



MICROBIAL INDEX IN SPONDYLOARTHRITIS WITH AND WITHOUT INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Carolina Mijancos Aguirre

1 DE NOVIEMBRE DE 2017

FINAL PROJECT
MEDICINE UNIVERSITY OF GIRONA

Microbial index in spondyloarthritic patients with and without intestinal bowel disease.

1. **Abstract:** A 60% of Spondyloarthritic patients have a subclinical low-degree chronic intestinal inflammation and a 7% of them will develop an Intestinal bowel disease. Currently, some studies demonstrate a dysbiosis on ankylosing spondylitis and a common immune disturbance background with intestinal bowel disease. *F.Prausnitzii/E.coli* index has demonstrated significant differences between Crohn's disease and Healthy controls. In this study, we want to know how this microbial index works as a marker on stool samples in patients with Ankylosing spondylitis with and without Intestinal bowel disease.
2. **Objectives:** To compare the microbial index (concentration of *F.prausnitzii* and *E.coli*) on stool sample in two groups of patients with ankylosing spondylitis; those with and without Crohn's disease.
3. **Population:** a total of 60 Anti-TNF naïve patients will be included this study. 20 Chron's disease patients (CDAI >220 low-mild moderate activity), 20 Spondylitis patients without IBD and 20 Spondylitis patients with IBD.
4. **Design:** Transversal descriptive study
5. **Key words:** Spondyloarthritis (SpA), Ankylosing spondylitis (AS), Intestinal Bowel Disease (IBD), Crohn's disease (CD) *Faecalibacterium Prausnitzii* (*F. Pra*), *Escherichia Coli* (*E. Coli*). Microbial index (*F. Prausnitzii/E.coli*), Dysbiosis.

INDEX

1	INTRODUCTION	3
1.1	EPIDEMIOLOGIC FEATURES:	3
1.2	WHY MICROBIOTA?.....	4
1.3	MICROBIOTA AND IMMUNE RESPONSES	5
1.4	DYSBIOSIS: GUT-JOINT AXIS	7
1.5	WHY F.PRA/E.COLI INDEX?..	8
1.6	FACTORS THAT AFFECT MICROBIOTA:.....	10
1.7	INFLAMMATORY BOWEL DISEASE..	11
1.8	SPONDYLOARTHRITIS.....	12
1.9	FROM COLONOSCOPY TO STOOL SAMPLES:.....	15
2	JUSTIFICATION	16
3	HYPOTHESIS.....	16
4	OBJECTIVES.....	16
5	TYPE OF STUDY.....	17
6	POPULATION STUDY	17
7	MATERIAL AND METHODS.....	19
8	STATISTICS ANALYSIS	21
9	FEASIBILITY.....	22
9.1	Chronogram	22
9.2	Work planning	22
10	BUDGET	23
11	LIMITATIONS	23
12	ETHICS.....	24
13	ANEX.....	25
14	BIBLIOGRAPHY	38

1 INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a multifactorial heterogeneous disorder implying several environmental interactions on a genetic context. Symptoms entangles both axial and peripheral joint inflammation and extraarticular clinical spectrum that goes from skin involvement or uveitis to inflammatory bowel disease (IBD). Clinical and treatment overlap between SpA and IBD gives us a clue to look for a common scenario where immune dysregulation and Microbiota dysbiosis seem to play a role.

1.1 EPIDEMIOLOGIC FEATURES:

Strong epidemiologic evidence supports intimate relation between intestinal inflammation and rheumatology diseases:

On the one hand Inflammatory arthritis is one of the most common extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease (IBD). The prevalence of peripheral arthropathies has been estimated in 5-20% of patients, while the axial arthropathies have been estimated to be found in 3-25% of IBD patients. There is no major difference in the occurrence of spondyloarthritis between UC and Crohn's disease. Axial arthropathies (sacroiliitis and spondylitis) have been estimated to occur in 5-22% of patients with Crohn's disease and 2-6% of patients with UC. (1)

In 1980s a Belgium study was performed in patients with SpA and showed asymptomatic microscopic colonic inflammation detectable by colonoscopy in 50% of the patients.(2) Today's last studies showed that overall, 46.2% of the patients with SpA showed microscopic gut inflammation. (3) Patients with different forms of SpA about a 60-70% have chronic inflammation discovered by endoscopy, whose a 7% of those will develop IBD. This means a 8-10% of the total spondylitis. (4)

5-10% of Ankylosing Spondylitis patients have IBD.

