

**IMPACTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL MICROBIOMA BACTERIANO
DE NIÑOS QUE ASISTEN AL SERVICIO DE URGENCIAS Y
HOSPITALIZACIÓN DE LA CLÍNICA COBOS MEDICAL CENTER**

María Camila Rodríguez Fernández

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2020**

**IMPACTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL MICROBIOMA BACTERIANO
DE NIÑOS QUE ASISTEN AL SERVICIO DE URGENCIAS Y
HOSPITALIZACIÓN DE LA CLÍNICA COBOS MEDICAL CENTER**

María Camila Rodríguez Fernández

**Director: Nicolás Ignacio Ramos Rodríguez
Javier Antonio Escobar Pérez**

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Médico Cirujano

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2020**



La Universidad EL BOSQUE no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia

Agradecimientos

Gracias al esfuerzo de mis padres, hermana y a Dios por guiarme y apoyarme en este proyecto. A mi universidad que me permitió formarme como profesional y me brindó la oportunidad de conocer docentes y compañeros los cuales hicieron parte de mi aprendizaje.

Agradezco a los Cobos Medical Center por permitir y hacer parte de trabajos de investigación, los cuales aportan al futuro bienestar de pacientes. También agradezco al Doctor Nicolás Ramos por aceptarme e incluirme en su grupo de investigación así como enseñarme y darme bases de como investigar.

Quiero agradecer a las personas que dedican su tiempo para leer este trabajo.

Tabla de contenido

Resumen.....	8
Abstract	9
Planteamiento del problema.....	10
Preguntas de investigación.....	12
Justificación	13
Objetivos	14
Estado del arte.....	15
Marco De Referencia	19
Hipótesis.....	25
Metodología	26
Consideraciones Éticas	38
Estrategia De Divulgación De Los Resultados	45
Referencias Bibliográficas	46

Lista de Tablas

Tabla N°1 variables..... 34
Tabla de resultados esperados y productos 44

Lista de Anexos

Cronograma.....	42
Presupuesto	43

Resumen

El microbioma del ser humano tiene gran influencia en el desarrollo del sistema inmune; por lo que es de gran importancia estudiar el impacto que tienen los antibióticos orales o parenterales administrados en el microbioma de los lactantes. Hay un cambio después de la administración de estos antibióticos; ya que hay muerte del microbioma benéfico y proliferación de familias patógenas posterior a la exposición de un antibiótico, esta proliferación de microbioma patógeno puede estar relacionada con la adquisición a largo plazo de comorbilidades.

En este estudio se realizará un muestreo secuencial por conveniencia reclutando 40 pacientes entre los 6 y los 24 meses de edad, que reciben antibióticos orales y parenterales por alguna causa patológica en el servicio de urgencias pediátricas Los Cobos Medical Center. Para poder establecer los cambios en el microbioma, medidos a través del número de especies encontradas (reportadas como diversidad- α y diversidad- β) y la proporción de las diferentes especies (reportado como porcentajes de cada especie) entre el momento previo al inicio de terapia antimicrobiana y los 7 y 60 días posteriores al inicio de la misma, será utilizado como estadístico de prueba la razón de varianzas mediante análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, esto debido a la dependencia entre las muestras analizadas.

Esta identificación de microorganismos en muestras biológicas por medio de técnicas secuenciación, se utilizara posteriormente para establecer similitudes y diferencias de este microbioma con respecto a otras poblaciones según lo reportado en bases de datos para poder asociar la microbiota encontrada con futuras comorbilidades.

Palabras clave

Microbioma, Secuenciación, ANOVA, Comorbilidades

Abstract

The microbiome of the human being has great influence on the development of the immune system; therefore, it is very important to study the impact that oral or parenteral antibiotics have on the microbiome of infants. There is a change after the administration of these antibiotics; since there is death of the beneficial microbiome and proliferation of pathogenic families after exposure of an antibiotic, this proliferation of pathogenic microbiome may be related to the long-term acquisition of comorbidities.

In this study, a sequential sampling will be carried out for convenience, recruiting 40 patients between 6 and 24 months of age, who will receive oral and parenteral antibiotics for some pathological cause in the Los Cobos Medical Center pediatric emergency department. In order to establish the changes in the microbiome, measured through the number of species found (reported as diversity- α and diversity- β) and the proportion of the different species (reported as percentages of each species) between the moment before the start of Antimicrobial therapy and 7 and 60 days after the start of it, the ratio of variances by analysis of variance (ANOVA) of repeated measures will be used as test statistics, due to the dependence between the samples analyzed.

This identification of microorganisms in biological samples by means of technical sequencing is subsequently used to establish similarities and differences of this microbiome with respect to other populations as reported in databases to be able to associate the microbiota found with future comorbidities.

Key words

Microbiome, Sequencing, ANOVA, Diversity, Comorbidities.

Planteamiento del problema

No es ningún misterio que la salud de la población Colombiana está pasando por un momento difícil debido a múltiples problemas en la organización legislativa y organizacional a la que se ve sometida, al igual que a enfermedades cada vez más prevalentes en la población como la obesidad y sus subsecuentes derivados (la hipertensión y la enfermedad coronaria) , el asma, que causa múltiples ingresos a los servicios de urgencias, con un pobre control debido a las adversas condiciones socioeconómicas de algunos sectores poblacionales. Dichas patologías tienen un amplio impacto sobre la salud pública de nuestro país, pues elevan los costos de atención por un mayor requerimiento de intervención, debido a la necesidad del tratamiento de complicaciones y el posterior seguimiento de estas (1-5).

La importancia de reconocer estas condiciones clínicas que están ligadas desde un principio, al uso de medicamentos antibióticos a una edad temprana de vida (6, 7) es vital, como lo es desde el día del nacimiento hasta los tres años de edad. El riesgo de padecimiento de estas enfermedades y su relación con la afectación en la microbiota humana se ha documentado ya en la literatura por diferentes autores (6-9, 11, 15, 16, 19, 20, 21).

