

Máster en Microbiota, Probióticos y Prebióticos

**Análisis y caracterización
metagenómica de la microbiota
intestinal en niños con PIMS post-
COVID-19. Estudio exploratorio.**

Dr. Christian Boggio Marzet

Tutor: Dr. Guillermo Alvarez Calatayud

Trabajo Fin de Máster - Año 2021

INDICE

1.INTRODUCCIÓN	PÁG. 3
2.JUSTIFICACIÓN DE LA RELEVANCIA DEL TEMA	PÁG. 5
3.MARCO TEÓRICO	PÁG. 7
4.HIPÓTESIS	PÁG. 11
5.OBJETIVOS	PÁG. 11
6.METODOLOGÍA	PÁG. 12
7.CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN	PÁG. 13
8.DEFINICIÓN DE VARIABLES	PÁG. 16
9.RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	PÁG. 18
10.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	PÁG. 23
11.BIBLIOGRAFÍA	PÁG. 24

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la pandemia, algunos niños y adolescentes desarrollaron un síndrome inflamatorio sistémico asociado temporalmente con la infección por SARSCoV-2. Este síndrome hiper inflamatorio, observado en muchos casos entre las 2 a 6 semanas luego de la infección por SARS-CoV-2, recibe el nombre de Síndrome Inflamatorio Multisistémico pediátrico - Asociado temporalmente con el SARS-CoV-2 (PIMS-TS) o Síndrome Inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C).

La presentación clínica es variada, observándose características de Enfermedad de Kawasaki (completo o incompleto), Síndrome de shock tóxico, Síndrome hemofagocítico secundario, o síndrome de activación macrofágica.

Estas enfermedades inflamatorias multisistémicas son trastornos emergentes que resultan de una respuesta inusual a la infección por SARS-CoV-2 que está mediada por los sistemas inmunológicos innatos y adquiridos del huésped.

Existen marcadores biológicos del proceso inflamatorio que se utilizan para diagnóstico: Elevación de ERS, PCR, neutrofilia, ferritina, troponina, BNP, fibrinógeno, dímero D, pruebas de función hepática y marcadores sanguíneos convencionales. También se ha observado hipoalbuminemia y prolongación del RIN. Estos son indicadores confiables de la intensidad del proceso inflamatorio y vuelta a la normalidad a medida que cede la inflamación.

A su vez, hay parámetros sencillos para evaluar la mejoría clínica como la necesidad de oxigenoterapia, inotrópicos, cuidados intensivos u otro soporte.

El PIMS es una nueva entidad que tiene una baja prevalencia, pero conlleva un riesgo importante de complicaciones, internaciones de alta complejidad y secuelas desconocidas a

largo plazo. El pronóstico actual del PIMS-ST es bueno con reportes de baja mortalidad, aunque su reconocimiento tardío podría empeorar los resultados. Puede requerir el ingreso en cuidados intensivos y el uso de recursos médicos que ocasionalmente se encuentren limitados en hospitales generales.

Aunque COVID-19 es principalmente una enfermedad respiratoria, existe una creciente evidencia que sugiere que el tracto gastrointestinal está involucrado en esta enfermedad. La composición del microbioma intestinal se altera en pacientes con COVID-19, y la composición perturbada se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

Varias líneas de evidencia, como la replicación del SARS-CoV-2 en enterocitos humanos, la detección de virus en muestras fecales y la composición alterada de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19, sugieren la participación del tracto GI.

La composición de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 concuerda con la gravedad de la enfermedad y la magnitud de las concentraciones plasmáticas de varias citocinas inflamatorias, quimiocinas y marcadores sanguíneos de daño tisular. En un estudio realizado por Yeoh et al, los pacientes con COVID-19 presentaban disminución de bacterias intestinales con potencial inmunomodulador, como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* y varias especies de bifidobacterias. También se demostró que la composición disbiótica de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 persiste después de la eliminación del virus.

Estos hallazgos sugieren que la pérdida en número de bacterias intestinales inmunomoduladoras contribuye a la gravedad de la enfermedad por COVID-19. Se ha postulado que la microbiota intestinal disbiótica que persiste incluso después de la resolución de la enfermedad podría ser un factor en el desarrollo de síntomas persistentes y/o síndromes

de inflamación multisistémica que ocurren en algunos pacientes después de la eliminación del virus.

La restitución de entornos bacterianos benéficos perdidos durante la infección por COVID-19 podría servir como una vía novedosa para mitigar la enfermedad grave, lo que subraya la importancia de controlar la microbiota intestinal de los pacientes durante y después del COVID-19.

