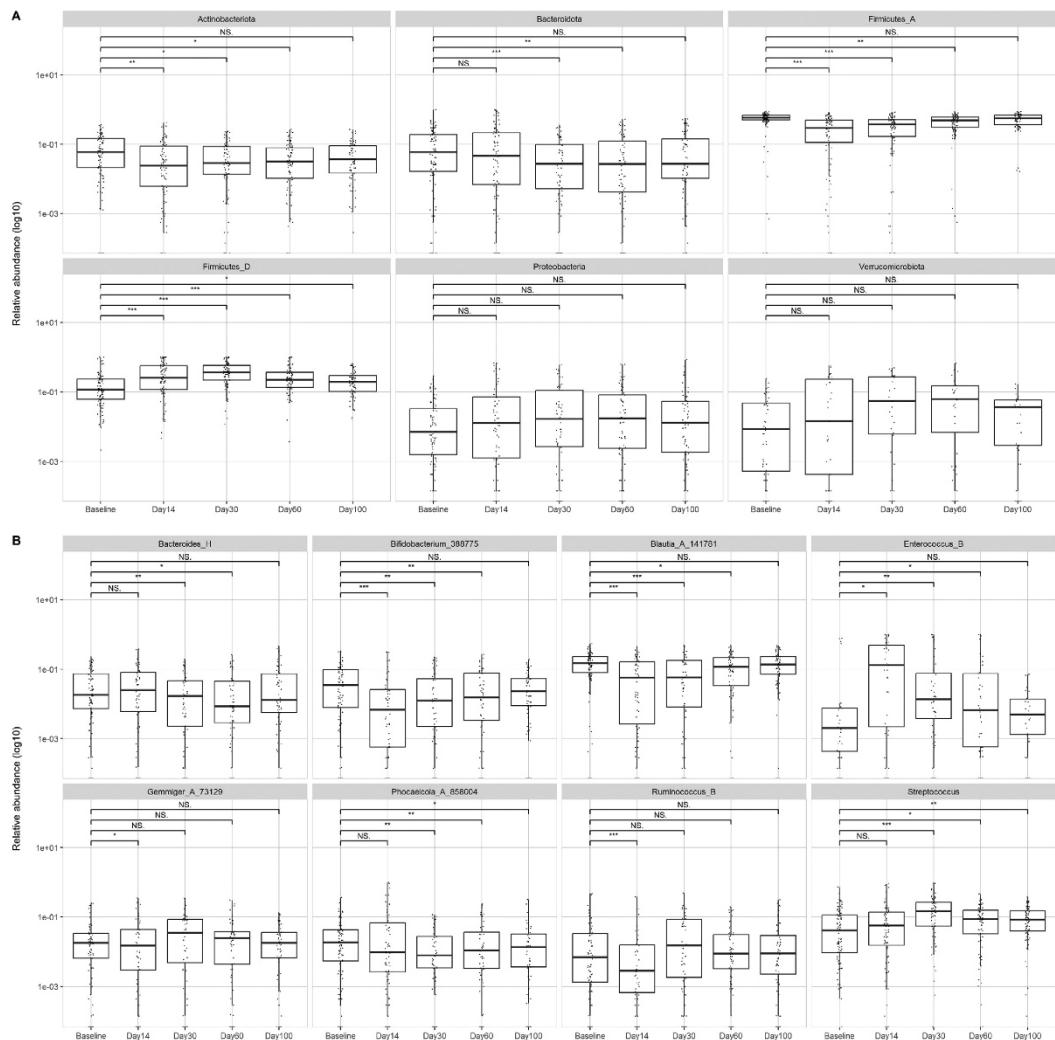


Fig. 1. Changes in the relative abundance of each taxon identified as most prevalent within the sample set, across visits. Relative abundance is plotted on a logarithmic scale (log10). (A) Phylum level. (B) Genus level. Differences in abundance between groups were assessed using Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc comparisons using the Wilcoxon rank-sum test with false discovery rate (FDR) correction. *Indicates significant differences between the two groups with a P -value <0.05 , **Indicates P -value <0.01 . ***Indicates P -value <0.001 . NS, denotes non-significant differences in statistical analysis. The mean relative abundance of each taxon at the phylum and genus level was calculated across the sample set. Subsequently, changes in the 10 most abundant phyla and genera were analysed per visit. Phyla Synergistota, Fusobacteriota, Desulfovibrionota and Firmicutes_C have not been included in the representation because they are found in very low proportion. Genera *Escherichia* and *Akkermansia* have not been included because no significant differences in abundance were found during follow-up.

Across the 409 stool samples, no significant differences were found in the overall alpha diversity between the samples from patients who experienced acute GVHD (aGVHD) (mean \pm SD = 13.75 \pm 9.65 vs 13.71 \pm 10.02), acute GI-GVHD (11.89 \pm 8.31 vs 13.71 \pm 10.02) or chronic GVHD (cGVHD) (13.72 \pm 8.59 vs 13.75 \pm 10.52) events and those who did not ($P = 0.793$, 0.271 and 0.324, respectively), infection (13.78 \pm 9.9 vs 12.46 \pm 5.25, $P = 0.997$), bacteraemia (14.02 \pm 11.08 vs 13.34 \pm 7.62, $P = 0.316$), or transplant-related variables such as cell source type (bone marrow: 13.12 \pm

8.60 vs peripheral blood: 14.16 \pm 10.51, $P = 0.685$) or conditioning intensity (myeloablative: 14.29 \pm 10.49 vs non-myeloablative: 12.81 \pm 8.39, $P = 0.352$) during follow-up.

No significant difference was observed between samples from patients with or without relapse (15.36 \pm 10.59 vs 13.39 \pm 9.58, $P = 0.186$). However, it was significantly lower in samples from patients who died during follow-up compared to those who survived (11.74 \pm 9.85 vs 14.19 \pm 9.72, $P = 0.008$).

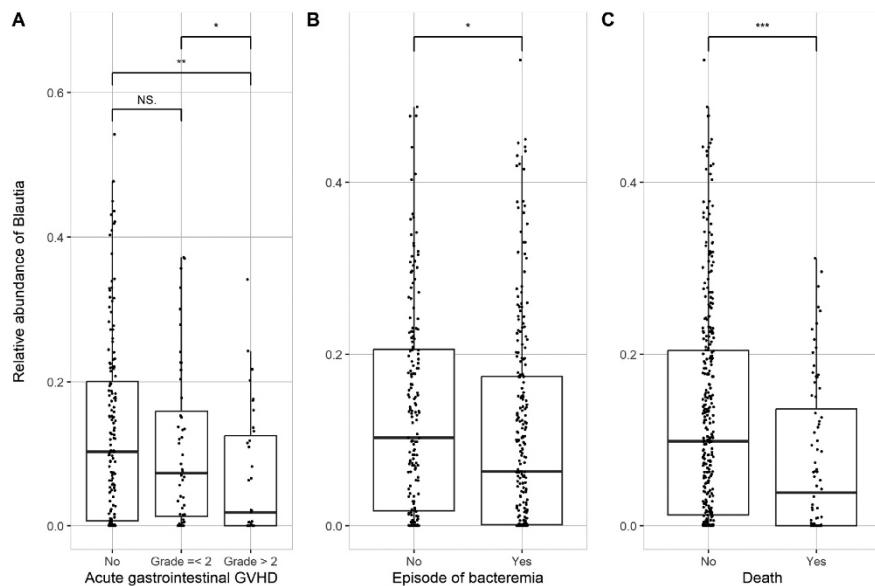


Fig. 2. Relative abundance of the genus *Blautia* in the global set of samples in relation to patient characteristics associated with worse clinical outcomes. Differences in abundance between groups were assessed using the Wilcoxon rank-sum test, and Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc comparisons using the Wilcoxon rank-sum test with false discovery rate (FDR) correction. *Indicates significant differences between the two groups with a P -value <0.05 . **Indicates P -value <0.01 . ***Indicates P -value <0.001 . NS, denotes non-significant differences in statistical analysis.

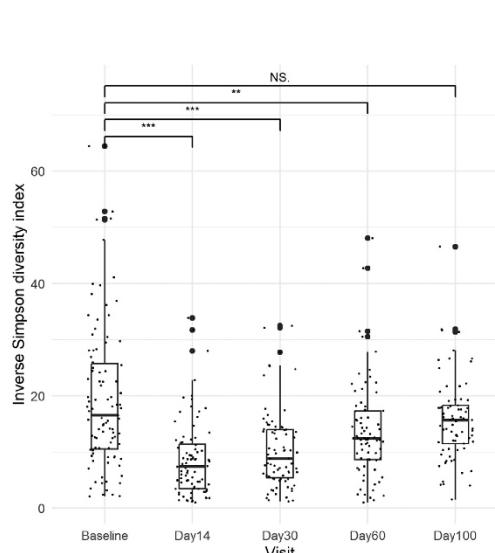


Fig. 3. Alpha diversity analysis was calculated by visit using Inverse Simpson index. Differences in alpha diversity of the GM between samples collected at each follow-up visit and the baseline visit were assessed using the Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc comparisons using the Wilcoxon rank-sum test with false discovery rate (FDR) correction. *Indicates significant differences between the two groups with a P -value <0.05 . **Indicates P -value <0.01 . ***Indicates P -value <0.001 . NS, denotes non-significant differences in statistical analysis.

Alpha diversity analysis in the baseline and neutropenia periods

For a more comprehensive analysis, samples collected at baseline and up to 17.67 days post-HSCT (a period characterized by neutropenia) were selected to analyse alpha diversity and its relationship with patient variables at these time points.

Baseline alpha diversity was significantly lower in patients with prior infections (13.75 ± 8.68 vs 22.36 ± 13.51 , $P = 0.002$), prior bacteraemia episode (11.87 ± 7.56 vs 20.88 ± 13.03 , $P = 0.008$), or had received prior antibiotic treatment (16.08 ± 10.25 vs 22.91 ± 14.13 , $P = 0.018$).

Overall survival was also examined in relation to diversity at baseline and during the neutropenia period (see Supplementary Text and Figure S3).

Beta diversity analysis

PCoA based on Bray-Curtis distances at the genus-level at baseline visit showed no clustering by an episode of GI-GVHD, bacteraemia, or death (adonis test, $P = 0.870$, 0.483 and 0.159, respectively). However, significant differences in beta diversity were found between patients with and without prior antibiotic treatment ($P = 0.032$) and between patients with low and high baseline diversity ($P = 0.001$).

During the neutropenic period, significant differences were found in samples from patients who experienced bacteraemia during follow-up ($P = 0.025$) (Figure S4) and between those with low versus high diversity during this period ($P = 0.001$).

Differential abundance analysis

LEfSe analysis was performed to identify taxa that could serve as differential markers between patients who died during follow-

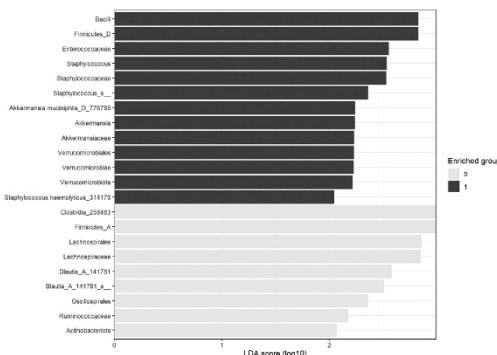


Fig. 4. LEfSe analysis identified 22 differentially abundant taxa between deceased (black bars, 1) and surviving patients (grey bars, 0).

up and those who survived (Figure 4). Using an LDA score of 2 and a *P*-value cutoff of 0.05, twenty-two markers were identified. Taxa exhibiting the strongest signals, including *Blautia*, were selected, and the relationship between their abundance and mortality was assessed. Patients who died during the study follow-up showed increased abundances of potential pathogens *Enterococcus_H* (mean=0.015 vs 0.009, *P* = 0.026), *Enterococcus_A* (0.008 vs 0.001, *P* = 0.019), and *Staphylococcus* (0.027 vs 0.005, *P* = 0.009). Similarly, *Akkermansia* abundance was also higher in non-survivors (0.054 vs 0.032, *P* = 0.017). Conversely, survivors showed a significantly higher abundance of *Gemmiger* (0.028 vs 0.017, *P* < 0.001) (Figure 5).