En las últimas décadas se ha documentado la significancia de la microbiota intestinal , un mundo microscópico que guarda una simbiosis determinante en nuestro organismo, que tiene roles sistémicos en la defensa, síntesis de nutrientes, protección frente a otras infecciones, aumento en la colección de sustentos importantes para las funciones metabólicas humanas, y un rol determinante en el desencadenamiento de procesos metabólicos y genéticos que pueden llevar a la presentación o no de enfermedades (8-9, 26, 27). Es claro que la diversidad de especies en la microbiota, puede verse afectada por el uso de antibioticoterapia y su población a su vez reducida, pues como bacterias pueden ser afectadas por los fármacos usados para el tratamiento de diferentes infecciones, esta hipótesis que

ha llevado a múltiples autores a la investigación de lo que sucede con este nicho intestinal y que han reportado una asociación entre su afección, y la probabilidad de presentar enfermedades en los pacientes expuestos a antibióticos (10, 11). Los estudios abarcan poblaciones caucásicas, europeas, asiáticas, mediterráneas, que no guardan mucha similitud a la nuestra, pues nuestra raza colombiana presenta una mezcla étnica genética importante, y más allá de eso, las costumbres de nuestra tierra y los determinantes socioeconómicos juegan papeles importantes en el desarrollo y crecimiento del nicho simbiótico intestinal (12, 13). El estudio de la alteración del microbioma pediátrico en 40 pacientes lactantes de 6 y 24 meses de edad en el servicio de urgencias pediátricas Los Cobos Medical Center luego de ser expuesto al uso de antibióticos orales y parenterales por alguna causa patológica, que se prescriben de manera frecuente y casi que rutinaria en nuestros servicios de salud, puede hacernos crecer en conocimiento frente a un mundo poco explorado en nuestra región, al cual tenemos ahora acceso mediante el uso de tecnología actualizada, por lo que podemos incrementar el conocimiento y la comprensión del microbioma intestinal de los niños colombianos.

Preguntas de investigación

¿Cuál es la composición bacteriana del microbioma gastrointestinal de los niños lactantes entre los 6 y 24 meses de edad, que reciben antibióticos orales y parenterales por alguna causa patológica en el servicio de urgencias pediátricas Los Cobos Medical Center?

¿Existen genes de resistencia a antibióticos y de virulencia en muestra de heces en pacientes pediátricos de entre 6 y 24 meses de edad que consultan el servicio de urgencias pediátricas Los Cobos Medical Center?

Justificación

El desarrollo del sistema inmune y las respuestas de defensa del organismo son claramente influenciadas por el microbioma del ser humano, es pues motivo de interés estudiar el comportamiento de este nicho simbiótico en relación a las interacciones con antibióticos, y el desenlace que tiene el tratamiento sobre la microbiota de los niños, tomando en cuenta el desarrollo a futuro que puede presentar el paciente, a distintas comorbilidades importantes para su calidad de vida y desenvolvimiento social que pueden tener parte de su patogénesis en la muerte de la microbiota benéfica y la proliferación de familias patógenas posterior a la exposición a un antibiótico. Adicionalmente, la información de las características del microbioma de los niños colombianos es limitada. En la actualidad, solo existe un reporte en las bases de datos que intenta describir esta microbiota en pacientes (con diarrea) pediátricos en Colombia (14). No obstante, por las limitaciones técnicas de la época de desarrollo de este trabajo, no fue posible caracterizar toda la población bacteriana en estos pacientes (se utilizaron técnicas de detección dirigidas a los microorganismos más representativos). Actualmente, las técnicas de detección molecular han evolucionado a tal punto que es posible identificar casi todos los microorganismos presentes en una muestra biológica, por medio de técnicas de secuenciación de nueva generación (15). Por lo que el uso de estas técnicas en el contexto de este estudio puede contribuir para la descripción de las bacterias que componen este microbioma en nuestra población, y para establecer las similitudes o diferencias que esta microbiota presenta con lo reportado para otras poblaciones. Puesto que los aspectos socio-culturales pueden también tener un efecto en la dinámica de la población bacteriana de los pacientes pediátricos.

Objetivos

Objetivo general

Describir el efecto del uso de antibióticos orales o parenterales, en la microbiota gastrointestinal bacteriana de lactantes entre 6 y 24 meses de edad, que consultan al servicio de urgencias pediátricas y hospitalización de la Los Cobos Medical center en el periodo de estudio.

Objetivos específicos

1. Determinar el perfil poblacional del microbioma gastrointestinal en muestras de heces de lactantes entre 6 y 24 meses de edad antes y después de recibir tratamiento con antibióticos.
2. Conocer si en las muestras de heces hay presencia de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia en pacientes pediátricos de entre 6 y 24 meses de edad.
3. Comparar la microbiota gastrointestinal en pacientes pediátricos de entre 6 y 24 meses de edad con bases de datos y asociar la microbiota encontrada con comorbilidades presentes.

Estado del arte

La microbiota humana ha sido parte de nuestra existencia desde los inicios de la vida sobre la tierra, ha sido motivo de investigación durante las últimas décadas, en las que se ha evidenciado el importante rol que marca la relación simbiótica entre bacterias y múltiples procesos desarrollados en la fisiología humana (6, 11, 12). Según estudios de cultivos, al inicio de la vida, el feto se encuentra colonizado por bacterias anaerobias facultativas como cocos Gram-positivos y enterobacterias, gracias al paso por el canal de parto, que a su vez preparan el ambiente para la colonización por anaerobios obligados, entre los ya nombrados *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (7), microbioma que será cambiante más o menos al año o a los dos años donde se pasará a una microbiota propia del adulto, pues el cambio de alimentación de líquido a sólidos y el destete de la leche materna juegan roles importantes en el cambio y la adaptabilidad de los microorganismos intestinales (7). A su vez con el uso de antibióticos se demostró que hay una disminución en la concentración de familias de microorganismos, y la composición posterior de la flora intestinal se ve ligada al efecto del antibiótico, lo que indica una relación entre la administración de estos medicamentos y la afectación directa del nicho microbiológico intestinal (13).

Las investigaciones en el campo de la microbiología han permitido establecer que las bacterias del microbioma en su mayor parte anaerobias como *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, actúan como parte de la respuesta frente amenazas infecciosas, síntesis de vitaminas y estimulación del crecimiento del epitelio intestinal (12). Así mismo, el estudio con animales de laboratorio ha mostrado que una alimentación rica en grasa y pobre en otros nutrientes -lo que denominamos dieta hipercalórica está asociada con el aumento de una flora “obesogénica”, que colabora con la absorción de grasas mediante mecanismos descritos, como genes relacionados con el arresto energético hasta el consumo bajo de carbohidratos en dieta (6, 7, 12). Dicha situación está dada por un elevado número en la población de *Firmicutes* en

comparación con la población Bacteroidetes, y disminución de familias como Lactobacillus, Allobaculum, Rikenellaceae y Candidatusarthromitus (6), lo que indica una pieza más en el círculo vicioso de la obesidad.

Estudios recientes han revelado la existencia de algunos reguladores genéticos que juegan roles importantes en el desarrollo de la obesidad en pacientes pediátricos, que pueden ser afectados por la composición de la microbiota, como la expresión de la proteína Factor Adipocito Inducido por Ayuno (Angptl4/Fiaf), que es inicialmente producida por el tejido hepático adiposo y placentario, pero que puede tener amplia regulación por la microbiota intestinal luego de la vida extrauterina (7). Esta proteína cumple un factor importante como regulador del metabolismo lipídico y cuando no se encuentran gérmenes que regulen su función se presenta un incremento en el depósito de grasa corporal (7).