The complex relation between the gut microbiome and host immune regulation in spondyloarthritic patients has been studied for long. Altered bowel flora or intestinal dysbiosis takes place in intestinal chronic inflammation. Consequently, interplay between microbiota composition and disease susceptibility would be the key to open the discussion.

1.2 WHY MICROBIOTA?

Altogether (epidemiology and physiopathology of IBD and SpA) encompass a family of immune mediated inflammatory process that could come from a first pre-inflammatory process on the bowel. This hypothesis and microbial barrier leads to a response.

Understanding how a microbiota's good maintenance modulates susceptibility in immune-mediated diseases as spondylitis and IBD is a big step towards better prevention and treatment for such diseases.

The human microbiome is composed approximately by 100 trillion cells whose genomes encode roughly 3.3 million protein-coding genes (100-fold more than ours) therefore this collective human-microbiome is defined by The National Institutes of Health microbiome project as a "supraorganism". (5) The intestinal microbiota interacts with and benefits the immune system in a mutualistic relation the complex formed by the genetic material of the microbiome and the host is called *metagenome*.

The faecal *metaproteoma* (study of proteins) is specific for each person and stable at least for a year. It has been described a stable, common and functional nucleus of approximately 1000 proteins that points out a common way of carbohydrates transport and degradation.

About 50% of the faeces is made up of bacteria. Trillions of microorganisms come from 4 main phyla: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Proteobacteria, with a predominance of Firmicutes and Bacteroidetes. Analysis in healthy people demonstrate 1.150 species: 50-75% Firmicutes, followed by Bacteroidetes (10-50%), Actinobacteria (1-10%) and a little percentage of Proteobacteria (<1%). (6)

There is a recent paper about new clusters called enterotypes that do not change by patient's characters as gender, age or IMC.

Microbiota's effects influence in the maintenance of IBD and potential role in the genesis of another intestinal disease as: Intestinal Bowel Syndrome, colonic cancer and diarrhoea related to antibiotics. (7)

1.3 MICROBIOTA AND IMMUNE RESPONSES

“Immune adaptations in response to colonization promotes host-microbial mutualism and immune homeostasis”.

Intestinal Homeostasis and mucus layer: To enhance efficiency digestion by degrading diet polysaccharides is the primary mission of mucus layer, but not all microorganisms have the same function. Ones cannot compete for nutrients with commensal microorganisms restringing their own colonization and others have a symbiotic relation so contribute to maintain the barrier against pathogens by stimulating immune responses through activation of pattern recognition receptors. Bacteria stimulate Toll-like receptor (TLRs) -epithelial receptors- and activating cytokine production by dendritic cells (DCs).

Epithelium cells (Enterocytes, goblet cells, Paneth cells) help producing antimicrobial peptides called defensins (α and β antimicrobial proteins) and C-type Lectines providing a weapon for kill or for inactivate bacteria. A lack of some of these peptides contributes to a suppression of adaptive immunity. NOD2 (nucleotid-binding oligomerization domain-containing protein 2) controls expression of a distinct subset of alfa-defensins. Also, epithelium cells, express a receptor for IL-22 important cytokine in charge of homeostasis. Goblet cells produce mucin glycoproteins conforming the mucus layer whose function is to delineate a protecting zone without bacteria on its apical surface being resistant to bacteria penetration. Lack of mucin glycoprotein MUC2 leads to spontaneous gut inflammation.

IgA: Is the mechanism for sequestering symbiotic bacteria. Bacteria-Dendritic cells (DCs) induce B cells, then differentiate into plasma cells and plasma cells produce IgA which is specific of the mucosa.

CD4+T cells: The adaptive immune system composed by T cells, TCR (T cells receptors). Depending on the gut zone there are **CD4+FOXP3+Treg** in the colon and small intestine and **CD4+FOXP3-IL-10+Treg** only in the small. They determine the threshold between non-inflammatory homeostasis and intestinal inflammation. Thanks to T cells there is no acute inflammation: neutrophils, lymphocytes into intestinal mucosa, cell proliferation, higher mucus production. Treg cells inhibit T helper cells. Treg are crucial as it exist a Thelper1 in mucosal layer induced by the metabolism of polysaccharides produced by Bacteroides Spp. (8) Illustration 1 shows their function in health and dysbiosis.