Further analyses explored the association of these taxa with clinical outcomes, specifically GI-GVHD and bacteraemia episodes (Figure 2 and Supplemental text and Figure S5).

Discussion

We report the results of a multicentre study that longitudinally profiled the GM of patients undergoing allo-HSCT for various hematological diseases. To our knowledge, this is the first Spanish study to comprehensively profile GM dynamics in this patient population.

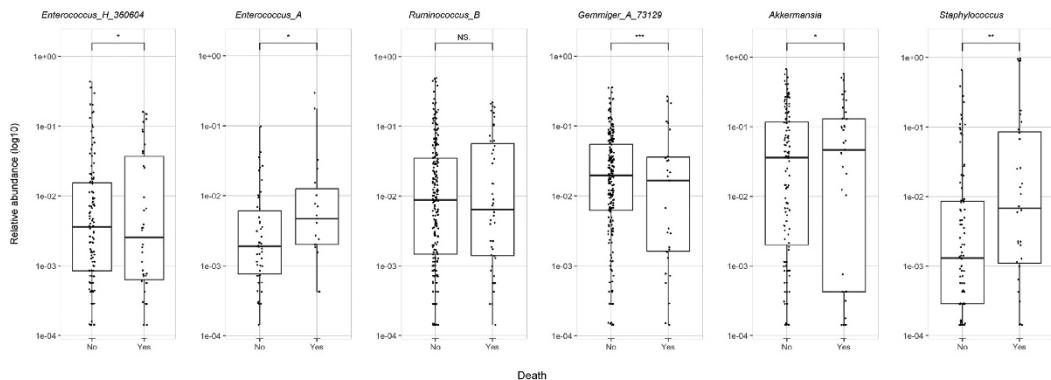


Fig. 5. Differential abundance of each taxa according to mortality. Taxa exhibiting the strongest signals in LEfSe analysis of Fig. 4 were selected. Relative abundance is plotted on a logarithmic scale (log10). Differences in abundance between groups were assessed using the Wilcoxon rank-sum test. *Indicates significant differences between the two groups with a *P*-value <0.05. **Indicates *P*-value <0.01. ***Indicates *P*-value <0.001. NS, denotes non-significant differences in statistical analysis.

lower abundance of the *Blautia* genus compared to those with better outcomes.

These findings suggest that the microbiota composition in these patients may be primarily influenced by their underlying disease and associated treatments, independent of geographic region and dietary variations.

Regarding alpha diversity, no significant associations were observed between overall alpha diversity and patient factors associated with poor prognosis, including aGVHD or cGVHD, infections, or bacteraemia episodes during follow-up, despite these factors being linked to a low alpha diversity in previous studies [14,25]. However, it is important to note that patients who died during follow-up exhibited significantly lower overall alpha diversity compared to those who survived.

A history of pre-transplant infection, bacteraemia, or prior antibiotic treatment were significantly associated with decreased GM diversity. Previous studies consistently linked reduced microbiota diversity to impaired overall survival [10,12,13], a finding replicated in our study. To evaluate the impact of baseline and neutropenia period microbiota diversity on overall survival, patients were stratified based on these metrics. Although not statistically significant, a trend towards lower one-year survival was observed in patients with lower diversity in both periods compared to those with higher diversity, as previously reported by Masetti et al. [24].

PCoA analysis based on genus-level relative abundances did not reveal a distinct clustering of patient samples according to the aforementioned characteristics. Biagi et al. [11] reported similar findings regarding the development or absence of GVHD, which they associated with the presence and abundance of specific taxa. Although we did not identify distinct clusters based on characteristics associated with worse outcomes, our analysis revealed significant clustering between samples from patients with and without prior antibiotic exposure and between those with high and low diversity at both baseline and neutropenia period. These findings are related to the data previously presented and seem to indicate that there are significant changes in the taxonomic profiles of the intestinal microbiota of our patients.

Analysis of the taxa exhibiting the strongest signal in the LEfSe analysis revealed that deceased patients presented a higher abundance of potentially pathogenic genera such as *Enterococcus* and *Staphylococcus*, consistent with findings reported in the literature [9,14,26].

To our knowledge, this is the first study of its kind conducted in Spain. We observed significant variations in the taxonomic profiles and relative abundances of the GM throughout follow-up. The decreased abundance of the genus *Blautia* was notably associated with poorer clinical outcomes. These findings highlight the potential impact of GM dysbiosis on patient outcomes following transplantation. Further research is warranted to elucidate the specific mechanisms underlying these associations and to develop targeted interventions to modulate the microbiota and improve patient prognosis.

Limitations

This multicentre study has inherent limitations due to possible variations in patient management protocols in the different participating hospitals. Nevertheless, allo-HSCT usually follows the recommendations established for treatment and follow-up by national and international scientific societies.

Another limitation of the study is related to sample loss during follow-up, either due to patient death or sample collection failures. This fact may have led to a loss of statistical power, failing to achieve significant values in some of the analyses performed, such as survival curves. Although a trend towards greater survival

can be observed in patients with higher GM diversity, this did not reach statistical significance.

Author contributions

Concept and design of the study: MCF, CFA, MFM, MH, and ABR; study conduction, CGR, MCF, MFM, ABR, LVL, and AJGH; clinical data collection and samples collection and processing, all authors; data curation, CGR and CFA; bioinformatic and statistical analysis, CGR, JRG, MH, and CFA; writing—original draft, CGR; writing—review and editing of the manuscript, all authors; funding acquisition, CGR and MCF. All authors critically reviewed the data and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III through the project 'PI16/01415' (Co-funded by European Regional Development Fund 'A way to make Europe') under Grant number [PI16/01415 to MCF]; Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) through the emerging researchers support program, 'NEXT-VAL' 2021 under Grant number [NVAL21/18 to CGR]; and CIBER -Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red-(CB21/13/00068), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Unión Europea—NextGenerationEU.

Ethical approval

All procedures were performed in accordance with current legislation, Declaration of Helsinki principles and good clinical practice guidelines. The study was approved by Clinical Research Ethics Committee of Cantabria (Ref: ENT-MFA-2016-01, ENTHERE-SCT; 2017J12, MICROBIOMA-SCT; and NVAL21/17, MITAPH), as reference committee, and Clinical Ethics Committee of the participating centres. Written informed consent was obtained from all patients for data use and follow-up samples collection.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The data presented in this article are part of a doctoral thesis, raw sequence data will be deposited in the NCBI Short Read Archive upon thesis defense.

Acknowledgement

The authors thank molecular biology and microbiology lab team of Agricultural Technology Institute of Castilla and León for their expertise and assistance throughout all aspects of samples processing and Library Preparation and Sequencing.

The authors acknowledge as co-authors all of the following members of MICROBIOMA-SCT study group:

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, University of Cantabria, Santander, Spain, CIBERINFE, ISCIII, Madrid, Spain: Carlos Armíñanzas, Francisco Arnaiz de las Revillas, Arancha Bermúdez Rodríguez, Jorge Calvo Montes, María Carmen Fariñas, Concepción Fariñas-Álvarez, Sara Fernández-Luis, Nuria Fraile Valcárcel, Sergio García Fernández, Claudia González-Rico, Alain Ocampo-Sosa, Jorge Rodríguez-Grande, Lucrencia Yañez San Segundo, Hospital Universitario Central de Asturias, ISPA, University of Oviedo, Oviedo, Spain:

Ana Julia González-Huerta, Ana Pilar González-Rodríguez, Eugenia Llaneza Velasco, Rubén Siguenza López, Noelia Suárez Alonso, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; Lourdes Vázquez López, Inmaculada García, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Valladolid (UVa), Valladolid, Spain; Marta Hernández, Hospital de la Santa Cruz de Liencres, Liencres, Spain, CIBERINFEC, ISCIII, Madrid, Spain; Marta Fernández-Martínez.

Preliminary results of this study were previously presented as a poster at the 33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2023, Copenhagen, Denmark; and at the 28th Congress of Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), 2025, Málaga, Spain.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijid.2025.108117.

References

- [1] Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:832–43. doi:10.1056/NEJM197504172921605.
- [2] Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Bin Li H. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:7493–519. doi:10.3390/ijms16047493.
- [3] Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med* 2016;375:2369–79. doi:10.1056/nejmra1600266.
- [4] Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* 2014;16:1024–33. doi:10.1111/cmi.12308.
- [5] Latorre-Pérez A, Hernández M, Iglesias JR, Morán J, Pascual J, Porcar M, et al. The Spanish gut microbiome reveals links between microorganisms and Mediterranean diet. *Sci Rep* 2021;11:21602. doi:10.1038/s41598-021-01002-1.
- [6] Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2012;55:905–14. doi:10.1093/cid/cis580.
- [7] Laterza L, Rizzatti G, Gaetani E, Chiusolo P, Gasbarrini A. The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016;8:e2016025. doi:10.4084/MJHD.2016.025.
- [8] Taur Y, Pamer EG. The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:332–7. doi:10.1097/CO.0b013e3283630d3.
- [9] Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:640–5. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.030.
- [10] Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling I, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014;124:1174–82. doi:10.1182/blood-2014-02-554725.
- [11] Biagi E, Zama D, Rampelli S, Turroni S, Brigidi P, Consolandi C, et al. Early gut microbiota signature of aGVHD in children given allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological disorders. *BMC Med Genomics* 2019;12:49. doi:10.1186/s12920-019-0494-7.
- [12] Kusakabe S, Fukushima K, Maeda T, Motooka D, Nakamura S, Fujita J, et al. Pre- and post-serial metagenomic analysis of gut microbiota as a prognostic factor in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2020;188:438–49. doi:10.1111/bjh.16205.
- [13] Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2020;382:822–34. doi:10.1056/NEJMoa1900623.
- [14] Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, García K, et al. Stool microbiota at neutrophil recovery is predictive for severe acute graft vs host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2017;65:1984–91. doi:10.1093/cid/cix699.
- [15] Peled JU, Devlin SM, Staftas A, Lumish M, Khanin R, Littmann ER, et al. Intestinal microbiota and relapse after hematopoietic-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2017;35:1650–9. doi:10.1200/JCO.2016.70.3348.
- [16] Alarcón Caverio T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno R, Ferrer Martínez M. MICROBIOTA. 59. Del Campo Moreno R (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cántón Moreno R, editores. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia59mod.pdf>. Accessed 13 September 2023.
- [17] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013;41:e1. doi:10.1093/nar/gks808.
- [18] Anderson M. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 2001;26:32–46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
- [19] Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecol* 1993;18:117–43. doi:10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x.
- [20] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12:R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-160.
- [21] StataCorp. *Stata statistical software: release 16*, College Station, TX: StataCorp LLC; 2019. Available from: <https://www.stata.com/> Accessed 20 September 2023.
- [22] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria; 2023. Available from: <https://www.R-project.org/>. Accessed 20 September 2023.
- [23] Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:996–1047. doi:10.1111/1574-6976.12075.
- [24] Masetti R, Leardini D, Muratore E, Fabbrini M, Zama D, Baccelli F, et al. Gut microbiota diversity before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as a predictor of mortality in children. *Blood* 2023;142:1387–98. doi:10.1182/blood.2023020026.
- [25] Stoma I, Littmann ER, Peled JU, Giralt S, van den Brink MRM, Pamer EG, et al. Compositional flux within the intestinal microbiota and risk for bloodstream infection with gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 2021;73:e4627–35. doi:10.1093/cid/ciaa068.
- [26] Stein-Thoeringer CK, Nichols KB, Lazrak A, Docampo MD, Slingerland AE, Slingerland JB, et al. Lactose drives enterococcus translocation to promote graft-versus-host disease. *Science* 2019;366:1143–9. doi:10.1126/science.aaq3760.