La asociación que existe entre el uso de antibióticos y la afección del microbioma intestinal, está claramente documentada a nivel epidemiológico, aunque, en nuestro país son pocos los autores que hablan acerca de nuestra población y puntualmente la población pediátrica, pues las limitantes tecnológicas y las muestras para análisis son de difícil estudio para brindar de forma clara un panorama organizado (6, 11). El estudio de Korpela y colaboradores mostró una asociación entre el tiempo de uso de los antibióticos (en este caso macrólidos) y la repercusión en 6, 12 y 24 meses posteriores a su uso, mostrando una disminución de las familias que se recuperó hasta pasados 12 e incluso hasta 24 meses luego del uso de un esquema de antibiótico, repercutiendo con una fuerte asociación al desarrollo de asma y sobrepeso en los pacientes que recibieron más de 2 ciclos de macrólidos frente a los niños del grupo control tratados sin manejo antibiótico (11).

Un estudio desarrollado en Dinamarca, demostró, que no solo la toma de antibióticos en las etapas tempranas de la vida de los pacientes, sino que también, el uso por parte de la madre previo a su

concepción, durante y hasta después de la concepción mostró una probabilidad elevada de que su hijo presentara asma conforme se aumentaron los ciclos de toma de antibiótico (6). Lo que nos hace pensar que, el microbioma que es heredado al paciente por parte de la madre, puede ya estar alterado y que puede marcar en su vida futura un importante rol para su salud y calidad de vida. El uso de antibióticos produce la disminución de familias involucradas en la maduración y la estimulación de expresión de factores antimicrobianos T (6).

En la actualidad se encuentran diversos estudios desarrollados sobre poblaciones norteamericanas, europeas y latinas, pero las poblaciones humanas difieren unas a otras, pues las condiciones medio ambientales, los alimentos ingeridos, los riesgos a los que se exponen, y las costumbres propias de cada cultura y de cada región marcan un hito importante en la distribución de la microbiota intestinal (12, 14, 16). El estudio de Escobar y colaboradores desarrollado en 2014, exploró los cambios de la población microbiológica en varios sectores de nuestro país, tomando en cuenta su procedencia y estado de Índice de masa corporal, dando como resultado, que los colombianos tenemos una composición muy diferente con respecto a población norteamericana, europea y asiática, mostrando un porcentaje mayor de Firmicutes de hasta un 95% en la mayor parte de los individuos estudiados; ahora con respecto a lo que se pensaba frente a los Firmicutes y Bacteroidetes, la población colombiana obesa difiere con respecto a la población extranjera examinada; posiblemente por factores inherentes de la región y las costumbres que explicarían los resultados obtenidos (12). Por lo anterior, el presente estudio tiene gran importancia, al incorporar a nuestra población pediátrica en el análisis de su microbiota, usando herramientas de última tecnología, dándonos a entender que tenemos mucho campo por explorar con respecto a nuestra microbiota colombiana, lo que daría paso a una mayor comprensión de los procesos evolutivos de la enfermedad y a brindar un enfoque de tratamiento múltiple, encaminado a la mejoría de la salud.

Pocos estudios han sido elaborados en nuestro país que relacionen la microbiota intestinal, la interacción medicamentosa con antibióticos y futuras o comorbilidades presentes en el paciente pediátrico como asma y obesidad, aún menos documentado está el mapa de la distribución de la microbiota de la población pediátrica colombiana. El estudio que se ha planteado podría ser un trampolín de conocimiento para la investigación y documentación del nicho microbiológico de los niños y niñas de nuestro país, y como este nicho podría ser un modificador en la producción de determinadas enfermedades.

Marco De Referencia

Microbioma

Los microorganismos son los seres vivos más simples en funcionamiento y complejidad estructural que habitan sobre el planeta Tierra, pero a su vez, presentan importantes roles en nuestro diario vivir, ya sea como agentes etiológicos de múltiples enfermedades infecciosas, hasta en la convivencia con nuestro sistema inmune y nuestros tejidos en una relación simbiótica armónica, la cual pasa desapercibida para la mayor parte de la población.

Los niños conviven con una larga y metabólicamente activa comunidad de bacterias. Este microbioma está presente en su gran mayoría habitando el tracto gastrointestinal, especialmente en el colon (8). El conocimiento substancial acerca de este microbioma se ha adquirido en las últimas décadas, y la apreciación de la naturaleza crítica de la relación entre humanos saludables y una sana comunidad microbiana ha sido de vital importancia para la comprensión en la génesis de enfermedades que creíamos de características sencillamente genéticas (9).

La microbiota vive en la piel, mucosas, ojos, boca, genitales, paredes intestinales, etc. de nuestros organismos y en este momento se encuentran cumpliendo funciones variadas, donde conforman un ecosistema único y muy diverso, que puede ser afectado por medicamentos antibióticos que día a día son recetados por nuestras manos, ante cualquier patología infecciosa bacteriana, e incluso ante patologías que ni siquiera requieren un tratamiento antibiótico; esto sin tener en cuenta que, al ser agentes bactericidas o bacteriostáticos, pueden causar afección e incluso muerte de estas poblaciones benéficas de microorganismos simbioses.

Las bacterias como parte de los seres vivos que nos rodean, son frecuentemente objeto de una categorización poco amigable e incluso son parte de nuestra némesis más común en la lucha por

guardar la salud de los niños. No es de obviar que en la historia múltiples bacterias fueron causales de la muerte de miles de vidas humanas alrededor del mundo, pero que, muchas otras familias son coadyuvantes en el diario vivir como agentes probióticos, o en la industria de los alimentos y medicamentos (9). El microbioma del intestino cumple funciones de vital importancia, descritas en la literatura como inmunológicas, metabólicas, como barrera de protección ante patógenos, síntesis de vitaminas, colabora en la absorción de nutrientes (9) como algunos carbohidratos que de otra manera serían indigeribles, el metabolismo de los xenobióticos, maduración del intestino del recién nacido, desarrollo del sistema inmune y la producción de metabolitos como la vitamina K (16).

Previamente se creía que el ser humano nacía estéril (sin microbiota) (16), pero hoy, se ha demostrado que la vía de parto, vaginal o cesárea, y el contacto con bacterias ya sea de la piel, de la zona genital de la progenitora, en su contacto con el neonato, contacto con el personal médico, de enfermería, hermanos o familiares (16) colaboran en la generación y aumento de este microbioma, muy importante en el desarrollo del sistema inmune del bebé y la programación del metabolismo (9). Hay una importante diferencia entre el microbioma del paciente lactante, con respecto al niño mayor de dos años (9). Las bacterias del primero son habitualmente bifidobacterias en su gran mayoría, producto de una alimentación por seno materno, sustrato de inmunoglobulinas y probióticos, asociados a un contacto estrecho con la madre, lo que provoca un aumento de la flora microbiana en el menor de 6 meses. El infante mayor de dos años, un niño fuerte que es alimentado por fórmula infantil y en el que se inició la alimentación complementaria, comparte bacterias similares a las encontradas en el adulto como los coliformes, Bacteroidetes, Clostridium, enterococos y en menor proporción de bifidobacterias (9, 11).