JUSTIFICACIÓN DE LA RELEVANCIA DEL TEMA

Desde el inicio del PIMS, y en verdad desde el inicio de la pandemia ha habido en la comunidad médica y científica un profundo interés en conocer más acerca de esta entidad por su importancia y su impacto en la salud de la población a nivel mundial. Ha sido un ejemplo como la comunidad científica se ha comunicado y ha actuado de forma solidaria en la búsqueda del conocimiento.

El Hospital Garrahan, centro asociado para la realización de este estudio y centro pediátrico de referencia, está preparado para abordar la complejidad que requiere esta patología y se encuentra actualmente involucrado y comprometido en la investigación de esta entidad, mediante un protocolo madre inicial que involucra múltiples especialidades y permitirá conocer más sobre la entidad, su evolución y pronóstico.

Si bien se ha visto que los pacientes evolucionan favorablemente con los tratamientos instaurados hasta la fecha, aún hay numerosos aspectos sobre su fisiopatología, etiología, y seguimiento a largo plazo que aun desconocemos.

Sabemos que la microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos, principalmente bacterias, alojadas a lo largo del tracto intestinal, donde cumplen un efecto

barrera frente a posibles patógenos y, a la vez, modulan la respuesta inmunológica del intestino. Los vínculos entre el SARS-CoV-2 y el sistema digestivo, particularmente sobre cómo interactúa el virus con la microbiota intestinal, es un interrogante que está comenzando a estudiarse a nivel mundial, y plantea la necesidad e interés de examinar el rol y comportamiento de la microbiota en la evolución de dicha infección viral.

Esta nueva línea de investigación está focalizada en conocer la microbiota y el microbioma intestinal de pacientes con diagnóstico de PIMS y compararlo con niños sanos.

Se trata de un trabajo original ya que no hay publicaciones a la fecha que investiguen esos aspectos, que surgen de la necesidad de responder interrogantes que aun no conocemos; si realmente existe una composición diferente de microbiota intestinal en estos pacientes con un microbioma intestinal desequilibrado (disbiótico). En este sentido, en lo que respecta al procesamiento y análisis de muestras de materia fecal para análisis de microbiota y microbioma humano, el presente proyecto propone un abordaje técnico y científico completo dentro del equipo de trabajo que lidera el mismo. Dicho abordaje end-to-end contempla todos los pasos requeridos, desde la recolección de muestras de materia fecal con recipientes especialmente diseñados para tal fin, pasando por todo el procesamiento y preparación de bibliotecas genómicas, hasta el post-procesamiento luego de la secuenciación, análisis e interpretación de los resultados de microbiota (taxonomía y abundancias de microbios) y microbioma (para análisis de posibles rutas metabólicas que se estén expresando).

El resultado de esta investigación podría mejorar la atención de nuestros pacientes colaborando con la generación de conocimiento de toda la comunidad científica y en general.

Los resultados obtenidos a partir de este trabajo exploratorio podrán demostrar el estado de “salud” intestinal de estos pacientes PIMS y abrirán nuevas líneas de investigación

que podrán ahondar en profundidad los diferentes mecanismos de acción no sólo de la microbiota sino de sus productos del metabolismo en relación al SARS-Cov-2.

MARCO TEÓRICO

La microbiota intestinal humana está formada por más de un billón de microorganismos en un ecosistema complejo y dinámico, que regula el sistema inmunológico y toda nuestra fisiología. *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son predominantes en el intestino, mientras que *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* predominan en el pulmón. Estos microbios desempeñan funciones muy importantes en el cuerpo, incluido el metabolismo nutricional, el desarrollo y la modulación de la inmunidad, así como la defensa contra patógenos dañinos. En el tracto gastrointestinal (TGI), la barrera epitelial protege contra la invasión de microorganismos patógenos y ayuda a mantener la tolerancia a los antígenos alimentarios, mientras que también puede estar asociada con funciones inmunes sistémicas y pulmonares. Una vez dañada la barrera, los microorganismos se trasladan al torrente sanguíneo o los pulmones y pueden inducir septicemia o síndrome de dificultad respiratoria aguda. La interacción compleja entre el sistema inmunológico y la microbiota intestinal se regulan y se apoyan mutuamente, ya que entre el 70 y el 80% de las células inmunitarias del cuerpo están presentes en el intestino. La disbiosis definida como cambios en la microbiota intestinal que conducen a un desequilibrio microbiano no solo se ha relacionado estrechamente con la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias, sino que también desempeña un papel fundamental en diversas infecciones. Existe evidencia de una interacción entre el tracto respiratorio y el TGI, o más precisamente, entre la microbiota intestinal y los pulmones, y esta conexión se denomina eje intestino-pulmón.