ANEXO II: CERTIFICADO DE FORMACIÓN TRANSVERSAL DE LA ESCUELA DE DOCTORADO



CONTINUACIÓN DE LA CERTIFICACIÓN DE FORMACIÓN
TRANSVERSAL N°: 127
DE DOÑA CLAUDIA GONZÁLEZ RICO

CERTIFICACIÓN DE FORMACIÓN TRANSVERSAL

AZCONDO SANCHEZ, FRANCISCO JAVIER, DIRECTOR DE LA ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (EDUC) / HEAD OF UNIVERSITY OF CANTABRIA DOCTORAL SCHOOL (EDUC)

CERTIFICA: Que según consta en el expediente de Doña CLAUDIA GONZÁLEZ RICO con DNI nº 71653611D, del Programa de Doctorado en Medicina y Ciencias de la Salud, ha cursado en la EDUC un total de 103,00 horas de Formación Transversal correspondiendo a:

- Nivel Básico(B): 63,00
- Nivel Avanzado(A): 40,00

That, Ms. CLAUDIA GONZÁLEZ RICO with DNI nº 71653611D, Doctorate in medicine and health sciences, has taken 103,00 hours of Transversal Courses at the EDUC.

- Basic level(B): 63,00
- Advanced level(A): 40,00

BLOQUE/MODULE I			
DENOMINACION/COURSE	NIVEL/ LEVEL	COMPETENCIA/ COMPETENCE*	HORAS/ HOURS
El marco general del Doctorado. El método en la ciencia	B		6,00
El futuro profesional de los doctorandos	A		3,00
TOTAL			9,00

BLOQUE/MODULE II			
DENOMINACION/COURSE	NIVEL/ LEVEL	COMPETENCIA/ COMPETENCE*	HORAS/ HOURS
Argumentos y falacias: como construir y reconocer discursos racionales	B	1	2,00
ChatGPT y herramientas de inteligencia artificial generativa para potenciar la investigación y el pensamiento creativo	B	2	12,00
Búsqueda de información en las primeras fases de la investigación: bases de datos y gestor bibliográfico	B	2	3,00
Gestión de versiones de archivos software con Git	B	2	10,00

Escuela de Doctorado – Universidad de Cantabria - Edificio Interfacultativo, zona norte, planta baja – 39005 Santander.
+34 942202097 - escueladocorando@unican.es

Instrumentos de ayuda en la preparación de tesis y artículos científicos	B	2	12,00
Cómo hacer una revisión sistemática de literatura	B	2	3,00
Creación de líneas de investigación multidisciplinar y presentación de resultados	B	3	2,00
Panel discussion: avoiding journal rejection	B	3	1,00
La gestión del trabajo, divulgación y equipos en remoto con herramientas digitales para la investigación	B	4	4,00
El control de la originalidad y el plagio: conceptos y herramientas para doctorandos	B	5	8,00
Elaboración de proyectos de investigación	A	1	11,00
Oportunidades de movilidad para los investigadores	A	1	3,00
Iniciación a los proyectos europeos	A	1	3,00
La Investigación más allá de la universidad. 1ª edición	A	2	10,00
Taller de técnicas de creatividad	A	3	10,00
TOTAL			94,00

Y para que conste, a petición del interesado, y surta los efectos pertinentes, expido la presente certificación, en Santander a 18 de abril de 2024 / I hereby issue this certificate in Santander on 18 April 2024.

El director / Head of the EDUC



Azcondo Sanchez, Francisco Javier



*Competencias/Competences: Básicas/Basic: 1. La ciencia y la ética en la investigación científica (1. Science and ethics in scientific research); 2. Los instrumentos de ayuda en la preparación de tesis y artículos científicos (2. Supporting tools when doing your PhD dissertation and scientific papers); 3. La preparación, redacción y presentación de publicaciones científicas (3. Preparing, writing and presenting scientific results); 4. La comunicación, la divulgación y la docencia de la ciencia (4. Communicating, divulging and teaching science); 5. La transferencia del conocimiento: propiedad intelectual y propiedad industrial (Knowledge transfer: intellectual property and industrial property). Avanzadas/Advanced: 1. La financiación de la investigación y los proyectos de investigación (Research funding and research projects); 2. La colaboración Universidad/Empresas/administraciones (Collaboration University/Companies/public administrations); 3. El pensamiento creativo (Creative thinking);

ANEXO III: CERTIFICADO DICTAMEN FAVORABLE CEIM



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE CANTABRIA
IDIVAL



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Promotor del estudio:

TÍTULO: Impacto de la colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes en las infecciones sistémicas, enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y mortalidad de pacientes receptores de trasplante alogénico de médula ósea.

CÓDIGO DE PROTOCOLO: ENT-MFA-2016-01 (ENTHERE-SCT)

TIPO DE ESTUDIO: EPA Seguimiento Prospectivo AS. (EPA-AS)

PROMOTOR: DRA. M^a CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal el Dr./Dra. **MARÍA DEL CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ**.





**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE CANTABRIA
IDIVAL**



Que el Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios postautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano, y su composición actual es la siguiente:

Presidente:

- **FERNANDO RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ (M. Alergólogo)**

Secretario:

- **T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO (M. Medicina Preventiva y Salud Pública)**

Vocales:

- **LEONOR LATASA MICHEO (Farmacéutico)**
- **ANTONIO CUADRADO LAVÍN (M. Digestivo)**
- **JUANA COBO MUÑOZ (Miembro ajeno a la profesión sanitaria)**
- **MARIO GONZÁLEZ RUIZ (M. Farmacólogo Clínico)**
- **CARMEN VALERO DIAZ DE LAMADRID (M. Internista)**
- **AGUSTÍN OTERINO DURÁN (M. Neurólogo)**
- **MARIA CINTA ALMENARA MIRAMON (M. Farmacólogo Clínico)**
- **MARÍA ALEXANDRA GUALDRÓN ROMERO (Enfermera)**
- **DIETER JOSÉ MORALES GARCÍA (Cirujano)**
- **CECILIA BECEDONIZ DE LA SIERRA (Licenciada en Derecho)**

Fundación Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) - C.I.F.: G39788773

Como queda reflejado en el Acta: **17/2016**.

Lo que firmo en Santander, a **28 de octubre de 2016**

T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a del CEIC



Edificio IDIVAL, 3^ª Planta • Avenida Cardenal Herrera Oria s/n • 39011 SANTANDER (Cantabria)
Tlfno: 942 315 515 • Fax: 942 315 517 • www.idival.org • e-mails: eclinicos3@idival.org y eclinicos4@idival.org



**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE CANTABRIA
IDIVAL**



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Estudio del Microbioma Intestinal, su composición, variaciones, e implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2017.112)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal la Dra. **MARÍA DEL CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ**.

Como queda reflejado en el Acta: **8/2017**.

Lo que firmo en Santander, a **12 de mayo de 2017**

T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a del CEIC



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretaria del COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS DE CANTABRIA

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de las Investigadoras Principales del estudio:

TÍTULO: Composición del microbioma intestinal y su implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad de injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estudio MITAPH

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: NVAL21/17)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIm, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigadoras principales la Dra. **CLAUDIA GONZALEZ RICO** y la Dra. **MARÍA DEL CARMEN FARIÑAS ÁLVAREZ**.

Como queda reflejado en el Acta: **9/2021 de 14 de mayo de 2021**.

Lo que firmo en Santander, a **18 de mayo de 2021**

SOLANAS GUERRERO Firmado digitalmente por
TOMASA SOLANAS GUERRERO
CONCEPCION - TOMASA CONCEPCION -
16788024W 16788024W
Fecha: 2021.05.18
13:10:33 +02'00'

T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretaria del CEIm

ANEXO IV: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

HIP y CI: EN THERE-SCT

v2.0 de 17 de Marzo de 2017

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: **Impacto de la colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes en las infecciones sistémicas, EICH y mortalidad de pacientes receptores de trasplante alogénico de médula ósea.**

INFORMACIÓN

Nuestro hospital está participando en un estudio multicéntrico y prospectivo que pretende obtener información sobre colonización por bacilos gramnegativos, las infecciones precoces y los factores de riesgo y pronósticos en pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, que consideramos será de utilidad para un mejor conocimiento y manejo de las infecciones y su pronóstico. Para ello, simplemente necesitamos recoger datos de la historia clínica y una serie de frotis rectales: un frotis rectal antes del trasplante y unos frotis de seguimiento al día +7, +14, +21, +30, +45, +60, +75, +90, +100, +120, +150, +180 posttrasplante. Todos los datos que se recojan serán tratados con absoluta confidencialidad y sólo serán usados para el estudio por el equipo investigador, según la Ley Orgánica 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal, mediante un código de registro y hospital. Su consentimiento no supone modificación alguna en los cuidados, pruebas diagnósticas o tratamiento que el personal de enfermería y su médico consideren apropiado aconsejarle o proporcionarle. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de este hospital. Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con el investigador responsable, el/la Dr./Dra. Tel.

A continuación, le solicitamos su consentimiento para recoger los datos necesarios para el estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Don/Doña en calidad de paciente / familiar / tutor del paciente (señálese lo que proceda), habiendo sido informado por el Dr./Dra. sobre el estudio arriba mencionado, acepto que se recojan 13 frotis rectales así como los datos de la historia clínica necesarios para la realización de dicho estudio. Entiendo que mi consentimiento es voluntario y que puedo retirarlo en cualquier momento, cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esta decisión repercuta en mis cuidados médicos.

Entiendo que mis datos entrarán en una base de datos donde se usará mi nombre y un código numérico. Toda la información relativa al estudio es confidencial teniendo únicamente acceso a la misma el personal investigador del proyecto. Mi identidad se mantendrá en el anonimato mediante la codificación de mis datos y ningún dato de carácter personal saldrá del centro. Cada equipo investigador participante tendrá un archivo que correlacione la identidad de los sujetos incluidos con el código de identificación asignado en el estudio y una base de datos independiente donde se registrarán los datos de los pacientes reclutados con el código de identificación asignado.

Entiendo que las muestras tomadas como parte del estudio serán procesadas y almacenadas en el Servicio de Microbiología local (del hospital en el que ingreso) y posteriormente serán enviadas al centro coordinador del estudio (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla) para continuar con los análisis del estudio.

Así mismo autorizo al investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada y difundida a la comunidad científica, sin que en ningún momento sea revelada mi identidad.

Entiendo que puede que yo no me beneficie directamente de este estudio y que tengo derecho a recibir o no información sobre los resultados de este estudio.

He leído este impreso, he recibido una copia del mismo y entiendo y estoy de acuerdo con la información del mismo.

Firmado:
Paciente:

Investigador:

Fecha:

Fecha:

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: **Estudio del Microbioma Intestinal, su composición, variaciones, e implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.**

INFORMACIÓN

Nuestro hospital está participando en un estudio multicéntrico y prospectivo que pretende obtener información sobre la composición del microbioma intestinal, el desarrollo de infecciones y enfermedad injerto contra huésped en pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, que consideramos será de utilidad para un mejor conocimiento y manejo de las infecciones y su pronóstico.

La microbiota intestinal es el conjunto de todos los microbios localizados en el tracto intestinal humano. La gran mayoría de estas bacterias no son dañinas para la salud y muchas son beneficiosas, siendo un factor importante para el estado de salud del organismo. Hoy en día es un ámbito de muchas investigaciones y varias publicaciones han puesto de manifiesto su implicación en el desarrollo de infecciones sistémicas y desarrollo de enfermedad injerto contra huésped, la importancia de la diversidad en su composición en el éxito o el fracaso del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y la posible relación con la colonización por microbios patógenos cuando su composición se ve alterada. Por ello pensamos que la caracterización del microbioma intestinal en el momento previo al trasplante y a lo largo del seguimiento postrasplante permitirá un mayor conocimiento de su implicación en la evolución de los pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y el diseño de nuevos abordajes terapéuticos.