El cultivo in vitro para la caracterización del microbioma es complicado, y más del 80% (9) de las bacterias no se pueden cultivar de forma apropiada pues cuentan con un tipo de metabolismo bastante

restrictivo que impide su categorización en el laboratorio convencional, pero con el perfeccionamiento de nuevas tecnologías, como la secuenciación por técnicas de alto rendimiento del gen 16S ADNr aplicado en el análisis metagenómico (15), ha sido posible el estudio y diferenciación de las familias de bacterias simbióticas que reposan en el tracto gastrointestinal, que nos dan un vistazo de un mundo lleno de posibilidades, aún poco explorado pero que se convertirá en un pilar fundamental de la medicina del siglo XXI.

Con la llegada del “proyecto del microbioma humano” en 2012, donde se documentó un mapa de la composición del microbioma de diferentes sitios del cuerpo de seres humanos sanos (17-19), se abre un sinfín de posibilidades frente a las relaciones que se pueden establecer entre, la presencia de ciertas bacterias y el desarrollo de patologías a largo plazo, como la obesidad, las alergias, asma, enfermedades autoinmunes e incluso carcinomas entre otras. La evidencia apunta hacia un horizonte en el que una pérdida del equilibrio o la denominada disbiosis en el microbioma humano puede estar relacionada con la aparición de enfermedades no solo intestinales si no multiorgánicas y hasta inmunológicas (8) entre ellas el cólico del lactante o el síndrome de colon irritable (16). La microbiota se asocia con el desarrollo de enfermedades tipo T helper 2 como asma, alergias y procesos sibilantes, así como enfermedades tipo T helper 1, como la diabetes, la obesidad, cáncer colorrectal y la enfermedad intestinal inflamatoria (8, 9, 20).

Entonces tenemos que la microbiota es importante para adaptar y llegar a forjar la inmunidad de un ser vivo (26). Estudio en modelos animales han demostrado que el uso del microbioma frente a la lucha contra organismos invasores es crucial en los mecanismos de defensa del huésped frente al antígeno. En un estudio con anfibios Woodhams, logro identificar la relación entre el uso de bacterias prebióticas en una población anfibia y el desencadenamiento de cambios en la inmunidad del huésped para crear

una competencia entre las cepas probióticas y las cepas patógenas, pudiendo mejorar la respuesta de defensa del animal frente a bacterias invasoras.

Un ensayo clínico aleatorizado (27) realizado en estados unidos, en pacientes pediátricos con infección de vías urinarias recurrente, en los que se comparó la administración de prebióticos (una combinación de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, y *Bifidobacterium lactis*) y el uso de placebo demostró, que la administración de probióticos en un plazo mayor de 18 meses de tratamiento comparado al uso de placebo logro una tasa de cura en pacientes con ITU recurrente. Otros investigadores presentan como estrategia el uso de bacterias probióticas inactivadas para su administración, logrando un efecto modulador sobre enfermedades como la diarrea y colocando en evidencia el efecto benéfico de su uso en la salud (28).

Antibióticos y su efecto

El uso frecuente e indiscriminado de antibióticos, no solo en pediatría, si no a nivel médico global, tiene gran importancia sobre el desarrollo de resistencia microbiana, seleccionando cada vez más cepas en comunidad resistentes a antibióticos de amplio espectro, que requieren mayor potencia antimicrobiana y conllevan a estancias de hospitalización prolongadas; en nuestro tópico de flora microbiana tenemos que denotar que según refiere Vangay y colaboradores (21), el uso de antibióticos en la edad temprana estaría relacionado a enfermedades en la edad adulta, con cuatro mecanismos que ejercen los antibióticos en la disbiosis del microbioma como lo son: i. la pérdida de taxones clave, ii. Pérdida de diversidad, iii. Cambios en la capacidad metabólica y iv. Proliferación de patógenos (21). Mecanismos claves para comprender el daño provocado al microbioma, que puede tener repercusiones importantes para la salud futura de nuestros pequeños pacientes.

Alteraciones en la estructura microbiana del intestino han sido asociadas con numerosos desórdenes, muchos de los cuales han ido incrementando en prevalencia en los últimos 30 años (8). El Asma, la enfermedad crónica más prevalente en la infancia en los países de occidente es una de estas patologías. Aunque la patogénesis del asma tiene un componente genético, múltiples estudios epidemiológicos han identificado un número de exposiciones ambientales que contribuyen a su reciente fuerte aumento en prevalencia (21), en particular, los acontecimientos que alteran el microbioma muy temprano en la vida, como son el uso de antibióticos pre y perinatales, parto por cesárea, vida urbana vs vida rural y alimentación por fórmula, son ahora conocidos por contribuir al riesgo de desarrollo de asma y otras enfermedades como la obesidad y las alergias (8).

Nosotros y otros investigadores según lo descrito previamente, hemos apoyado esta hipótesis en seres humanos, donde se ha identificado una ventana crítica, tempranamente en la vida, durante la cual los cambios en el microbioma intestinal de los lactantes son influyentes en la desregulación inmune y pueden conducir a la atopia, asma y obesidad entre otras. De forma puntual, se ha demostrado que, el uso temprano de antibióticos luego del destete de ratones de prueba, provocaba una disbiosis que aumenta su adiposidad y los niveles de ácidos grasos de cadena corta, así mismo, provoca una mayor extracción energética de los alimentos, en comparación con los controles, posiblemente mediada también por el aumento de Firmicutes, Gram-positivos encontrados en el tracto gastrointestinal de pacientes obesos (21).

Así mismo, las alergias se han visto aumentadas en sujetos que presentan afección de la flora microbiana que causa maduración de células B y la diferenciación de células T reguladoras (8). También se ha encontrado una disminución en los niveles de Clostridium, la cual es importante para la estimulación de IL 22 que evita el paso de los alérgenos alimentarios en el intestino (21). En este sentido, la enfermedad celíaca, artritis reumatoide juvenil y diabetes tipo 1, que son enfermedades con

características genéticamente complejas, al estar el sujeto en un ambiente principalmente compuesto de flora patógena tienen un doble de posibilidad para su desarrollo (21). Esto mediado por la modulación de inmunidad innata y adaptativa del paciente sometido a ciclos de antibiótico (21).