Los pacientes con COVID-19 sufren de diferentes manifestaciones clínicas relacionadas al proceso inflamatorio (fiebre, tos, mialgia, fatiga y neumonía) que pueden agravarse hasta el síndrome de dificultad respiratoria aguda o disfunción multiorgánica. Varios estudios han demostrado presencia de síntomas gastrointestinales durante el curso de la enfermedad como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Estos síntomas pueden deberse a la infección directa de los enterocitos por el SARS-CoV-2 a través de un fenómeno del eje intestino-pulmón que involucra el microbioma intestinal y pulmonar o mediante mecanismos inmunorreguladores. Los cambios en la composición taxonómica y la disminución de la diversidad y función de la microbiota intestinal, pueden afectar la inmunidad pulmonar así como la inflamación pulmonar por sí misma puede alterar la microbiota pulmonar autóctona.

Estudios recientes plantearon la hipótesis de que las endotoxinas, los metabolitos de la microbiota, las citoquinas y las hormonas del intestino podrían llegar al torrente sanguíneo y al nicho pulmonar, en una comunicación bidireccional entre el intestino y el pulmón. El estado inmunológico del huésped está influenciado por la microbiota intestinal y puede influir en el grado de inmunidad a las infecciones virales, incluido el SARS-CoV-2.

Varios pacientes con COVID-19 presentaron síntomas gastrointestinales y las manifestaciones prolongadas, principalmente la diarrea, se correlacionaron inversamente con la disminución de la riqueza y diversidad de la microbiota, asociada con la disregulación inmune y el retraso en la eliminación del SARS-CoV-2. Se especula que la expresión del receptor ACE-2 que requiere el SARS-CoV-2 para ingresar a las células huésped, podría estar modulada por el microbioma intestinal.

Gu y col. en China, evaluaron la microbiota intestinal de 30 sujetos COVID-19, 24 pacientes H1N1 y 30 controles sanos. Los sujetos infectados con SARS-CoV-2 tuvieron una disminución en la diversidad de la microbiota intestinal en comparación con los controles, con

predominio de géneros oportunistas, como *Actinomyces*, *Rothia*, *Streptococcus* y *Veillonella*, además de una disminución en la abundancia relativa de microbios beneficiosos, como los géneros de *Bifidobacterium*.

Como la disbiosis podría ser un factor esencial en la gravedad de la enfermedad durante el COVID-19, es esencial mantener un intestino sano. Las dietas bajas en fibra y altas en grasas / carbohidratos suelen ser responsables de la disbiosis intestinal, y este cambio en la homeostasis podría ser responsable de una respuesta inmunitaria alterada. Se aconseja una dieta sana y equilibrada, rica en cereales, cereales integrales, legumbres, frutas y verduras a los pacientes de COVID 19 que se encuentren asintomáticos o pacientes con síntomas leves o en cuarentena. La correlación inversa entre el consumo de fibra dietética y los niveles séricos de proteína C reactiva, IL-6, IL-18 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que son fuertes citoquinas inflamatorias, es la razón principal por la cual enfatizar este tipo de dieta.

Hay un número creciente de estudios que evalúan el efecto de la administración de probióticos / prebióticos en la reducción de la incidencia, duración y gravedad de las infecciones respiratorias virales. En vista del conocimiento actual, se está investigando la modulación de la microbiota como una posible terapia adyuvante para COVID-19. El potencial uso de probióticos, microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped, está respaldado por estudios experimentales, metaanálisis y ensayos clínicos sobre virus de influenza, rinovirus y virus sincicial respiratorio. Aunque los mecanismos no se han determinado en la infección por SARS-CoV-2, algunas cepas probióticas presentan propiedades antivirales en otros coronavirus. Además de prevenir las infecciones de las vías respiratorias inferiores y superiores, los probióticos podrían ayudar en el tratamiento de la diarrea asociada con la infección por SARS-CoV-2 en sí misma o causada por los antibióticos utilizados para tratar las infecciones pulmonares secundarias. La mejora de la microecología intestinal y el proceso

de eubiosis mediante la ingesta de probióticos puede promover un sistema inmunológico regulado y prevenir una inflamación excesiva o infecciones secundarias. Algunas cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus paracasei* y *L. rhamnosus* reducen la aparición de infecciones respiratorias, como H1N1, H3N2 y H5N1 al potenciar las respuestas inmunitarias de la vacuna. Esta mejora de las interacciones entre la microbiota y el sistema inmunológico de las mucosas también podría beneficiar las respuestas inmunitarias a la vacunación contra el virus SARS-CoV-2. Sin embargo, aunque se plantea la hipótesis de que la disbiosis o la modulación de la microbiota podrían afectar potencialmente la eficacia de las vacunas COVID-19, hasta la fecha, no existen estudios publicados sobre la relación entre la microbiota intestinal y pulmonar y la vacunación contra esta infección.