Para ello, simplemente necesitamos recoger datos de la historia clínica y una serie de muestras de heces: una muestra de heces antes del trasplante y unas de seguimiento al día +14, +30, +60, +100 postrasplante. Estas muestras serán enviadas al centro coordinador del estudio (el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander) donde se procederá a la obtención del material genético y la secuenciación de los microbios presentes en las heces para su identificación y así conocer la composición de la microbiota intestinal a los diferentes tiempos marcados y ver como varía ésta al emplear distintas pautas de profilaxis antibiótica.

Todos los datos que se recojan serán tratados con absoluta confidencialidad y sólo serán usados para el estudio por el equipo investigador, según la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (BOE-A-2018-16673), mediante un código de registro y hospital. Su consentimiento no supone modificación alguna en los cuidados, pruebas diagnósticas o tratamiento que el personal de enfermería y su médico consideren apropiado aconsejarle o proporcionarle. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de este hospital. Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con el investigador responsable, el/la Dr/a., Tel

A continuación, le solicitamos su consentimiento para recoger los datos necesarios para el estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Don/Doña en calidad de paciente / familiar / tutor del paciente (señálese lo que proceda), habiendo sido informado por el Dr./Dra. sobre el estudio arriba mencionado, acepto que se recojan 5 muestras de heces así como los datos de la historia clínica necesarios para la realización de dicho estudio. Entiendo que mi consentimiento es voluntario y que puedo retirarlo en cualquier momento, cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esta decisión repercuta en mis cuidados médicos.

Entiendo que mis datos entrarán en una base de datos donde se usará mi nombre y un código numérico. Toda la información relativa al estudio es **confidencial** teniendo únicamente acceso a la misma el personal investigador del proyecto. Mi identidad se mantendrá en el anonimato mediante la codificación de mis datos y ningún dato de carácter personal saldrá del centro. Cada equipo investigador participante tendrá un archivo que correlacione la identidad de los sujetos incluidos con el código de identificación asignado en el estudio y una base de datos independiente donde se registrarán los datos de los pacientes reclutados con el código de identificación asignado.

Entiendo que las muestras tomadas como parte del estudio serán procesadas y almacenadas en el Servicio de Microbiología local (del hospital en el que ingreso) y posteriormente serán enviadas al centro coordinador del estudio (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla) para continuar con los análisis del estudio.

Así mismo autorizo al investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada y difundida a la comunidad científica, sin que en ningún momento sea revelada mi identidad.

Entiendo que puede que yo no me beneficie directamente de este estudio y que tengo derecho a recibir o no información sobre los resultados de este estudio.

He leído este impreso, he recibido una copia del mismo y entiendo y estoy de acuerdo con la información del mismo.

Firmado:

Paciente:

Investigador:

Fecha:

Fecha:

REVOCACIÓN

Yo, Don/Doña en calidad de paciente / familiar / tutor del paciente (señálese lo que proceda), revoco el consentimiento prestado en fecha para este estudio.

En Santander a.....de.....de 20.....

Fdo: Paciente o representante legal

Fdo: Investigador

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTOS INFORMADOS**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Título del estudio: **Composición del microbioma intestinal y su implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad de injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estudio MITAPH.**

INFORMACIÓN

Como ya sabe, nuestro hospital está participando en un estudio multicéntrico y prospectivo que pretende obtener información sobre la composición del microbioma intestinal, el desarrollo de infecciones y enfermedad injerto contra huésped en pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, que consideramos será de utilidad para un mejor conocimiento y manejo de las infecciones y su pronóstico. Usted ha aceptado participar en el estudio EN THERE-SCT y MICROBIOMA-SCT previamente y se le han recogido o están recogiendo muestras de heces y frotis rectales antes del trasplante y hasta los 100 días (heces) y 180 días (frotis rectales) postrasplante. Consideramos que este estudio debe ampliarse no sólo a estos días sino hasta el primer año después del trasplante, cuando la inmunosupresión es menor, ya que podría haber una recuperación de la microbiota siendo similar a la de antes del trasplante. Esto nos ayudaría a conocer su implicación en la evolución de los pacientes con Alo-TPH y al diseño de nuevos abordajes terapéuticos como estrategias de mantenimiento del microbioma.

Para ello, simplemente necesitamos emplear los datos y las muestras ya recogidas en el estudio EN THERE-SCT y MICROBIOMA-SCT y recoger datos de la historia clínica y una serie de muestras de heces y frotis rectales adicionales: al mes +6, +9 y +12 postrasplante, que recogerá en su domicilio como ya ha hecho previamente. Todos los datos que se recojan serán tratados con absoluta confidencialidad y sólo serán usados para el estudio por el equipo investigador, según la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales, mediante un código de registro y hospital. Su consentimiento no supone modificación alguna en los cuidados, pruebas diagnósticas o tratamiento que el personal de enfermería y su médico consideren apropiado aconsejarle o proporcionarle. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de este hospital. Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con el investigador responsable en su centro, el/la Dr./Dra. Tel.

Para información adicional puede ponerse en contacto con el coordinador general del estudio:

Claudia González Rico y la Dra. M. Carmen Fariñas Álvarez
Servicio de Enfermedades Infecciosas
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.
Telf. 942 31 55 43

A continuación, le solicitamos su consentimiento para recoger los datos necesarios para el estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Don/Doña en calidad de paciente / familiar / tutor del paciente (señálese lo que proceda), habiendo sido informado por el Dr./Dra. sobre el estudio arriba mencionado, acepto que se empleen las muestras ya recogidas y se recojan las muestras adicionales más arriba especificadas, así como los datos de la historia clínica necesarios para la realización de dicho estudio. Entiendo que mi consentimiento es voluntario y que puedo retirarlo en cualquier momento, cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esta decisión repercuta en mis cuidados médicos.

Entiendo que mis datos entrarán en una base de datos donde se usará mi nombre y un código numérico. Toda la información relativa al estudio es confidencial teniendo únicamente acceso a la misma el personal investigador del proyecto. Mi identidad se mantendrá en el anonimato mediante la codificación de mis datos y ningún dato de carácter personal saldrá del centro. Cada equipo investigador participante tendrá un archivo que correlacione la identidad de los sujetos incluidos con el código de identificación asignado en el estudio y una base de datos independiente donde se registrarán los datos de los pacientes reclutados con el código de identificación asignado.

Entiendo que las muestras tomadas como parte del estudio serán procesadas y almacenadas en el Servicio de Microbiología local (del hospital en el que ingreso) y posteriormente serán enviadas al centro coordinador del estudio (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla) para continuar con los análisis del estudio.

Así mismo autorizo al investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada y difundida a la comunidad científica, sin que en ningún momento sea revelada mi identidad.

Entiendo que puede que yo no me beneficie directamente de este estudio y que tengo derecho a recibir o no información sobre los resultados de este estudio.

He leído este impreso, he recibido una copia del mismo y entiendo y estoy de acuerdo con la información del mismo.

Firmado:

Paciente :.....

Investigador:

Fecha:

Fecha:

REVOCACIÓN

Yo, Don/Doña, en calidad de paciente / familiar / tutor del paciente (señálese lo que proceda), revoco el consentimiento prestado en fecha para este estudio.

En Santander a.....de.....de 20.....

Fdo: Paciente o representante legal

Fdo: Investigador

ANEXO V: DOCUMENTO DE INSTRUCCIONES ENTREGADO A PACIENTES

MICROBIOMA-SCT

Instrucciones Recogida Muestras

INSTRUCCIONES RECOGIDA DE MUESTRAS DE HECES

Título del estudio: *Estudio del Microbioma Intestinal, su composición, variaciones, e implicación en el desarrollo de infecciones y enfermedad injerto contra huésped en pacientes receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.*

Código del protocolo: *Estudio MICROBIOMA-SCT.*

Investigador Principal: Dra. M^a Carmen Fariñas Álvarez, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander

Este kit contiene:

- Hoja de Instrucciones
- Bote estéril con espátula para recogida de heces
- Bolsa de plástico con cierre hermético
- Guantes
- Hoja de Volante para identificar la muestra

Se le entregará un kit al alta hospitalaria y en cada consulta con su médico del Servicio de Hematología para la recogida de las muestras correspondientes: día 14, 30, 60 y 100 postrasplante.

Para recoger la muestra siga las siguientes indicaciones:

1. **Recoja la muestra el día antes** de su consulta en el Hospital.
2. Para recoger la muestra de heces, antes de usar al baño, levante la tapa del inodoro y coloque un pedazo de film transparente sobre la taza que cubra la superficie del inodoro (tal y como se indica en la imagen). Si es necesario asegúrelo con cinta adhesiva para evitar que la muestra caiga en el inodoro.
3. Haga una depresión en la envoltura de plástico para facilitar la recolección de la muestra. Baje la tapa del inodoro y proceda a la expulsión de heces (muestra de heces). **NO expulse la muestra en el inodoro.**
4. Evite contaminar las heces con orina.
5. **De la forma más aséptica posible** (guantes), **recoja** con la espátula que contiene el bote estéril dos cucharadas de heces (tamaño de una nuez) de la zona que **NO** esté en contacto con el plástico y páselas al bote.
6. Cierre el bote, compruebe que está correctamente cerrado y métalo en la bolsa de plástico con cierre hermético.
7. Almacene la muestra en el **congelador** (a -20°C) **antes de que transcurran 15 minutos tras la defecación.**
8. Mantenga la muestra en el congelador un mínimo de 8 horas.
9. Al día siguiente, día de la consulta, saque la muestra del congelador y entréguesela a su médico cuando llegue a la consulta.
10. Apunte en el volante la fecha y hora de recogida de la muestra.



ANEXO VI: COMUNICACIONES A CONGRESOS

- *Comunicación tipo póster presentada en el XXIII Congreso Nacional de la SEIMC en mayo de 2019 en Madrid.*



Código: 0963

e-mail: claudia.gonzalez@scsalud.es

COLONIZACIÓN INTESTINAL POR ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES EN PACIENTES CON TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS. ESTUDIO EN THERE-SCT (PI16/01415).

Claudia González-Rico¹, Marta Fernández-Martínez¹, Arancha Bermúdez Rodríguez¹, Lourdes Vázquez López², Inmaculada García García², Irene Gracia-Ahufinger³, Estefanía García-Torres³, Guillermo Maestro De La Calle⁴, Helena Lorenzo Juanes², Concepción Fariñas Álvarez¹, José María Aguado García⁴, Luis Martínez-Martínez³, M. Carmen Fariñas¹.

¹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. ²Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ³Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. ⁴Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las complicaciones infecciosas en pacientes con trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) continúan siendo responsables de la mayor parte de los fallecimientos. Actualmente está en discusión si la colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes (EMR) es un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones sistémicas, especialmente durante el período de neutropenia. El objetivo de este estudio ha sido estudiar posibles factores de riesgo de colonización intestinal y su implicación en el desarrollo de infecciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de cohortes prospectivo de pacientes con TPH en 4 hospitales españoles de tercer nivel incluidos entre mayo de 2017 y agosto de 2018. Se tomó un frotis rectal pretrasplante, semanalmente hasta el día 30 postrasplante, quincenal hasta el día 100 y mensual hasta el día 180 postrasplante. Se recogieron los datos clínicos y microbiológicos durante el seguimiento de los pacientes.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 61 pacientes (30 del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, 16 del Hospital Universitario de Salamanca, 13 del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y 2 del Hospital 12 de Octubre de Madrid), de los cuales 27 (44,3%) presentaron colonización por EMR en algún momento del seguimiento, 2 (3,3%) de ellos en el momento pretrasplante. Las características de la población de estudio se muestran en la Figura 1 y Tabla 1.

Tabla 1. Características de la población de estudio.