El estudio del uso de antibióticos, con el efecto secundario de la muerte o disminución del microbioma humano, que da paso al aumento de familias patógenas es de vital importancia para documentar la génesis y pronóstico del desarrollo de estas enfermedades en el adulto del mañana, pediátrico de hoy. Y así, motivarnos a mejorar el ejercicio clínico del diagnóstico y tratamiento adecuados de patologías que no se tratan con antibióticos, evitando la muerte del microbioma y a su vez, bajando gastos al sistema de salud y disminuyendo la resistencia microbiana.

Hipótesis

Hipótesis nula: La microbiota intestinal bacteriana en niños lactantes antes de usar antibióticos es igual a la microbiota intestinal en niños y lactantes luego del uso de estos, en un periodo posterior de siete y 60 días al uso de antibiótico.

Hipótesis Alternativa: La microbiota intestinal en niños lactantes antes de usar antibióticos es diferente a la microbiota intestinal en niños lactantes luego del uso de estos, en un periodo posterior de 7 y 60 días al uso de antibiótico.

Metodología

Tipo de estudio

Se trata de un estudio con enfoque cuantitativo, analítico no aleatorizado de tipo “antes y después” de lactantes entre 6 y 24 meses de edad que reciben antibióticos orales y parenterales por alguna causa patológica en el servicio Urgencias Pediátricas y/o Hospitalización de la Clínica Los Cobos en el periodo de estudio.

Los sujetos serán reclutados del Servicio de Urgencias Pediátricas de la Clínica Los Cobos. Se recogerá una muestra fecal antes de la administración de antibióticos y se recogerá una segunda muestra dentro de las 24 horas posteriores al cese de la terapia con antibióticos (en la clínica o en casa).

Adicionalmente, se recogerá una tercera muestra a los 60 días posteriores a la finalización de la terapia antimicrobiana.

Los sujetos serán excluidos si nacen muy prematuramente (antes de 31 + 6 semanas), si tienen anomalías gastrointestinales congénitas, o si tienen antecedentes de cirugía gastrointestinal, enterocolitis necrotizante, colestasis neonatal o gastroenteritis o si recibieron tratamiento con antibióticos durante los cuatro meses previos al inicio del nuevo tratamiento con antibiótico. Sujetos con tratamiento previo con probióticos no serán tomados en cuenta, Los bebés que residen fuera de Bogotá también serán excluidos.

Las muestras se procesarán para:

A) Extracción de ADN total en materia fecal y posterior secuenciación de microbiomas basados en ampliaciones del gen para la subunidad ribosomal 16S (exclusivo para bacterias).

B) Detección por PCR de genes de virulencia y resistencia a antibióticos de frecuente circulación en bacterias patógenas.

Se realizará un muestreo secuencial por conveniencia reclutando para el estudio 40 pacientes lactantes entre 6 y 24 meses de edad que ingresen al servicio de urgencias de la Clínica Los Cobos y que requieran manejo con antibiótico oral o parenteral en el tiempo de estudio estipulado. Adicionalmente, se incluirá un grupo control de 20 individuos lactantes entre 6 y 24 meses de edad no tratados con antibióticos.

Visita de estudio 1.

En la visita inicial de exploración, el investigador del estudio explicará la naturaleza del proyecto de investigación a los padres del niño entre 6 y 24 meses de edad. Se presentará para firma de los adultos responsables del menor, el consentimiento informado (ver el formulario de consentimiento informado adjunto). Se documentará un historial médico detallado para asegurar la elegibilidad del sujeto para su inclusión en el estudio (ver formato para recolección de información clínica y epidemiológica adjunto).

Los sujetos que califiquen para el estudio aportarán una muestra fecal recogida antes de la primera dosis de antibiótico (o hasta 5 horas después de la primera dosis). Esto se logrará mediante la recolección de materia fecal de un pañal sucio. Si el bebé no defeca durante este período, se recogerá la muestra mediante hisopos rectales, utilizando un hisopo estéril y suavemente impregnándolo con material presente justo en el interior del ano (1-2cm).

Estudios microbiológicos anteriores han demostrado que los hisopos rectales son un método conveniente y sensible para el análisis de microbiomas, y que la comunidad microbiana obtenida de este método es indistinguible del microbioma de heces (22).

Visita de estudio 2.

Los padres del sujeto serán contactados el día de la dosis final de antibiótico y se tomarán medidas para que el investigador del estudio recoja una muestra fecal de un pañal sucio dentro de las 24 horas siguientes a la dosis final.

Si el sujeto sigue ingresado en la clínica, la recolección se llevará a cabo en la institución, o si el sujeto ha sido dado de alta, personal calificado adscrito al proyecto será enviado a la casa del sujeto para la recogida de la muestra, que se hará a partir de heces en un pañal (se les indicará a los padres que almacenen un pañal sucio no mayor a 24 horas) o mediante hisopos rectales. El médico encargado de la recolección de la muestra, documentará un historial clínico detallado del paciente, para seguimiento de las variables clínicas y epidemiológicas.

Visita de estudio 3.

A los 60 días posteriores a la finalización de la terapia antimicrobiana, el médico encargado realizará una tercera visita al menor lactante, para tomar una tercera muestra a partir de heces en un pañal (se les indicará a los padres que almacenen un pañal sucio no mayor a 24 horas) o mediante hisopos rectales. De nuevo, el médico encargado documentará un historial clínico detallado del paciente, para seguimiento de las variables clínicas y epidemiológicas.

Población y muestra.

Inclusión para el reclutamiento: cuarenta (40) pacientes lactantes entre 6 y 24 meses de edad con diagnóstico de patología que requiera antibióticos orales o parenterales.

Formulación de antibióticos en la unidad de Urgencias Pediátricas y/o Hospitalización de los Cobos Medical Center. **Muestra pre-antibioticoterapia:** muestra de heces o hisopo rectal de los pacientes lactantes incluidos en el estudio, antes del inicio del tratamiento con antibióticos o dentro de las primeras 5 horas posteriores al inicio del tratamiento. **Muestra post-antibioticoterapia 1:** muestra de

heces o hisopo rectal de los pacientes lactantes incluidos en el estudio, tomada dentro de las 24 horas posteriores a la finalización de la terapia antimicrobiana. **Muestra post-antibioticoterapia 2:** muestra de heces o hisopo rectal de los pacientes lactantes incluidos en el estudio, tomada a los 60 días posteriores a la finalización de la terapia antimicrobiana.

Métodos Y Técnicas Para La Recolección De La Información

Se realizará recolección de la información mediante la entrevista a los padres de los pacientes, que brindarán información relacionada con las variables que serán medidas, esta información se recolectará mediante una ficha técnica anexa al proyecto. Será diligenciada directamente por el recolector de las muestras y este será el encargo de recopilar la información obtenida en una base de datos, que estará lista para su comparación al término de la tipificación del microbioma bacteriano y así realizar el análisis estadístico usando las herramientas descritas en aquel apartado.

Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces o hisopos rectales

Dado que se trabajará con muestras de ADN obtenidas a partir de una muestra clínica, el proyecto toma en cuenta los lineamientos estipulados en la Resolución No 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, especialmente en el título IV, capítulo I, sobre la bioseguridad de las investigaciones con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, en donde el artículo 67 clasifica los microorganismos en grupos de riesgo, y de acuerdo a esto establece medidas para garantizar la seguridad microbiológica. Por consiguiente, dado que las muestras manipuladas en este proyecto se encuentran dentro del Grupo de riesgo III se manipularán de acuerdo con las condiciones de seguridad microbiológica requeridas, equivalentes a un nivel de bioseguridad 2. Así mismo, de acuerdo con la clasificación del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) de los Estados Unidos, las muestras utilizadas en

este estudio corresponden al nivel de bioseguridad 2 (<http://www.cdc.gov/training/quicklearns/biosafety/>). Por lo que el trabajo microbiológico se desarrollará en un área específica destinada para tal fin, que cumple con los parámetros de bioseguridad como cabinas de seguridad biológica entre otros. De igual manera el personal cuenta con el entrenamiento y los diferentes equipos de bioseguridad. Los residuos emitidos serán previamente neutralizados con hipoclorito de sodio y después sometidos a un proceso de descontaminación por medio de esterilización con autoclave según los parámetros del CDC. Las muestras que se utilizarán en el presente estudio no son clasificadas en los niveles de bioseguridad 3 o 4, debido a su bajo riesgo de transmisión respiratoria o vía aerosol (<http://www.cdc.gov/training/quicklearns/biosafety/>).

Todas las muestras de heces obtenidas en el estudio se procesarán de la siguiente manera: se tomarán 200mg de muestra de heces y se procesarán para la obtención de ADN total usando el kit comercial QIAamp® Power Fecal® DNA Kit (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Éste kit comercial es reconocido por su capacidad de extracción de ADN genómico bacteriano, viral y parasitario a partir de muestras de heces y se ha validado su utilidad en estudios de metagenómica (23).

Determinación del perfil poblacional del microbioma bacteriano en muestras de heces

Los extractos de ADN obtenidos a partir de las muestras de heces serán usados para la caracterización del perfil poblacional de especies bacterianas presentes en la muestra, por medio de la secuenciación de una región variable del gen ADNr 16S (región V3-V4), específico para bacterias, usando la tecnología MiSeq (Illumina) que ofrece alta exactitud en la detección de nucleótidos, por lo que se usa frecuentemente en proyectos enfocados a la identificación de género y especie y clasificación filogenética. Para tal fin, a partir del ADN se prepararán librerías de ampliaciones de la región V3-V4 del ADNr 16S, usando oligonucleótidos específicos, dichas librerías serán secuenciadas

usando el sistema MiSeq 300 bp paired-end, para la obtención de alrededor de 100.000 lecturas por muestra. Las lecturas obtenidas serán procesadas en Trimmomatic 0.39 (29), en el cual se filtrarán teniendo en cuenta la longitud de las lecturas (entre 350 pb y 550pb) y se recortan según el valor de calidad Phred. En CD-HIT 4.81 (30) serán agrupadas con un valor del 100% de identidad y mediante el algoritmo de greedy con CD-HIT-OTU y QIIME (31) comparado con la base de datos del NCBI 16S DB se determinarán las especies bacterianas presentes en cada muestra y su abundancia relativa usando el criterio de Unidades Operacionales Taxonómicas (Operational Taxonomic Units, OTU). En donde porcentajes de identidad superiores al 97% en la secuencia del gen 16S ADNr entre OTUs, permiten la clasificación a nivel de género, y porcentajes superiores al 98% a nivel de especie (25).

Determinación de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia en las muestras de ADN

Las muestras de ADN obtenidas también serán usadas para la detección por PCR de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia, de circulación frecuente en bacterias patógenas del tracto gastrointestinal. Para esto, se usará una batería de oligonucleótidos específicos para la detección de los genes de interés, previamente estandarizados en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque.

Plan De Tabulación Y Análisis

Para la descripción de las variables en general se seguirá el siguiente esquema: las variables de naturaleza cuantitativa serán descritas mediante promedios y desviaciones estándar si su distribución es aproximadamente normal (verificado mediante prueba de Shapiro-Wilk); en caso de no comprobarse este supuesto, serán descritas mediante medianas y rangos intercuartílicos (

Tabla N°1 variables). Las variables de naturaleza cualitativa serán descritas mediante proporciones y frecuencias absolutas.

A fin de poner a prueba las hipótesis relacionadas a establecer los cambios en el microbioma, medidos a través del número de especies encontradas (reportadas como diversidad- α y diversidad- β) y la proporción de las diferentes especies (reportado como porcentajes de cada especie) entre el momento previo al inicio de terapia antimicrobiana y los 7 y 60 días posteriores al inicio de la misma, será utilizado como estadístico de prueba la razón de varianzas mediante análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, esto debido a la dependencia entre las muestras analizadas. En este caso, se verificará el cumplimiento de los supuestos inherentes para la realización de dicha prueba: dependencia de las observaciones, naturaleza cuantitativa y con distribución aproximadamente normal de las variables aleatorias y homocedasticidad. A fin de establecer las asociaciones entre diferentes factores (clínicos, sociodemográficos, entre otros) y la composición del microbioma se seguirá el siguiente esquema: cuando las variables desenlace sean de naturaleza cuantitativa (como el número de especies encontradas y el porcentaje de proporción) se construirá un modelo de regresión lineal simple y multivariado, con los factores como variables predictoras; en este caso, el interés se centrará en analizar los coeficientes β del modelo, poniendo a prueba las hipótesis: $H_0: \beta=0$ versus $H_a: \beta \neq 0$. Cuando la variable desenlace sea dicotómica, como por ejemplo la presencia o no de determinado microorganismo, se construirán modelos de regresión logística condicionados bivariados y multivariados a fin de estimar OR con sus respectivos intervalos de confianza del 95% que den cuenta de la asociación existente entre el factor y el desenlace estudiado. Para la escogencia de las variables de confusión e interacción a incluir en el modelo multivariado, se utilizará una técnica de “stepwise” con probabilidad de entrada de 0.1 y de salida de 0.3, incluyendo inicialmente aquellas variables descritas en la literatura como modificadoras del efecto. El ajuste de los modelos será evaluado con pruebas de

reestimación (linktest) y prueba de Hosmer y Lemeshow. Las pruebas estadísticas serán consideradas significativas a un valor $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizará con el software STATA (Versión 15 SE; Stata Corporation, CollegeStation, Texas).