La microbiota intestinal sana, entonces, puede controlar la infección pulmonar causada por el SARS-CoV-2 al producir una gran cantidad de células inmunes en comparación con un número menor de células inmunitarias por disbiosis de la misma. Los probióticos y prebióticos de la dieta son los moduladores cruciales en la regulación del entorno microbiano intestinal y podrían ser favorables para mantener la homeostasis modificando la infección por SARS-CoV-2. El propósito de los probióticos y otras formas de modular la microbiota intestinal en COVID-19 exige más exploraciones, particularmente ensayos clínicos controlados, doble ciego y aleatorizados, que incluyan cohortes más grandes en diferentes edades y cursos de enfermedad.

HIPÓTESIS

Los niños con PIMS tendrían un microbioma intestinal desequilibrado (disbiótico). La identificación de biomarcadores podrían predecir la evolución clínica y esto resulta clave para ayudar a priorizar a estos pacientes que necesitan un abordaje y tratamiento urgente. Por otra parte, evaluar las muestras de hisopado de materia fecal obtenidas de pacientes pediátricos permitirá medir riqueza, diversidad y abundancia relativa de bacterias así como análisis metagenómico de las muestras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar los perfiles de microbiota y microbioma fecal asociados a niños con PIMS respecto a niños sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enumerar, en forma preliminar, posibles diferentes perfiles de microbiota y microbioma en niños sanos y niños con PIMS estratificando por edad y sexo.
- Comparar los perfiles de microbiota y microbioma en niños sanos con los asociados a niños con PIMS a fin de estudiar las diferencias a nivel de géneros y especies microbianas.
- Valorar los parámetros clínicos y de gravedad correlacionando el fenotipo de PIMS y la composición microbiana.

METODOLOGÍA

Tipo y diseño del estudio

Estudio descriptivo, prospectivo, analítico, piloto, exploratorio, de evaluación a partir de muestras de materia fecal.

Durante todo el estudio cada paciente sólo deberá tomar la muestra en una oportunidad. Si el paciente lo desea, podrá solicitar una copia de los resultados de los estudios realizados, los que serán entregados por el investigador posteriormente.

Población

Se incluirán pacientes de 3 a 16 años de edad, asistidos en el Hospital Garrahan que cumplan con todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión ingresados desde el 1 de junio de 2021 al 1 de junio de 2022.

Se tratará de una muestra consecutiva y seleccionada por conveniencia.

La población de niños sanos se tomará siguiendo el mismo grupo etario a partir de consultorios de salud integral del niño.

Por lo tanto, la población estará integrada por dos grupos:

Grupo 1: pacientes con PIMS de 3 a 16 años de edad

Grupo 2: pacientes control sin patología de 3 a 16 años de edad

Tamaño de la muestra

Por tratarse de un estudio de tipo piloto, con un objetivo primario netamente científico y clínico y con el propósito de obtener información de forma sistematizada, sin intención de generalizar o extrapolar resultados sino más bien de evaluar y caracterizar la microbiota de los pacientes PIMS, se decidió la incorporación de 30 pacientes por grupo de estudio.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todos los niños que cumplan con los siguientes criterios serán considerados elegibles para este ensayo:

1. Niños de 3 a 16 años de edad con diagnóstico de Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico - asociado temporalmente con el SARS-CoV-2 (PIMS-TS) de la OMS y CDC.
2. Consentimiento informado firmado por el padre tutor o encargado del sujeto en estudio, el médico autorizado y un testigo independiente cuando corresponda.
3. Asentimiento informado firmado por el niño en estudio si es mayor de 12 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los sujetos que presenten al menos uno de los siguientes criterios, no podrán ser considerados elegibles para el estudio:

1. Pacientes identificados con un diagnóstico alternativo una vez realizados todos los estudios iniciales.
2. Uso de antibióticos y/o corticoides orales entre el último mes y el ingreso.

3. Presencia de comorbilidades: asma, alergia, inmunodeficiencia primaria, inmunodeficiencia secundaria HIV, enfermedad autoinmune, artritis idiopática juvenil, obesidad severa, enfermedad pulmonar crónica, cardiopatía congénita, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática crónica, Trastorno neurológico crónico, enfermedad de Kawasaki previa, enfermedades neoplásicas, anemia drepanocítica.