	Pacientes No Colonizados (N=34)	Pacientes Colonizados (N=27)	p
Sexo (Hombres), n (%)	27 (79,41)	17 (62,96)	0,155
Edad (años), media (DS)	53,68 (12,215)	51,52 (14,037)	0,524
Índice de HCT-CI, media (DS)	2,58 (2,262)	2,00 (1,745)	0,303
Factores de riesgo, n (%)			
Procedimiento invasivo en el mes previo al TPH	0	2 (7,41)	0,192
Ingresos en 6 meses previos al TPH	12 (35,29)	17 (62,96)	0,051
Infecciones en los 3 meses previos al TPH	4 (11,76)	11 (40,74)	0,015
Duración del ingreso (días), media (DS)	30,26 (8,080)	27,85 (7,868)	0,246
Número de días hasta recuperación de 100 neutrófilos, media (DS)	17,71 (11,981)	15,60 (2,466)	0,391
Número de días hasta recuperación de 500 neutrófilos, media (DS)	20,87 (12,271)	17,72 (2,979)	0,216
Toxicidad digestiva durante el seguimiento	12 (35,29)	16 (59,26)	0,031
Episodio de EICH Agudo, n (%)	21 (61,76)	14 (51,85)	0,756
Tiempo desde TPH hasta desarrollo de EICH agudo, media (DS)	48,71 (44,825)	50,94 (43,090)	0,872
Episodio de EICH Crónico, n (%)	3 (8,82)	3 (11,11)	0,683
Episodios de Infección, n (%)	26 (76,47)	18 (66,66)	1,000
Tiempo desde TPH hasta infección, media (DS)	23,46 (34,269)	22,77 (27,749)	0,939
Gravedad			
Sepsis/Sepsis grave	4 (7,27)	7 (14,89)	0,535
Shock séptico	5 (9,09)	0	

TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

EICH: enfermedad injerto contra huésped

Financiación:
Financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) RD16/0016/0007; RD16/0016/0008; RD16/0016/0002) -cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. "Una manera de hacer Europa", Programa Operativo Crecimiento Inteligente 2014-2020.

 RED ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN EN PATOLOGÍA INFECCIOSA

 FEDER
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
UNIÓN EUROPEA

 GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y UNIVERSIDADES
"Una manera de hacer Europa"

 Instituto de Salud Carlos III

- *Comunicaciones aceptadas en libro de abstracts del 30º Congreso de la ECCMID del 2020.*

Abstracts 2020

Abstract 1315

Resistance to extended-spectrum β -lactams, aminoglycosides and quinolones in multidrug-resistance *Enterobacteriales* isolated in patients receiving an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the EN THERE-SCT Study. PI16/01415

Marta Fernández-Martínez¹, Claudia González Rico², M. Aranzazu Bermudez-Rodríguez³, Irene Gracia-Ahufinger⁴, Inmaculada García-García⁵, Lourdes Vázquez⁶, Jose M. Aguado García⁷, Carmen Martín Calvo⁸, Luis Martínez-Martínez⁴, Jorge Calvo-Montes¹, M⁹ Carmen Fariñas²

¹Servicio de Microbiología, Hospital Univ. Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, ²Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Univ. Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, ³Servicio de Hematología, Hospital Univ. Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, ⁴Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Univ. Reina Sofía, Córdoba, Spain, ⁵Servicio de Microbiología, Hospital Univ. Salamanca, Salamanca, Spain, ⁶Servicio de Hematología, Hospital Univ Salamanca, Salamanca, Spain, ⁷Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Univ. 12 de Octubre, Madrid, Spain, ⁸Unidad de Gestión Clínica de Hematología, Hospital Univ. Reina Sofía, Córdoba, Spain

Background: To analyze the mechanisms of resistance to extended-spectrum β -lactams, aminoglycosides and quinolones in MDRE isolated between June 2017 and August 2019 in 44 patients of the 127 recruited in the study, who receiving an Allo-SCT in four Spanish hospitals.

Materials/methods: Overall, 117 MDRE, (AmpC-hyperproducing and/or producers of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) or carbapenemases), isolated in rectal swabs (pretransplant, weekly during the first month post-transplant, biweekly up to 100 days post-transplant and monthly up to 180 days post-transplantation) and 8 MDRE isolated from different clinical samples, were studied.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 24 antibiotics were determined by broth-microdilution (EUCAST breakpoints). PCR was performed for ESBLs (SHV, TEM, CTX-M), plasmid-mediated AmpC β -lactamases, carbapenemases (KPC, IMP, VIM, NDM, GES, OXA-48), plasmid-mediated quinolone-resistance (PMQR) (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *qoxAB*) and aminoglycoside-modifying-enzymes (AMEs) (*aac(3')-Ia*, *aac(3')-Ila*, *aac(6')-Ib*, *ant(2')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ila*). Clonal relatedness was assessed by REP-PCR and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results: The microorganisms isolated were: *E.coli* 52 (41.6%), *Enterobacter* spp. 36 (28.8%), *K.pneumoniae* 16 (12.8%), *Citrobacter* spp. 13 (10.4%) and others species 8 (6.4%) [5 *K.oxytoca*, 1 *H.alvei*, 1 *K.intermedia*, 1 *S.marcescens*]. PFGE analysis identified 19 clonal patterns in *E.coli*, 9 in *E.cloacae*, 5 in *K.pneumoniae* and 3 in *C.freundii*. The antimicrobial susceptibility, corresponding 74 MDRE (one isolate per REP-PCR pattern/antibiogram and patient) are shown in Table 1.

In seven patients MDRE were detected in clinical samples, in all but one patient, the same MDRE was detected in different rectal swabs days on the follow-up. ESBLs were detected in 60.8% and CTX-M was [47.3%] the most prevalent, 29.7% isolates were AmpC-hyperproducers. Carbapenemases were detected in 8 (10.8%) isolates: VIM [2 *E.cloacae*, one *S.marcescens* and *K.intermedia*], GES [2 *K.oxytoca* and one *E.cloacae*] and IMP [*E.aerogenes*]. AME-genes were detected in 45.9%, being *aac(6')-Ib* the most prevalent (85.3%), 50.0% of strains harboured two AME-genes. PMQR-genes were detected in 35/60 (58.3%) isolates quinolone-resistant and *qnrB* was the most prevalent (51.4%).

Conclusions: In 6 of the 44 transplant patients who were colonized by MDRE, an infection by the same microorganism was documented. *E.coli* producing CTX-M was the MDRE most prevalent followed by *Enterobacter* spp. AmpC-hyperproducer.



Abstracts 2020

Abstract 4809

Intestinal colonisation by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and infections in patients receiving an allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: the EN THERE-SCT Study [PI16/01415]

Claudia González Rico^{*1}, Marta Fernández-Martínez², M. Aranzazu Bermudez-Rodríguez³, Irene Gracia-Ahufinger⁴, Inmaculada García-García⁵, Guillermo Maestro⁶, Concepción Fariñas Álvarez⁷, Carmen Martín Calvo⁸, Jose M. Aguado García⁹, Lourdes Vázquez⁹, Luis Martínez-Martínez⁴, M⁹ Carmen Fariñas¹

¹Infectious Diseases Service, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain, ²Microbiology Service, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain, ³Haematology Service, Marqués de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain, ⁴Unit of Microbiology, University Hospital Reina Sofía-IMIBIC-University of Córdoba, Córdoba, Spain, ⁵Microbiology Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁶Infectious Diseases Unit, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, ⁷Division of Health Care Quality, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain, ⁸Unit of Haematology, University Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain, ⁹Haematology Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

Background: Currently, it is being discussed whether intestinal colonization by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (MDRE) in patients receiving hematopoietic stem cell transplantation [Allo-SCT] is a risk factor for developing systemic infections. The aim of this study was to analyze the risk factors of intestinal colonization by MDRE and the development of infections in patients with Allo-SCT.

Materials/methods: multicenter prospective cohort study conducted at four third level Spanish hospitals between June 2017 and March 2019. A rectal swab was collected before Allo-SCT and then, weekly until day 30 after transplantation, every two weeks until day 100 after transplantation and monthly until day 180 after the transplant. Clinical and microbiological data were collected during patient follow-up.

Results: Sixty four patients were included (28 from Hospital 1, 20 from Hospital 2, 10 from Hospital 3 and 6 from Hospital 4). Twenty four (37.5%) patients were colonized by MDRE at some point in the follow-up, 4 (6.3%) of them before Allo-SCT. Colonized and non-colonized patients had similar demographic factors (sex, age and underlying disease), and risk factors such as HCT-CI score and previous invasive procedures, hospital admission and infections (Table 1). One hundred and sixteen episodes of infection were recorded in 51 patients: 55 (47.4%) in 22 colonized patients and 61 (52.6%) in 29 non-colonized patients. The most frequent type of infection was bacteremia (50.0% in colonized patients and 32.5% in non-colonized patients), followed by respiratory infections, CMV infection and urinary infections. There were only 5 episodes of MDRE infections in 4 patients: 1 patient developed a cellulitis due to ESBL-producing *K. pneumoniae* and a bacteremia due to AmpC-hyperproducing *E. cloacae*; 1 patient had bacteremia due to carbapenemase-producing *E. cloacae*; 1 patient a urinary infection due to carbapenemase-producing *K. oxytoca* and 1 patient a urinary infection due to ESBL-producing *C. freundii*.

Conclusions: 1. In patients with Allo-SCT, intestinal colonization by MDRE was more frequent after transplantation than before transplantation. 2. All MDRE infections occurred in patients with intestinal colonization either before or after of the infection episode.

Table 1. Characteristics of the study population by group.

	Colonized Patients (N=24)	Non-Colonized Patients (N=40)	p
Male, n (%)	16 (66.7)	30 (75.0)	0.473
Age (years), mean (SD)	54.21 (14.231)	52.43 (13.286)	0.614
HCT-CI score, mean (SD)	2.14 (1.878)	2.29 (1.944)	0.780
Risk factors, n (%)			
Invasive procedures (1 month prior)	1 (4.2)	8 (20.0)	0.134
Hospital admission (6 months prior)	15 (62.5)	23 (57.5)	0.553
Infections (3 month prior)	8 (33.3)	11 (27.5)	0.552
Hospitalization (days), mean (SD)	28.33 (8.585)	28.83 (8.688)	0.792
Immune reconstitution after Allo-SCT (days from Allo-SCT to 500 neutrophils), mean (SD)	18.36 (3.736)	18.19 (4.228)	0.874
Post-transplant patients with infections, n (%)	22 (91.7)	29 (72.5)	0.107
Time from Allo-SCT to first infection (days), mean (SD)	22.00 (26.879)	28.64 (47.109)	0.566
Number of infections, mean (SD)	2.50 (1.102)	2.10 (1.566)	0.317
Type of infections (patients), n (%)			
Bacteremia	12 (50.0)	13 (32.5)	0.445
Respiratory	11 (45.8)	10 (25.0)	0.235
CMV	11 (45.8)	10 (25.0)	0.536
Urinary	10 (41.7)	9 (22.5)	0.354
Severity of infections			
Sepsis	3 (12.5)	3 (7.5)	1.000
Septic shock	0	4 (10.0)	0.193
Death (1 year after Allo-SCT), n (%)	4 (16.7)	11 (27.5)	0.746

Presenter email address: claudia.glez.rico@gmail.com



- Comunicación tipo póster presentada en el 31º Congreso de la ECCMID en julio de 2021 online.

Resistance to extended-spectrum β -lactams, aminoglycosides and quinolones in multidrug-resistance *Enterobacteriales* (MDRE) isolated in patients receiving an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo-SCT): The EN THERE-SCT Study

Marta Fernández-Martínez (1), Claudia González-Rico (2), M Aráñazu Bermúdez-Rodríguez (3), Lucrecia Yáñez San Segundo (3), Irene Gracia-Ahufinger (4), Inmaculada García-García (5), Lourdes Vázquez (6), Guillermo Maestro de la Calle (7), Estefanía García Torres (8), Mª Eugenia Llaneza Velasco (9), Ana Pilar González-Rodríguez (10), Jorge Calvo Montes (1), Luis Martínez-Martínez (4) and M. Carmen Fariñas (2).