Tabla N°1 variables

Variable	Naturaleza	Medición	Tipo de dato
Unidad neonatal: Cuidado mínimo Cuidado intermedio Cuidado intensivo	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógico (si - no)
Lugar de nacimiento	Demográfica	Nominal	Alfanuméricos
Sexo	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógico (femenino – masculino)
Grupo étnico	Demográfica	Nominal	Alfanuméricos
Afiliación al SGSS: Régimen subsidiado Régimen contributivo Plan complementario Medicina prepagada	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógico (si - no)
Procedencia: Rural Urbano	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógico (si - no)
Localidad	Demográfica	Nominal	Alfanuméricos
Edad	Cuantitativa continua	Escala	Numérica
Estado civil de la madre:	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanuméricos (soltera – casada o unión libre – viuda)
Estrato social	Cuantitativa discreta	Ordinal	Numérica
Número de hermanos	Cuantitativa discreta	Ordinal	Numérica
Hermanos asisten a jardín	Cualitativo dicotómico	Ordinal	Lógico (si - no)

Educación de madre	Cualitativo politómico	Ordinal	Alfanuméricos (primaria - secundaria – técnico - universitario - posgrado)
Días de tratamiento antibiótico	Cuantitativo discreto	Intervalo	Numérica
Peso al nacer	Cuantitativo continua	Intervalo	Numérica
Peso actual	Cuantitativa continua	Intervalo	Numérica
Asistió a control prenatal	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógico (si - no)
Talla	Cuantitativa continua	Intervalo	Numérica
Duración de la gestación	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanuméricos (pretérmino - a término - postérmino)
Dosis de administración del antibiótico	Cuantitativo politómico	Nominal	Alfanuméricos (baja - indicada según literatura - elevada)
Tipo de tratamiento	Cualitativo dicotómico	Nominal	Alfanuméricos (empírico o dirigido por cultivo)
Numero de gestación	Cuantitativo discreto	Intervalo	Numérica (número de hijo)
Mortinatos	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógica (si - no)
Abortos	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (si - no)
Cesárea	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (si - no)

Vaginal	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Enfermedad febril al momento del parto	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Ruptura de membranas	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
horas de ruptura de membranas	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Instrumentación en el parto	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Uso de macronutrientes durante el embarazo	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Destino del neonato	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanumérico (alojamiento conjunto - básicos - intermedios - intensivos)
Hospitalizaciones previas en el último año	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Uso de probióticos por el paciente previamente	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Uso de antibióticos previamente (últimos seis meses)	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Modificación de esquema antibiótico inicial	Cualitativa dicotómico	Nominal	Lógica (sí - no)
Antibiótico (nombre) con el que se está tratando	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanumérica (nombre del antibiótico)
Diagnostico	Cualitativo politómico	nominal	Alfanumérica (nombre del diagnóstico)
Vía de administración del abiótico al paciente	Cualitativo politómico	nominal	Alfanumérico (intravenoso -

			intramuscular - oral)
Remisión de síntomas con el tratamiento	Cualitativo dicotómico	Nominal	Lógico (si - no)
Patología infecciosa durante el embarazo	cualitativo politómico	Nominal	Alfanumérico (ivu - vaginosis - sx febril - etc)
Tipo de alimentación que recibe el paciente	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanumérico (lactancia - formula - otras)
Marca de la leche (variable privada de publicación)	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanumérico (marca de la leche)
Duración de lactancia	Cualitativa dicotómica	Nominal	Lógica (menos de 6 meses y más de 6 meses)
Antecedentes patológicos (desde el nacimiento)	Cualitativo politómico	Nominal	Alfanumérica (tipo de patología)
PAI completo	Cualitativo dicotómico	Nominal	Lógico (si - no)
Asiste a jardín infantil o colegio	Cualitativo dicotómico	Nominal	Lógico (si - no)
Procede de hogares de paso o ICBF	Cualitativo dicotómico	Nominal	Lógico (si - no)

Consideraciones éticas

Discusión sobre las consideraciones éticas:

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con las "buenas prácticas clínicas" (GPC) y todas las regulaciones aplicables incluyendo la Declaración de Helsinki de junio de 1964, modificada por la 48ª Asociación Médica Mundial, República de Sudáfrica, octubre de 1996. Teniendo en cuenta el reporte Belmont, se vigilará el cumplimiento de los tres principios esenciales para el conducto ético en las investigaciones con seres humanos: respeto a las personas, beneficencia y justicia; protegiendo la autonomía y aplicando el derecho a preservar la intimidad, ya que el acceso a la información contenida en las historias es restringido y se tendrá privacidad absoluta de la información con personas ajenas al estudio.

De acuerdo con la resolución 8430 de 1993 se considerarán los siguientes aspectos éticos:

ARTÍCULO 5. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar.

ARTÍCULO 6. La investigación que se realice en seres humanos se deberá desarrollar conforme a los siguientes criterios:

- a. Se ajustará a los principios científicos y éticos que la justifiquen.
- b. Se fundamentará en la experimentación previa realizada en animales, en laboratorios o en otros hechos científicos.

c. Se realizará sólo cuando el conocimiento que se pretende producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo.

d. Deberá prevalecer la seguridad de los beneficiarios y expresar claramente los riesgos (mínimos), los cuales no deben, en ningún momento, contradecir el artículo 11 de esta resolución.

e. Contará con el Consentimiento Informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la presente resolución.

f. Deberá ser realizada por profesionales con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano bajo la responsabilidad de una entidad de salud, supervisada por las autoridades de salud, siempre y cuando cuenten con los recursos humanos y materiales necesarios que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.

g. Se llevará a cabo cuando se obtenga la autorización: del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se realice la investigación; el Consentimiento Informado de los participantes; y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución.

ARTÍCULO 8. En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo, sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

ARTÍCULO 10. El grupo de investigadores o el investigador principal deberán identificar el tipo o tipos de riesgo a que estarán expuestos los sujetos de investigación.

ARTÍCULO 11. Para efectos de este reglamento las investigaciones se clasifican en las siguientes categorías:

“b) Investigación con riesgo mínimo: Son estudios prospectivos, que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados en este Ministerio o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de esta resolución”.

ARTÍCULO 14. Se entiende por Consentimiento Informado el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna. De acuerdo a la normativa previamente descrita, la naturaleza del estudio de investigación se explicará a los padres de los niños que cumplen con los criterios de inclusión para el estudio. Se obtendrá el consentimiento informado antes del ingreso al estudio. El protocolo del estudio y el formulario de consentimiento serán aprobados por el comité de Ética de la Universidad el Bosque.

Los padres son libres de retirar su consentimiento y de interrumpir su participación en el estudio en cualquier momento. Los sujetos serán anonimizados mediante el suministro de un número de identificación del estudio, que se utilizará en todos los documentos relacionados con el estudio y viales de muestra. No hay preocupaciones de seguridad asociadas con este estudio dado que la única muestra biológica requerida serán heces, que se pueden recoger fácilmente de un pañal sucio.