4. Imposibilidad de cumplir con los requerimientos del protocolo.

Discontinuación de pacientes

El Investigador podrá discontinuar la participación en el estudio de cualquiera de los pacientes por alguna de las siguientes razones:

1. Retiro voluntario del paciente o alguno de sus padres/tutores por cualquier razón
2. Incumplimiento de los requerimientos administrativos del protocolo
3. Recibir cualquier otro tratamiento para la enfermedad de base durante el transcurso del presente protocolo

En el caso en que el paciente retire su consentimiento, se deberán registrar las razones que motivaron tal decisión en la historia clínica y en el FRD.

Definición operativa de variables de estudio y medición de resultados:

Definición de caso PIMS (preliminar) según OMS:

Niños y adolescentes entre 0 y 19 años con Fiebre ≥ 3 días con DOS de los siguientes criterios:

1. Exantema o conjuntivitis bilateral no supurativa y/o afectación mucocutánea

2. Hipotensión o shock

3. Disfunción miocárdica, pericarditis, valvulitis o anomalías coronarias (datos ecocardiográficos) y/o elevación de parámetros de daño miocárdico (troponina y/o NT-Pro BNP)

4. Coagulopatía (alteración TP, TTPA, fibrinógeno, dímero D elevado 6X0.5 FEU (estudios de adultos).

5. Afectación gastrointestinal (vómitos, diarrea o dolor abdominal)

y

- Elevación de PCR (>50 mg/L) y/o PCT > 1 ng/dl y/o Velocidad de Sedimentación (ERS)
- Ninguna otra causa microbiana evidente de inflamación, incluida la sepsis bacteriana, los síndromes de choque estafilocócicos o estreptocócicos.
- Evidencia de infección COVID-19 (RT-PCR, serología, nexo epidemiológico)

NOTA: Considerar este síndrome en niños con manifestaciones de enfermedad de Kawasaki típica o atípica o de síndrome de shock tóxico.

Definición de caso del CDC para el Síndrome Inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C)

Un individuo menor de 21 años que presenta fiebre (i), evidencia de laboratorio de inflamación (ii) y evidencia de enfermedad clínicamente grave que requiera hospitalización, con afectación de órganos multisistémicos (> 2) (cardíacos, renales, respiratorios, hematológicos, gastrointestinales, dermatológicos o neurológicos);

y

- No hay diagnósticos alternativos plausibles;
 - Positivo para infección por SARS-CoV-2 actual o reciente mediante RT-PCR, serología o prueba de antígeno; o exposición al COVID-19 dentro de las 4 semanas anteriores al inicio de los síntomas
- i. *Fiebre > 38,0 °C durante ≥24 horas, o informe de fiebre subjetiva que dura ≥24 horas*
- ii. *Incluyendo, entre otros, uno o más de los siguientes: una proteína C reactiva elevada (PCR), velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSG), fibrinógeno, procalcitonina, dímero D, ferritina, ácido láctico, lactatodeshidrogenasa (LDH) o interleucina 6 (IL-6), neutrófilos elevados, linfocitos reducidos y albúmina baja*

Comentarios adicionales:

- Algunas personas pueden cumplir con los criterios totales o parciales de la enfermedad de Kawasaki, pero se deben informar si cumplen la definición de caso para MIS-C.
- Considerar MIS-C en cualquier muerte pediátrica con evidencia de infección por SARS-CoV-2.

DEFINICIÓN DE VARIABLES Y SU OPERACIONALIZACIÓN

Variables demográficas:

- Fecha de internación
- Fecha diagnóstico de PIMS

- Edad (variable cuantitativa expresada en años)
- Sexo (variable categórica dicotómica)
- Peso (variable cuantitativa expresada en gramos)
- Talla (variable cuantitativa expresada en centímetros)
- IMC (variable cuantitativa)
- Criterio de enrolamiento (serología, PCR).
- Criterio de inclusión: OMS/CDC

Variables clínicas:

- Días de fiebre al diagnóstico (variable cuantitativa)
- Vómitos, diarrea, dolor abdominal, otros síntomas gastrointestinales.
- Presencia de Shock al ingreso (variable categórica dicotómica)
- Tipo de Shock (variable categórica dicotómica)

Variables de laboratorio:

- Recuento de linfocitos y neutrófilos (variable cuantitativa)
- Valores de hemoglobina al ingreso, albumina. (variable cuantitativa)
- PCR y otros reactantes de fase aguda. (variable cuantitativa)
- Rescate de gérmenes en Coprocultivo, virológico en materia fecal (variable categórica dicotómica)
- Serologías virales (variable categórica dicotómica)
- Fenotipo de presentación: alteración de microbioma y afectación tipo sistémica o simil Kawasaki (variable categórica dicotómica)

- Requirió gammaglobulina, días de respuesta. Corticoides. Antibióticos. (variable categórica dicotómica)
- Criterio de gravedad: días de UCI, ARM, Inótrópicos. (variables cuantitativa y categórica dicotómica)