¹ Servicio de Microbiología, H. Univ. Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander (Spain); ² Servicio de Enfermedades Infecciosas, H. Univ. Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander (Spain); ³ Servicio de Hematología, H. Univ. Marqués de Valdecilla, Santander (Spain); ⁴ Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, H. Univ. Reina Sofía, Córdoba (Spain); ⁵ Servicio de Microbiología, H. Univ. Central de Asturias, Oviedo (Spain); ⁶ Servicio de Hematología, H. Univ. Central de Asturias, Oviedo (Spain); ⁷ Servicio de Hematología, H. Univ. Salamanca, Salamanca (Spain); ⁸ Servicio de Hematología, H. Univ. Salamanca, Salamanca (Spain); ⁹ Unidad de Enfermedades Infecciosas, H. Univ. 12 de Octubre, Madrid (Spain); ¹⁰ Unidad de Gestión Clínica de Hematología, H. Univ. Reina Sofía, Córdoba (Spain); ^{*} Servicio de Microbiología, H. Univ. Central de Asturias, Oviedo (Spain); ^{**} Servicio de Hematología, H. Univ. Central de Asturias, Oviedo (Spain).

BACKGROUND

To analyze the mechanisms of resistance to extended-spectrum β -lactams, aminoglycosides and quinolones in MDRE isolated from 65 patients who received an Allo-SCT in 5 Spanish hospitals, between June 2017 and October 2020.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains. Overall, 215 MDRE, (AmpC-hyperproducing and/or producers of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) or carbapenemases), isolated in rectal swabs (pretransplant, weekly during the first month post-transplant, biweekly up to 100 days post-transplant and monthly up to 180 days post-transplantation) and 16 MDRE isolated from different clinical samples, were studied.

Antibiotic susceptibility testing. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 24 antibiotics were determined by broth-microdilution (EUCAST breakpoints).

Molecular detection of resistance genes, PCR was performed for:

- ESBLs (SHV, TEM, CTX-M).
- plasmid-mediated AmpC β -lactamases
- carbapenemases (KPC, IMP, VIM, NDM, GES, OXA-48)
- plasmid-mediated quinolone-resistance (PMQR) (qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, qepA, qpxAB)
- aminoglycoside-modifying-enzymes (AMEs) (aac(3')-Ia, aac(3')-Ila, aac(6')-Ib, ant(2')-Ia, aphi(3')-Ia, aphi(3')-Ila)

Clonal relatedness was assessed by REP-PCR and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

CONCLUSIONS

1. Fifteen percent of the transplanted patients who were colonized by MDRE developed infection by the same microorganism.

2. *E. coli* producing *bla*_{CTX-M} was the most prevalent MDRE, followed by AmpC-hyperproducing *Enterobacter* spp.

Table 1. In vitro activity to 24 antibiotics in 112 MDRE (one isolate per PFGE-pattern/antibiogram and patient) isolated from patients with Allo-SCT transplant

Antimicrobial agent	Breakpoints EUCAST (mg/l)	MIC ₂₅	MIC ₅₀	Resistant (%)
Amoxicillin	>8	>256	>256	100.0
Amoxicillin-clavulanic	>8	256	256	84.8
Piperacillin	>16	256	>256	92.0
Piperacillin-tazobactam	>16	32	>256	58.0
Cefotaxime	>8	64	>256	61.6
Ceftazidime	>2	128	>256	93.2
Certazidime	>4	64	256	79.7
Cefepime	>4	8	>256	51.4
Atazanavir	>4	32	256	67.6
Imipenem	>4	0.25	2	5.4
Meropenem	>8	<0.125	0.5	0.9
Ertapenem	>1	<0.125	4	18.8
Gentamicin	>4	0.5	32	27.7
Tobramycin	>4	1	32	45.5
Amikacin	>16	1	8	5.2
Netilmicin	>4	1	16	31.3
Arbekacin	NA	0.5	2	NA
Nalidixic acid	NA	128	>256	NA
Ciprofloxacin	>0.5	2	256	64.3
Levofloxacin	>1	1	32	53.6
Trimethoprim-sulfamethoxazole	>4	256	>256	78.6
Tigecycline	>0.5	1	32	67.0
Fosfomycin	>32	8	128	20.5
Colistin	>2	<0.125	16	15.2

* cefotaxime using ECOFF for EUCAST >8

NA: Not available [breakpoints have not been established by EUCAST]

Figure 1. 231 MDRE isolated from 65 patients with Allo-SCT transplant

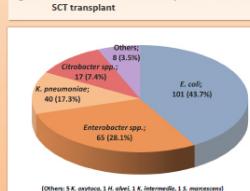
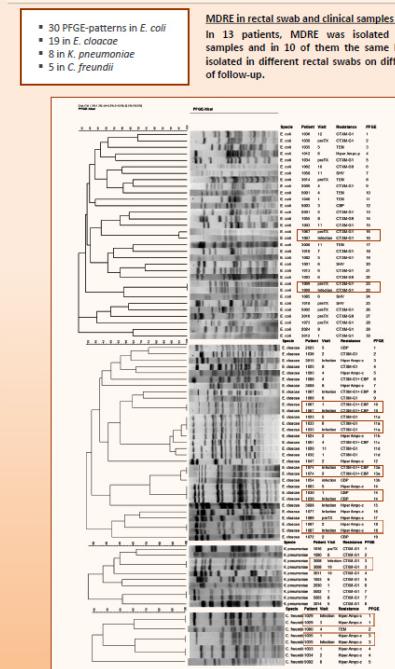


Figure 2. PFGE dendrogram of the 83 representative MDRE isolated from Allo-SCT transplant recipients.



RESULTS

MDRE in rectal swab and clinical samples (red box)

In 13 patients, MDRE was isolated in clinical samples and in 10 of them the same MDRE was isolated in different rectal swabs on different days of follow-up.

Table 2. Mechanisms of resistance to extended-spectrum β -lactams and carbapenems detected in 112 MDRE

Species (n)	bla				Carbapenemases (20)				
	CTX-M G1 (46)	CTX-M G9 (7)	bla _{TEM} (6)	bla _{SHV} (6)	AmpC hyperproducing (29)	GES (9)	IMP (5)	VIM (4)	OXA-48 (2)
<i>E. coli</i> (44)	21	7	7	6	2	0	0	0	1
<i>Enterobacter</i> spp. (38)	16	0	0	0	16	7	5	2	0
<i>K. pneumoniae</i> (13)	9	0	3	0	0	0	0	1	
<i>Citrobacter</i> spp. (12)	0	0	2	0	10	0	0	0	
Others (5)	0	0	0	0	1	2	0	2	0

- ✓ ESBLs were detected in 63.4% (71/112) isolates and *bla*_{CTX-M} was 47.3% the most prevalent.
- ✓ 25.9% (29/112) isolates were AmpC-hyperproducers.
- ✓ Carbapenemases were detected in 17.8% isolates:
 - GES in 9 (7 *E. coli* and 2 *K. pneumoniae*).
 - IMP in 5 (*Enterobacter* spp.).
 - VIM in 4 (2 *E. coli*, one *S. marcescens* and *K. intermedia*).
 - OXA-48 in 2 (*E. coli* and *K. pneumoniae*).

Table 3. Mechanisms of resistance to aminoglycosides detected in 112 MDRE

Species (n)	aac(6')-Ib (46)	aac(3')-Ia (21)	aph(3')-Ia (14)	ant(2')-Ia (7)	aph(3')-Ila (1)	No AMEs (52)
<i>E. coli</i> (44)	10	6	11	0	1	27
<i>Enterobacter</i> spp. (38)	26	6	0	6	0	11
<i>K. pneumoniae</i> (13)	5	7	1	0	0	3
<i>Citrobacter</i> spp. (12)	3	2	2	0	0	8
Others (5)	2	0	0	1	0	3

There were strains harboring simultaneously two or three AMEs genes

Table 4. Distribution of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in 112 MDRE

Species (n)	qnrB (37)	qnrS (9)	qnrD (5)	qnrA (3)	qepA (15)	qepAB (41)	No PMQR (47)
<i>E. coli</i> (44)	1	5	0	1	0	0	37
<i>Enterobacter</i> spp. (38)	18	0	5	1	11	27	6
<i>K. pneumoniae</i> (13)	9	3	0	0	0	11	0
<i>Citrobacter</i> spp. (12)	9	0	0	0	4	0	3
Others (5)	0	1	0	1	0	3	1

There were strains harboring simultaneously two PMQR genes

mfernandez@idival.org

P3907

31st ECCMID

Online

9-12 July 2021

FUNDING

- ✓ PMQR genes were detected in 65 (58.0%) isolates.
- ✓ The two most prevalent PMQR genes were qepAB (63.1%) and qnrB (56.9%), alone or in combination.
- ✓ In 84.1% *E. coli* PMQR genes were not detected.

- *Comunicación tipo póster presentada en el XXV Congreso Nacional de la SEIMC en junio de 2022 en Granada.*



XXV
CONGRESO NACIONAL
Sociedad Española de Infecciónes y Microbiología Clínica

2 - 4
JUNIO
2022

www.seimc2022.org
Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada





Valdecilla
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

Valdecilla
IDIVAL
Instituto de Investigación Sanitaria

Código: 0950

e-mail: claudia.gonzalez@scsalud.es

**INFECCIONES POR ENTEROBACTERIAS MULTIRRESISTENTES EN PACIENTES
RECEPTORES DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.
ENTHERE-SCT (PI16/01415)**

Claudia González-Rico¹, Marta Fernández-Martínez¹, Sara Fernández Luis¹, Irene Gracia-Ahufinger², Inmaculada García García³, Eugenia Llaneza Velasco⁴, Guillermo Maestro de la Calle⁵, Arancha Bermúdez Rodríguez¹, Lucrecia Yáñez San Segundo¹, Lourdes Vázquez López³, Ana Pilar González Rodríguez⁵, Concepción Fariñas Álvarez¹, Luis Martínez-Martínez², M. Carmen Fariñas¹.

¹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. ²Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. ³Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ⁴Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. ⁵Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las complicaciones infecciosas en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) son una causa importante de morbi-mortalidad. En los últimos años se ha visto un aumento de infecciones por microorganismos multirresistentes. Está en discusión si la colonización intestinal por enterobacterias multirresistentes (EMR) es un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones sistémicas. El objetivo de este estudio es evaluar los posibles factores de riesgo y el papel de la colonización intestinal en el desarrollo de infecciones por EMR.

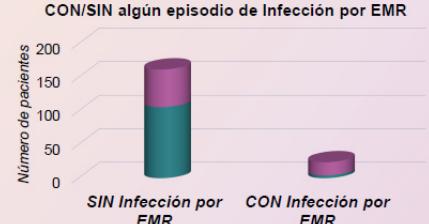
MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de cohortes prospectivo de pacientes con TPH en 5 hospitales españoles de tercer nivel (H.U. Marqués de Valdecilla, H.U. Reina Sofía, H.U. de Salamanca, H.U. Central de Asturias y H.U. 12 de Octubre) incluidos entre el 12/05/2017 y el 11/12/2020. Se recogieron datos clínicos y microbiológicos durante el seguimiento (primer año posttrasplante). Para valorar el efecto de la colonización intestinal se tomó un frotis rectal pretrasplante, semanalmente hasta el día 30 posttrasplante, quincenal hasta el día 100 y mensual hasta el día 180.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 186 pacientes de los cuales 24 (12,90 %) presentaron en algún momento del seguimiento un episodio de infección por EMR. Las características de la población de estudio se muestran en la Figura 1 y Tabla 1. En los 20 pacientes con episodio de infección por EMR en los que se detectó colonización intestinal, la EMR aislada en los frotis rectales fue la misma que el agente causal de los episodios de infección (Figura 2).

Figura 1. Colonización por EMR en pacientes CON/SIN algún episodio de Infección por EMR

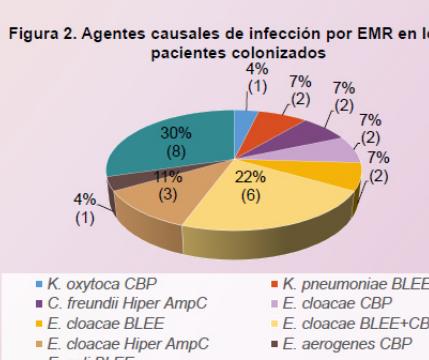


Categoría	No Colonizados	Colonizados
CON Infección por EMR	150	30
SIN Infección por EMR	162	24

Tabla 1. Características de la población de estudio.