La lista principal, que coincide con los nombres de los sujetos con sus números, se mantendrá en un lugar separado y se mantendrá sólo como medida de seguridad en caso de una emergencia en cuestión. De igual manera, las bases de datos se almacenarán en un computador en la oficina de pediatría de la Universidad la Universidad, que requiere un nombre de usuario y contraseña; el acceso autorizado será concedido a los miembros del personal por el investigador principal. Las copias impresas de los expedientes sujetos se mantendrán en oficinas cerradas que no son accesibles fuera de las horas normales de oficina, sin una llave de acceso pre autorizada.

Requiere aval ético (marque con equis):	SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO	Nivel ético: Alto		Medio		Mínimo	<input checked="" type="checkbox"/>
--	-----------	-------------------------------------	-----------	------------------------------	--	--------------	--	---------------	-------------------------------------

Cronograma

No.	Descripción de la actividad	Mes de inicio	Duración
1	Recolección de muestras e información clínica de los pacientes	1	5 meses
2	Procesamiento de muestras	5	3 meses
3	Análisis de resultados	8	4 meses
4	Redacción y publicación de resultados	10	2 meses

Presupuesto

Resumen General Del Presupuesto Del Proyecto:

Rubros	Universidad El Bosque			Total
	Desembolso nuevo 2020	Desembolso nuevo 2021	Desembolso normal 2020-2021	
	1. Personal Científico	0	0	75.963.982
2. Equipos compra o usados	Compra	0	0	0
	USO	0	27.080.000	27.080.000
3. Materiales e insumos	20.000.000	11.320.00		31.320.000
4. Bibliografía	0	0	0	0
5. Software	0	0	0	0
6. Viajes	0	0	0	0
7. Salidas de campo	0	0	0	0
8. Servicios técnicos	53.235.000	0	0	53.235.000
9. Eventos académicos	0	0	0	0
10. Mantenimiento	0	0	0	0
11. Publicaciones	0	0	0	0
12. SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN (3% del total solicitado)	0	0	0	0
13. GASTOS DE OPERACIÓN (5% del total solicitada)	0	0	0	0
14. Otros				
Sub-total	73.235.000	11.320.000	103.043.982	187.598982
Total	84.555.000		103.043.982	187.598982

Tabla de resultados esperados y productos

No.	Descripción del resultado esperado
1	Identificar la flora microbiana en los lactantes antes de iniciar el antibiótico
2	Identificar la flora bacteriana de los lactantes luego de culminar el tratamiento antibiótico
3	Construir un mapa de la microbiota intestinal de los niños colombianos en los diferentes momentos del tratamiento, para que sirva como insumo de futuras investigaciones, frente a enfermedades como asma, obesidad, dermatitis, etc.
4	Generar nuevo conocimiento mediante una publicación en revista indexada, así como formación de talento humano a nivel de tesis de doctorado, Residentes de pediatría, y estudiantes de pregrado
5	Vinculación de un estudiante de doctorado en salud pública para que desarrolle parte de su tesis enmarcada en el presente proyecto. Debido a los tiempos de ejecución y a los alcances de la propuesta no es posible que el estudiante de doctorado culmine sus tesis antes de la finalización del proyecto, por lo tanto, en la propuesta el compromiso es únicamente como vinculación del estudiante.

Estrategia de divulgación de los resultados

Al obtener los resultados serán analizados y validados, posteriormente se presentarán en congresos y simposios nacionales, así como también en publicaciones de revistas nacionales e indexadas a nivel internacional.

Referencias Bibliográficas

1. Rao G. Diagnosis, Epidemiology, and Management of Hypertension in Children. *Pediatrics*. 2016;138(2).
2. Dondi A, Calamelli E, Piccinno V, Ricci G, Corsini I, Biagi C, et al. Acute Asthma in the Pediatric Emergency Department: Infections Are the Main Triggers of Exacerbations. *BioMed research international*. 2017;2017:9687061.
3. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673-89.
4. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. 2016;134(6):441-50.
5. "Dirección de Epidemiología y Demografía MdSyPS. ANALISIS DE SITUACIÓN DE SALUD (ASIS) COLOMBIA, 2016 2016 [cited 2018 09-05-2018]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/asis-colombia-2016.pdf>.
6. Cox LM, Blaser MJ. Antibiotics in early life and obesity. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(3):182-90.
7. Reinhardt C, Reigstad CS, Backhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;48(3):249-56.
8. Serrano CA, Harris PR. [Development of intestinal microbiome in children. Impact on health and disease]. *Revista chilena de pediatria*. 2016;87(3):151-3.

9. Michel ARJ, Izeta GAC, Torres AG, Michel IACM. La microbiota y el microbioma intestinal humano. (Entre las llaves del reino y una nueva caja de Pandora). *Revista de Sanidad Militar*. 2017;71(5):443-8.
10. Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1543.
11. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, Kekkonen RA, Forslund K, Bork P, et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature communications*. 2016;7:10410.
12. Escobar JS, Klotz B, Valdes BE, Agudelo GM. The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC microbiology*. 2014;14:311.
13. Raymond F, Deraspe M, Boissinot M, Bergeron MG, Corbeil J. Partial recovery of microbiomes after antibiotic treatment. *Gut microbes*. 2016;7(5):428-34.
14. Solano-Aguilar G, Fernandez KP, Ets H, Molokin A, Vinyard B, Urban JF, et al. Characterization of fecal microbiota of children with diarrhea in 2 locations in Colombia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2013;56(5):503-11.
15. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018;32(1):9-25.
16. Rutten NB, Rijkers GT, Meijssen CB, Crijns CE, Oudshoorn JH, van der Ent CK, et al. Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. *BMC pediatrics*. 2015;15:204.

17. Integrative HMPRNC. The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell host & microbe*. 2014;16(3):276-89.
18. Proctor LM. The National Institutes of Health Human Microbiome Project. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2016;21(6):368-72.
19. Human Microbiome Project C. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012;486(7402):215-21.
20. Gagniere J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(2):501-18.
21. Vangay P, Ward T, Gerber JS, Knights D. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell host & microbe*. 2015;17(5):553-64.
22. Budding AE, Grasman ME, Eck A, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CM, van Bodegraven AA, et al. Rectal swabs for analysis of the intestinal microbiota. *PloS one*. 2014;9(7):e101344.
23. Hughes R, Alkan Z, Keim N, Kable M. Impact of sequence variant detection and bacterial DNA extraction methods on the measurement of microbial community composition in human stool. *bioRxiv*. 2017.
24. Whelan FJ, Surette MG. A comprehensive evaluation of the sl1p pipeline for 16S rRNA gene sequencing analysis. *Microbiome*. 2017;5(1):100.
25. Nguyen NP, Warnow T, Pop M, White B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes*. 2016;2:16004.