Variables Microbioma intestinal:

- Perfiles de microbiota y microbioma del paciente PIMS y comparación con población de niños sanos.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El presente estudio toma como punto de partida el hecho de que los PIMS no tienen un tratamiento médico/farmacológico con probada eficacia. La propuesta de este trabajo cuenta con las mejoras registradas debido a la regulación nutricional para encontrar factores genéticos/proteómicos de los microorganismos presentes en el intestino. A continuación, se detallan los aspectos metodológicos específicos en lo que respecta a recolección, procesamiento y análisis de muestras de materia fecal para análisis de microbiota y microbioma, para cumplir con los objetivos propuestos:

Recolección de muestras:

Las muestras de materia fecal serán recolectadas por un adulto responsable del niño utilizando el kit DNA/RNA shield fecal collection tube de Zymo Research, para lo cual dicha

persona adulta será capacitada por el profesional de la salud que se lo proporcione. Cada muestra contenida en el kit de recolección de Zymo Research podrán permanecer a temperatura ambiente sin someterlas a exposición solar hasta ser entregada al equipo médico que lidera el proyecto. Dicho kit inactiva, rompiendo paredes celulares de los microbios y conserva las muestras dejándolas listas para iniciar el procesamiento de éstas.

Pre-procesamiento de muestras:

Una vez se encuentren todas las muestras recolectadas, se procederá a realizar la purificación del ADN para luego continuar con el armado y preparación de bibliotecas genómicas. La purificación será realizada con el kit ZymoBIOMCS DNA MiniPrep de Zymo Research, mientras que el armado y preparación de bibliotecas genómicas se realizará con el kit Nextera DNA Flex Library Prep, siguiendo todos los pasos de acuerdo al protocolo sugerido por Zymo Research e Illumina, respectivamente. La secuenciación se llevará a cabo conteniendo las muestras mezcladas en un mismo tubo en un equipo NextSeq de Illumina.

Post-procesamiento de muestras, análisis de microbiota y microbioma:

El análisis metagenómico de las muestras, luego del proceso de secuenciación, comienza con el ensamblado de las lecturas de secuencia más cortas, para así obtener secuencias más largas (contigs o scaffolds) para lo que se utilizarán herramientas como MetaVelvet (Namiki et al., 2012) o MetaPar (Kim et al., 2013), ya que las lecturas más largas proporcionan una anotación de genes y una predicción de la filogenia más precisas. Para identificar los genes putativos de codificación de proteínas, se realizará una búsqueda en BLASTX (Brit et al., 2001) contra una base de datos no redundante o una base de datos de secuencias genómicas microbianas específicas para el entorno o sitio de interés. Los datos

funcionales de las proteínas predichas se inferirán mediante la búsqueda en bases de datos de rutas metabólicas como KEGG (Kanehisa et al., 2004) y COG (Tatusov et al., 2003). La estructura y composición de la microbiota a analizar se evaluará cuantificando e interpretando similitudes basadas en los análisis de diversidad intra e intergrupo (diversidad alfa y beta, respectivamente). Para la diversidad alfa, se calculará la mejor cobertura y el número de unidades taxonómicas operativas (OTUs), así como la cantidad de ASVs (Amplicon sequence variant) de cada muestra utilizando Qiime2 (Bolyen et al., 2018) y el paquete Vegan de R (Oksanen et al., 2015). La diversidad beta se evaluará utilizando distancias UniFrac generalizadas basadas en la filogenia calculada con el paquete GUniFrac de R (Chen et al., 2012). Las comparaciones entre grupos de individuos se realizará utilizando la función adonis (ANOVA usando matrices de distancia) del ANOVA multivariado permutacional (PERMANOVA) implementado en el paquete Vegan de R (Oksanen et al., 2015). Los parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos medidos se expresarán como media y se utilizará el test ANOVA para comparar las diferencias entre los grupos de estudio elegidos.

CODIFICACIÓN DE PACIENTES

A todos los pacientes se les otorgará un código único de identificación, por el cual serán identificados a lo largo de todo el estudio. Este código será otorgado de manera consecutiva de acuerdo a la inclusión del paciente al protocolo.

Una vez firmado el consentimiento informado, y verificado el cumplimiento de todos los criterios de elegibilidad, se procederá a la toma de 1 muestra (hisopado).

DESCRIPCIÓN DE LAS VISITAS DEL ESTUDIO

Durante todo el estudio, el paciente deberá cumplir con una sola visita. Durante esta visita se llevarán a cabo todas las evaluaciones necesarias para determinar la inclusión del paciente al estudio.