	Pacientes SIN Infección por EMR (N=162)	Pacientes CON Infección por EMR (N=24)	p
Sexo (Hombres), n (%)	105 (64,81)	15 (62,50)	0,825
Edad (años), media (DE)	51,65 (13,64)	52,85 (17,58)	0,701
Índice de HCT-Cl, media (DE)	1,97 (1,81)	1,96 (1,49)	0,963
Índice EBMT, media (DE)	3,42 (1,31)	3,61 (1,56)	0,520
Factores de riesgo, n (%)			
Procedimiento invasivo en el mes previo al TPH	9 (5,56)	0 (0)	0,607
Ingresos en 6 meses previos al TPH	89 (54,94)	17 (70,83)	0,093
Infecciones en los 3 meses previos al TPH	42 (25,93)	9 (37,50)	0,242
Uso de tratamiento AB en los 3 meses previos	34 (20,99)	11 (45,83)	0,427
Colonización intestinal por EMR	56 (34,57)	20 (83,33)	0,000
Duración del ingreso (días), media (DE)	29,06 (7,06)	41,08 (31,74)	0,000
Número de días hasta recuperación de 500 neutrófilos, media (DE)	17,54 (7,60)	16,70 (6,29)	0,552
Toxicidad digestiva durante el seguimiento	122 (75,31)	16 (66,67)	0,181
Estancia en UCI	20 (12,35)	5 (20,83)	0,205
Necesidad de ventilación mecánica	11 (6,79)	5 (20,83)	0,030
Episodio de EICH agudo	95 (58,64)	18 (75,00)	0,126
Episodio de EICH crónico	49 (30,25)	4 (16,67)	0,227
Reingreso hospitalario	88 (54,32)	16 (66,67)	0,220
Exitus	35 (21,60)	9 (37,50)	0,106

Figura 2. Agentes causales de infección por EMR en los 20 pacientes colonizados



Agente Causal	Porcentaje	Número
K. oxytoca CBP	30%	8
C. freundii Hiper AmpC	11%	3
E. cloacae BLEE	22%	6
E. cloacae Hiper AmpC	4%	1
E. coli BLEE	4%	1
K. pneumoniae BLEE	7%	2
E. cloacae CBP	7%	2
E. cloacae BLEE+CBP	7%	2
E. aerogenes CBP	7%	2

CONCLUSIONES

La colonización intestinal por EMR fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes que desarrollaron una infección por estos microorganismos que en los pacientes que no la presentaron.

Financiación:
Financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 y el Instituto de Salud Carlos III. Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD16/0016/0007; RD16/0016/0008; RD16/0016/0002) - cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa", Programa Operativo Crecimiento Inteligente 2014-2020.

- *Comunicación tipo póster presentada en el 33º Congreso de la ECCMID en abril de 2023 en Copenhague.*



GUT MICROBIOMA ANALYSIS IN ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION (HSCT) PATIENTS

Claudia González-Rico^{1,2}, Jorge Rodríguez-Grande³, Marta Hernández Pérez⁴,
Sara Fernández-Luis⁵, Francisco Arnaiz De Las Revillas Almajano^{1,2}, Lucrecia Yañez⁶,
San Segundo^{5,8}, Arancha Bermúdez Rodríguez^{5,8}, Sergio García Fernández³, Concepción Fariñas Álvarez^{6,2},
Jorge Calvo Montes^{3,2}, Marta Fernández-Martínez^{7,2}, M. Carmen Fariñas Alvarez^{1,2,8}.

¹Infectious Diseases Service, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain; ²CIBERINFEC, ISCIII (Spain); ³Microbiology Service, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain; ⁴Agricultural Technology Institute of Castilla and León (ITACYL) - Valladolid (Spain); ⁵Haematology Service, Marqués de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain; ⁶Division of Health Care Quality, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain; ⁷HSC Processing and Cell Therapy Unit, Blood and Tissue Bank of Cantabria, Marqués de Valdecilla Foundation, Hospital de la Santa Cruz de Liencres – Liencres; ⁸University of Cantabria - Santander (Spain).

P1822


BACKGROUND

The dysbiosis that occurs during HSCT may lead to increased susceptibility to multidrug-resistant Enterobacteriaceae (MDRE) colonization, increased number of infections and worse clinical outcome. The aim of this study was to analyse the composition of the intestinal microbiome and its relationship with MDRE colonization and clinical outcome of HSCT patients.

	Colonized Patients (N=15)	Non-Colonized Patients (N=16)	P
Male, n (%)	12 (80.00)	7 (43.75)	0.043
Age (years), mean (SD)	53.64 (16.24)	52.50 (12.55)	0.8274
HCT-CI score, mean (SD)	2.2 (1.61)	3.19 (2.86)	0.2499
Risk factors, n (%)			
Conditioning régimen			0.273
Myeloablative	8 (53.33)	12 (75.00)	
Non-myeloablative	7 (46.67)	4 (25.00)	
Invasive procedures (1 month prior)	0 (0.00)	1 (5.00)	1.000
Hospital admission (6 months prior)	10 (66.67)	11 (68.75)	0.901
Infections (3 months prior)	4 (26.67)	6 (37.50)	0.704
Hospitalization (days), mean (SD)	39 (39.43)	26.75 (4.78)	0.2272
Immune reconstitution after HSCT (days from HSCT to 500 neutrophils), mean (SD)	16.93 (6.53)	16.75 (6.13)	0.9363
Post-transplant factors, n (%)			
Episode of MDRE Infection	5 (33.33)	1 (6.25)	0.083
Admission at ICU	2 (13.33)	2 (12.50)	1.000
Acute GVHD episode	7 (46.67)	11 (68.75)	0.213
Chronic GVHD episode	5 (33.33)	7 (43.75)	0.552
Underlying disease remission	8 (53.33)	8 (50.00)	0.790
Underlying disease recurrence	2 (13.33)	4 (25.00)	0.654
Death (1 year after HSCT), n (%)	3 (20.00)	4 (25.00)	1.000

HCT-CI: Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index; SD: Standard Deviation; ICU: Intensive Care Unit; GVHD: Graft-Versus-Host-Disease

Table 1. Characteristics of the study population by group

METHODS

Prospective cohort study was conducted between June 2017 and June 2021 in Marqués de Valdecilla University Hospital. Stool samples were collected before HSCT and on days 14, 30, 60 and 100 following transplantation. The V3-V4 region of the 16S rDNA was sequenced on Illumina MiSeq and the sequences were processed using the QIIME2 pipeline. All samples were down-sampled to 10k reads. Only taxa with a frequency of at least 0.5% in the analysed sample were selected. Patient outcomes were followed up to one year after HSCT.

	Conditioning régimen (n=22)	Non-myeloablative (n=13)	p-value
Shannon diversity	1.0	1.0	0.827
Death (1 year after HSCT)	12 (55.00)	10 (76.92)	0.000

RESULTS

A total of 127 samples from 31 patients were analyzed. The clinical characteristics of the patients are listed in Table 1.

Several diversity metrics were performed to determine alpha and beta diversity. PCoA analyses of Bray-Curtis, Jaccard and Shannon indices do not allow us to observe distinct groups when grouping the population according to some characteristics. However, Shannon's entropy analysis could indicate some differences according to patient death in alpha diversity (Figure-1).

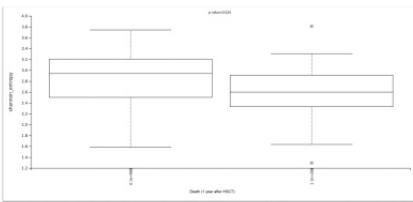
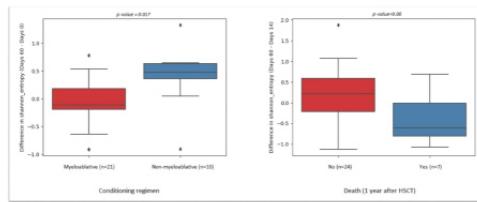


Figure 1. Alpha diversity by Shannon according to patient death.



The analysis of the taxonomic profile of each sample by heatmaps and barplots using Shannon's index did not show a common profile between sample groups, but a low overall diversity was detected. Shannon index volatility plot, Faith phylogenetic diversity and pairwise distances from Day 0 to Day 60 were evaluated for different clinical characteristics of patients, such as MDRE colonization, acute and chronic graft versus host disease (GVHD), MDRE infection, with no significant differences except for conditioning regimen and patients finally dying during follow-up (Figure-2).

CONCLUSIONS

No significant differences were found in the composition of the microbiome or in the clinical characteristics between colonized and non-colonized patients. The conditioning regimen used is a relevant factor affected to microbiome diversity. There seems to be a loss of diversity in the composition of the microbiome in those patients who die.

FUNDING: Supported by Emerging researchers support program "NEXT-VAL" 2021 - IDIVAL (NIVAL 21/18).

claudia.gonzalez@scsalud.es



- *Comunicación tipo póster presentada en las I Jornada CIBERES-CIBERINFEC en junio de 2023 en Madrid.*

claudia.gonzalez@scsalud.es
#JornadaCiberesCiberinfec
Madrid, 15-16 Junio 2023

ROLE OF INTESTINAL MICROBIOTA COMPOSITION IN HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT (HSCT)

Claudia González-Rico^{1,2,3}, Sara Fernández-Luis^{1,4}, Jorge Rodríguez-Grande^{1,5}, Marta Hernández Pérez⁶, Francisco Arnaiz De Las Revillas Almajano^{1,2,3}, Lucrecia Yáñez San Segundo^{4,7}, Arancha Bermúdez Rodríguez^{4,7}, Alain Ocampo-Sosa^{1,3,5}, Jorge Calvo Montes^{1,3,5}, Marta Fernández-Martínez^{3,8}, M. Carmen Farías Álvarez^{1,2,3,7}.

¹Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, Santander, Spain; ²Infectious Diseases Service; ³CIBERINFEC, ISCIII (Spain); ⁴Haematology Service; ⁵Microbiology Service; ⁶Agricultural Technology Institute of Castilla and León (ITACyL), Valladolid (Spain); ⁷University of Cantabria, Santander (Spain); ⁸HSC Processing and Cell Therapy Unit, Blood and Tissue Bank of Cantabria, Marqués de Valdecilla Foundation, Hospital de la Santa Cruz de Liencres, Cantabria, Spain.

INTRODUCTION

The microbiota appears to play an important role in the success of HSCT and the development of graft-versus-host-disease (GVHD). The dysbiosis that occurs during HSCT may lead to increased colonization and infection by pathogenic microorganisms, such as multidrug-resistant Enterobacteriales (MDRE).

OBJECTIVE

To analyse the composition of the intestinal microbiome during HSCT, its relationship with the clinical outcome of patients and MDRE colonization.

METHODS

Prospective cohort study was conducted between June'17 and June'21 in Marqués de Valdecilla University Hospital. Stool samples were collected before HSCT and on days 14, 30, 60 and 100 following transplantation. The V3-V4 region of the 16S rDNA was sequenced on Illumina MiSeq. Only taxa with a frequency of at least 0.2% in the analysed sample were selected.

Table 1. Characteristics of the study population.