Los procedimientos a realizarse durante esta visita son:

1. Apertura de la historia clínica. El Investigador Principal o el profesional por él delegado, entrevistará a cada paciente o madre o padre, tutor o encargado según corresponda, y lo interrogará sobre antecedentes que puedan confirmar o impedir su posible inclusión en el protocolo. Se efectuará la anamnesis y la evaluación clínica necesaria para confirmar el diagnóstico.
2. Proceso de consentimiento informado. Durante la entrevista se le explicará al paciente/madre, padre, tutor o representante legal, el protocolo y se le dará a leer la Hoja de Información para Pacientes y el Formulario de Consentimiento Informado. A los menores de edad, pero mayores de 12 años, se les dará un asentimiento, el que también le será leído y explicado. Una vez que el/la paciente/madre, padre, tutor o representante legal haya leído y comprendido toda la información administrada y haya solicitado las aclaraciones necesarias, se le solicitará que firme Consentimiento Informado y si el paciente es menor de edad, pero mayor de 12 años, se le pedirá que firme un asentimiento.
3. Estudios complementarios. Por las características del protocolo, dado que se trata de un análisis ex vivo, no serán necesarios estudios complementarios pero sí serán adjuntados a la historia clínica en el caso de que se realicen para un análisis posterior.

Una vez cumplidas todas las evaluaciones mencionadas, se procederá a la toma de las muestras de hisopado (ver sección toma de muestras) y el paciente podrá retirarse del sitio de investigación sin necesidad de nuevos controles ambulatorios.

Con esta visita, finalizará el ensayo clínico. Si el paciente lo desea, podrá solicitar el resultado de los cultivos y estudios realizados, los que serán entregados por el investigador una vez finalizados los mismos, y en una fecha pactada entre ambos.

INTERRUPCIÓN/DISCONTINUACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio podrá ser discontinuado cuando por razones ajenas a los Investigadores o a los Patrocinadores no pudiera obtenerse la provisión del material necesario para el estudio de las muestras o su procesamiento.

PROCEDIMIENTO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS (INSTRUMENTOS Y MÉTODO PARA CONTROL DE CALIDAD)

Manejo de datos

Luego de completar los CRF, se entrarán todos los datos a una base de datos. Se realizará un control y validación de datos con doble carga para asegurar la agudeza y consistencia de los datos cargados. Toda discrepancia generada como resultado de este control deberá ser resueltas en formularios de aclaración de datos (FAD) que deberán ser confirmados por el investigador. Una vez que todas las dudas sean resueltas, la base de datos será cerrada y se realizará el análisis estadístico.

Formulario de reporte de caso (CRF)

Todos los datos generados en el estudio deberán ser registrados en el CRF correspondiente a cada paciente. Los datos reportados sobre el CRF deben ser consistentes con los documentos-fuente. Cualquier discrepancia deberá ser correctamente explicada. Se abrirá un CRF en todos aquellos pacientes que luego de la evaluación inicial sean admitidos en el protocolo.

Los CRF deberán ser completados por el personal del sitio de investigación y con tinta de color negro. Cualquier cambio o corrección que se realice sobre el mismo, deberá estar inicializada y fechada por la persona que realiza el cambio, sin ocultar la información que reemplaza (tachando sólo con una línea la información original). Otra opción será la elaboración de formulario en RedCap.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se presentará una estadística descriptiva de todas las variables analizadas. La descripción de las variables numéricas y categóricas, serán resumidas de la siguiente manera:

- Variables numéricas: número de datos obtenidos (n), media, desvío estándar (DE), mínimo, máximo, media, primer cuartilo (Q1) y tercer cuartilo (Q3)-
- Variables categóricas: número de datos obtenidos (n), frecuencias y porcentajes. Los datos faltantes no serán considerados para los porcentajes.

Para comparar variables continuas se utilizará una prueba t o prueba de Wilcoxon, mientras que, para las variables no continuas o categóricas, se utilizará un test de chi-cuadrado o de Fisher.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dove, Matthew L., et al. Multisystem inflammatory syndrome in children: survey of protocols for early hospital evaluation and management. *The Journal of Pediatrics* 229 (2021): 33-40.
2. Kabeerdoss, Jayakanthan, et al. Severe COVID-19, multisystem inflammatory syndrome in children, and Kawasaki disease: immunological mechanisms, clinical manifestations and management. *Rheumatology international* (2020): 1-14.
3. Dufort, Elizabeth M., et al. Multisystem inflammatory syndrome in children in New York State. *New England Journal of Medicine* 383.4 (2020): 347-358.
4. Henderson, Lauren A., et al. American College of Rheumatology Clinical Guidance for Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated With SARS-CoV-2 and Hyperinflammation in Pediatric COVID-19: Version 1. *Arthritis & Rheumatology* 72.11 (2020): 1791-1805.
5. Kohn-Loncarica, G et al. Recomendaciones para el manejo inicial del síndrome inflamatorio multisistémico relacionado temporalmente con COVID-19, en niños y adolescentes. *Arch Argent Pediatr* 118.6 (2020): e514-e526.
6. Sahn, Benjamin, et al. Features of intestinal disease associated with COVID-related multisystem inflammatory syndrome in children. *JPGN* 72.3 (2021): 384.
7. Zhang, Lei, et al. Diarrhea and altered inflammatory cytokine pattern in severe coronavirus disease 2019: impact on disease course and in-hospital mortality. *Journal of gastroenterology and hepatology* 36.2 (2021): 421-429.
8. Lamers, Mart M., et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* 369.6499 (2020): 50-54.

9. World Health Organization. Síndrome Inflamatorio Multisistémico En Niños y Adolescentes Con COVID-19. World Health Organization: Geneva, Switzerland (2020): 1-3.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Interim clinical guidance for management of patients with confirmed coronavirus disease (COVID-19). (2020).
11. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020;20:363–74. <https://doi/10.1038/s41577-020-0311-8>
12. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity* 2020;52:910–41. <https://doi/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
13. Cheung EW, Zachariah P, Gorelik M, et al. Multisystem inflammatory syndrome related to COVID-19 in previously healthy children and adolescents in New York City. *JAMA* 2020;324:294. <https://doi/10.1001/jama.2020.10374>
14. Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A, et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet* 2020;395:1771–8. [https://doi/10.1016/S0140-6736\(20\)31103-X](https://doi/10.1016/S0140-6736(20)31103-X).
15. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, et al. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology* 2020;159:944–55. <https://doi/10.1053/j.gastro.2020.05.048>
16. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut* 2021;70:698-706.
17. Gu S, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Gao H, Lv, Feifei Guo L, Zhang L, Luo R, Huang C, Lu H, Zheng B, Zhang J, Yan R, Zhang H, Jiang H, Xu Q, Guo J, Gong Y, Tang L, Li L. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or

- H1N1 Influenza, *Clinical Infectious Diseases* 2020; 71(10):2669–2678.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa709>
18. Silva Andrade B, Siqueira S, de Assis Soares WR, et al. Long-COVID and Post-COVID Health Complications: An Up-to-Date Review on Clinical Conditions and Their Possible Molecular Mechanisms. *Viruses*. 2021;13(4):700. Published 2021 Apr 18. <https://doi/10.3390/v13040700>
 19. Esposito S, Principi N. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Related to SARS-CoV-2. *Paediatr Drugs*. 2021 Mar;23(2):119-129. <https://doi/10.1007/s40272-020-00435-x>.
 20. Yamamoto S, Saito M, Tamura A, Prawisuda D, Mizutani T, et al. (2021) The human microbiome and COVID-19: A systematic review. *PLOS ONE* 16(6): e0253293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253293>
 21. Carfi A, Bernabei R, Landi F, et al. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. *JAMA*2020; 324:603.doi:10.1001/jama.2020.12603
 22. Ahmed M, Advani S, Moreira A, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children: a systematic review. *EClinicalMedicine* 2020; 26: 100527. <https://doi:10.1016/j.eclinm.2020.10052>
 23. Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y, MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads , *Nucleic Acids Research*, Volume 40, Issue 20, 1 November 2012, Page e155, <https://doi.org/10.1093/nar/gks678>
 24. Kim M, Ligo JG, Emad A, Farnoud F, Milenkovic O, Veeravalli VV, MetaPar: Metagenomic sequence assembly via iterative reclassification, 2013 IEEE Global Conference on Signal and Information Processing, 2013, pp. 43-46, <https://doi.org/10.1109/GlobalSIP.2013.6736807>.

25. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M, The KEGG resource for deciphering the genome, *Nucleic Acids Research*, Volume 32, Issue suppl_1, 1 January 2004, Pages D277–D280, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh063>
26. Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D. et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4, 41 (2003). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-41>
27. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet C, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope E, Da Silva R, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley G, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler B, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MG, Lee J, Ley R, Liu Y, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton J, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson, II MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ull-Hasan S, van der Hooft JJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CH, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. 2018. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ Preprints* 6:e27295v2 <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>

28. Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. and Wagner, H. (2014) Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.2-0. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>
29. Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu GD, Collman RG, Bushman FD, Li H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*. 2012 Aug 15;28(16):2106-13. <https://doi/10.1093/bioinformatics/bts342>.