	Patients (N=19)
Male / Female, n (%)	14 / 5 (73.68 / 26.32)
HCT-CI score, median (IQR)	2 (1-3)
Risk factors, n (%)	
Conditioning regimen	
Myeloablative	13 (68.42)
Non-myeloablative	6 (31.58)
GVHD prophylaxis	
CsA+MMF	6 (31.58)
CsA+MTX	2 (10.53)
Tacrolimus+MMF	1 (5.26)
Cyclophosphamide	3 (15.79)
Cyclophosphamide+Tacrolimus+MMF	7 (36.84)
Infections (3 months prior)	9 (47.37)
Antibiotic treatment (3 months prior)	10 (52.63)
Colonization by MDRE, n (%)	
Before HSCT	11 (57.89)
After HSCT	2 (10.53)
11 (57.89)	
Post-transplant factors, n (%)	
Episode of MDRE Infection	3 (15.79)
Acute GVHD episode	8 (42.11)
Chronic GVHD episode	9 (47.37)
Underlying disease remission	14 (73.68)
Underlying disease recurrence	2 (10.53)
Death (1 year after HSCT), n (%)	2 (10.53)

HCT-CI: Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index; IQR: Interquartile Range; GVHD: Graft-Versus-Host Disease; CsA: Cyclosporine; MMF: Mycophenolate mofetil; MTX: Methotrexate; MDRE: multidrug-resistant Enterobacteriales; HSCT: hematopoietic stem cell transplant.

RESULTS

- Preliminary analysis of 92 samples from 19 patients.
- Clinical characteristics of the patients are listed in Table 1.
- Taxonomic profile of the intestinal microbiota by time and colonization status are represented in Figure 1.
- The most abundant phylum are *Firmicutes*, followed by *Actinobacteriota* and *Verrucomicrobiota*.
- Several diversity metrics were performed to determine alpha and beta diversity (Figure 2).
- Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analyses of Bray-Curtis, Jaccard and Shannon indices do not allow us to observe distinct groups.

Figure 1. Taxonomic profile of the intestinal microbiota by visit and colonization status.

(0: Non-colonized patients; 1: Colonized patients)

Figure 2. Alfa diversity by Shannon according to colonization by MDRE status.

CONCLUSIONS

No significant differences were observed in the composition of the microbiota regarding to different characteristics of patients. Further analysis are needed to understand the relevance of the microbiome in these patients.

Funding: Supported by:

- Plan Nacional de I+D 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spanish Network for Research on Infectious Diseases, funded by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe", Operative Program Intelligent Growth 2014-2020 and grant I116/01415.
- Emerging researches support program "NEXT-VAL" 2021 - IDIVAL (IVAL 21/11).






- *Comunicación tipo póster oral y tipo poster presentadas en el XXVIII Congreso Nacional de la SEIMC en mayo de 2025 en Málaga.*

claudia.gonzalez@scsalud.es



Perfil taxonómico de la microbiota intestinal en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Claudia González-Rico^{1,2}, Marta Hernández³, Jorge Rodríguez-Grande^{2,4}, Sara Fernández-Luis⁵, Arancha Bermúdez Rodríguez^{5,6}, Lucrécia Yañez San Segundo^{5,6}, Noelia Ruiz-Alonso¹, Ana Julia González-Huerta⁷, Eugenia Llaneza Velasco⁸, Lourdes Vázquez López⁹, Inmaculada García García¹⁰, Francisco Arnaiz De Las Revillas^{1,2,6}, Concepción Fariñas-Álvarez^{2,11}, Alain Ocampo-Sosa^{2,4}, Jorge Calvo Montes^{2,4}, Marta Fernández-Martínez¹², María Carmen Fariñas^{1,2,6}.

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ²CIBERINFEC, IISICL. ³Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid (Uva), Valladolid. ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ⁶Universidad de Cantabria, Santander. ⁷Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. ⁸Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. ⁹Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ¹⁰Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ¹¹Servicio de Calidad, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ¹²Unidad de Terapias Avanzadas, Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria, Fundación Marqués de Valdecilla, Hospital de la Santa Cruz de Liencres, Liencres.

Objetivo

Caracterizar el perfil taxonómico de la microbiota intestinal durante los primeros 100 días tras un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) y su relación con la evolución clínica de los pacientes receptores de alo-TPH.

Material y métodos

Diseño: Estudio de cohortes prospectivo de pacientes receptores de alo-TPH.

Periodo: Jun a Dic. **Centros participantes:** Valdecilla, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, CIBERINFEC, IISICL, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Universidad de Cantabria, Santander, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Unidad de Terapias Avanzadas, Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria, Fundación Marqués de Valdecilla, Hospital de la Santa Cruz de Liencres, Liencres.

Seguimiento: Pre-TPH, Día 0, Día +14, Día +30, Día +60, Día +100. **Secuenciación:** Región V3-V4 ARNr 16S Illumina MiSeq.

Analisis bioinformático: Pipeline propio basado en QIIME2 (figura 1).

Figura 1. Pipeline empleado para el análisis bioinformático.

```

graph LR
    RawReads[Raw reads] --> Preprocess[Preprocesamiento de lecturas FastP  
- 225-M 30-3 -> 25 -> 4 -> 3]
    Preprocess --> Qiime2[Qiime2]
    Qiime2 --> DADA2[DADA2:  
- p=permuted 17  
- p=permuted 21  
- p=permuted 25  
- p=permuted 34]
    Qiime2 --> Greengenes[Greengenes:  
2022.10 bacteria_full  
length]
    DADA2 --> Phyloseg[Phyloseg  
Microbiome  
Vegan]
    Greengenes --> Phyloseg
    Phyloseg --> Filtrado[Filtrado:  
- Sin aspiración  
- 50-min sample  
- 9-min frequency 10]
  
```

Resul
tado
s

Se analizaron 409 muestras de heces de 95 pacientes.

Figura 2. Caracterización de la microbiota intestinal durante el alo-TPH. Se muestran los 10 taxones, a nivel de filo y género, con mayor abundancia relativa por visita.



Figura 3. Abundancia relativa por visita de los taxones más abundantes. A) a nivel de filo; B) a nivel de género.

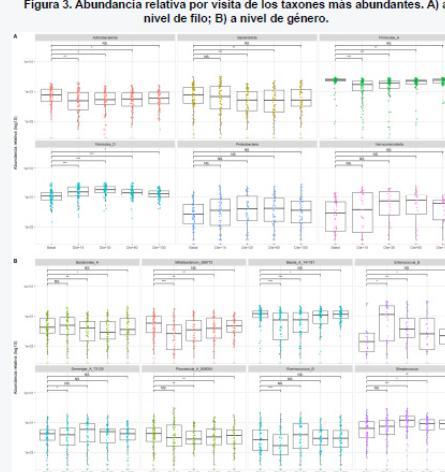
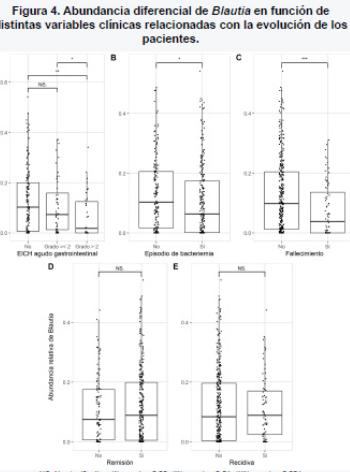


Figura 4. Abundancia diferencial de *Blautia* en función de distintas variables clínicas relacionadas con la evolución de los pacientes.



Conclusiones

1. Se observaron variaciones significativas en el perfil taxonómico de la microbiota intestinal durante los 100 primeros días post-TPH.
2. Una disminución en la abundancia del género *Blautia* se relacionó, de forma estadísticamente significativa, con una peor evolución de los pacientes receptores de alo-TPH.

BIBLIOGRAFIA



Financiación:
• Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIP) RD16/0016/00070 - cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional 'Una manera de hacer Europa', Programa Operativo Crecimiento Inteligente 2014-2020 y P11001415.
- Programa de apoyo a investigadores emergentes 'NEXT-VAL' 2021- IDIVAL (NVAL21/18).





claudia.gonzalez@sosalud.es

Cambios en la microbiota intestinal durante el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Claudia González-Rico^{1,2}, Marta Hernández³, Sara Fernández-Luis⁴, Arancha Bermúdez Rodríguez^{4,5}, Lucrecia Yáñez San Segundo^{4,5}, Jorge Rodríguez-Grande^{2,6}, Ana Julia González-Huerta⁷, Eugenia Llaneza Velasco⁸, Lourdes Vázquez López⁹, Inmaculada García García¹⁰, Francisco Arnaiz De Las Revillas^{1,2,5}, Concepción Fariñas-Alvarez^{2,11}, Alain Ocampo-Sosa^{2,6}, Jorge Calvo Montes^{2,6}, Marta Fernández-Martínez¹², María Carmen Fariñas^{1,2}.

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ²CIBERINFEC, ISCIII. ³Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid (Uva), Valladolid. ⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ⁵Universidad de Cantabria, Santander. ⁶Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ⁷Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. ⁸Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. ⁹Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ¹⁰Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ¹¹Servicio de Calidad, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander. ¹²Unidad de Terapias Avanzadas, Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria, Fundación Marqués de Valdecilla, Hospital de la Santa Cruz de Liencres, Liencres.

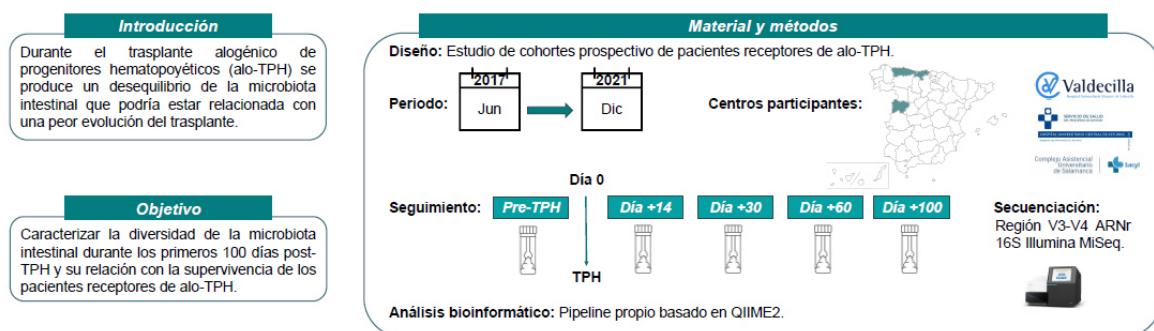


Figura 1. Análisis de alfa diversidad por visita mediante el índice de Shannon

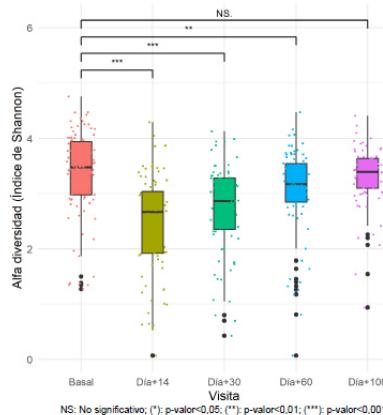
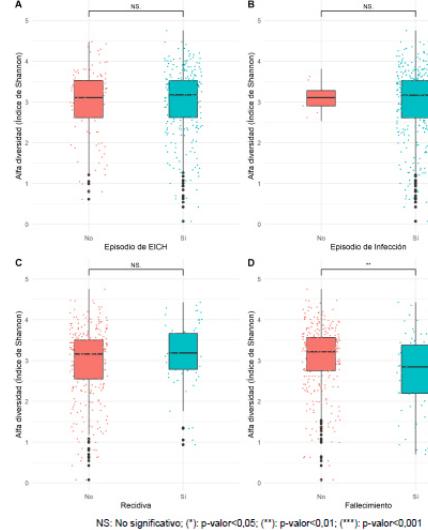


Figura 2. Análisis de alfa diversidad en función de distintas variables clínicas



Conclusiones

1. Se observaron variaciones significativas en la diversidad de la microbiota intestinal durante los 100 primeros días post-TPH.
2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la diversidad de la microbiota intestinal entre los pacientes que desarrollaron algún episodio de EICH, infección o recidiva de su enfermedad de base frente a los que no.
3. Los pacientes receptores de alo-TPH fallecidos durante el seguimiento presentaron una alfa diversidad significativamente menor que aquellos que no.



FINANCIACIÓN:
 - Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD16/0016/0007) - cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional 'Una manera de hacer Europa', Programa Operativo Crecimiento Inteligente 2014-2020 y RI16/01415.
 - Programa de apoyo a investigadores emergentes 'NEXT-VAL' 2021 - IDIVAL (NVAL21/18).