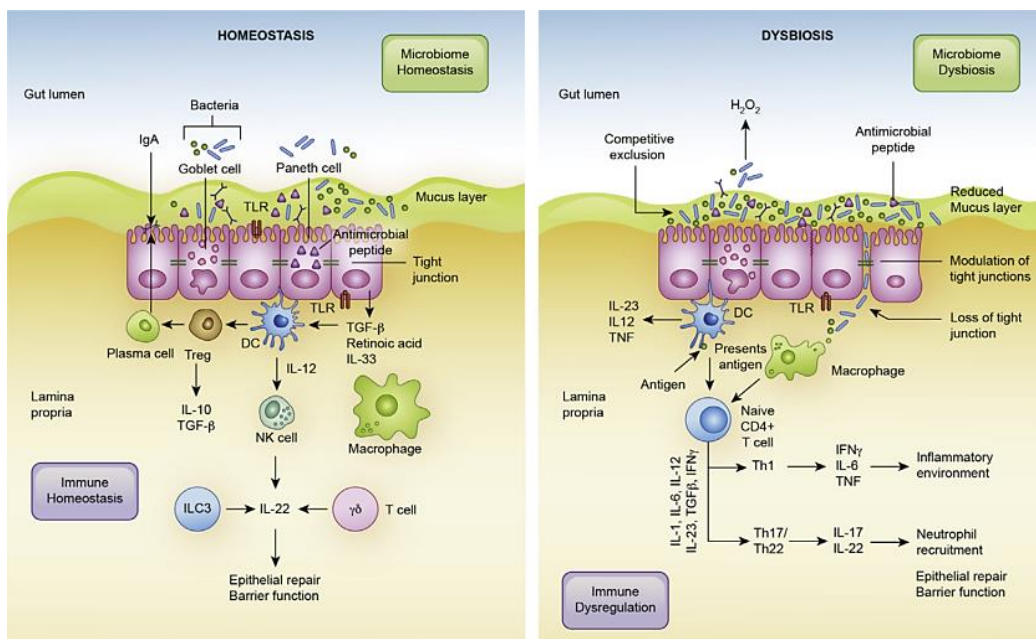


Illustration 1. Immune homeostasis and dysbiosis. *Homeostasis*: Bacteria interacts with TLR and CMH II receptors of epithelial cells whose generate antimicrobial peptides and activate Dendritic cells (DC) that activate IL12/22. Cytokine cascades call for Tcells, macrophages and NK cells. DC also calls for B cells that finally produce IgA. *Dysbiosis*: Bacteria concentration changes and contributes to reduce tight junction increasing the permeability and reducing defensin expression. TCD4+naïve calls Th1 and finally Th17/22. Th1 causes an inflammatory environment.

IBD: Consist in a stablished dysbiosis. IBD histology remarks a higher cell surface-associated bacterium, depletion in putative bacteria (e.g. bifidobacterial) and concomitant increase in detrimental bacteria (e.g. sulphate-reducing bacteria). This concentration bacteria changes reduces butyrate levels contributing to down-regulation of tight-junction protein expression on epithelial cells increasing permeability and facilitating translocation bacteria and reducing defensins. Risk Alleles identified on Chron's disease as NOD2 are polymorphisms of epithelial cell being related to lower alfa-defensin (antibacterial produced by Paneth cells) expression and coinciding with severe intestinal inflammation. The same happens with ATG16L1 (autophagy 16 related like 1) which impairs exocytosis of Paneth cell secretory granules. But it is unclear how IBD is developed with genetic defects because in mice studies were insufficient to develop the disease. Maybe controlling external agents IBD be required before they develop it. (9)

Studies carried out on the last decade define dysbiosis on different diseases. Well defined and known by now are: Diabetes, Intestinal Bowel Syndrome, and chronic alcoholic disease.(10)

1.4 DYSBIOSIS: GUT-JOINT AXIS

Dysbiosis is defined by a loss of beneficial bacteria, expansion of pathobionts and loss of diversity. (11) Supporting immune hypothesis:

First, studies on rat models have pointed out to the importance of mucosal barrier dysregulation and the crucial role of enteric bacteria in the onset of chronic inflammation of the colonic mucosa: Transgenic rat model study expressing human leukocyte antigen (HLA)-B27, arthritis and psoriasis develop together with colitis but, in a germ-free environment, rats develop no such colitis or other manifestations, suggesting a role for cross-reaction between colonic antigens and joints and the essential role of bacterial flora and genetics factors in disease induction. (12)

Second, T lymphocytes identical expansions of the colon mucosa and the synovium. And intestinal Tcells of IBD patients have high affinity to endothelial synovial vessels through their endothelial receptors (B7-integrines) and MadCAM-1, VCAM-1 and E-cadherine.

Third, Remission of articular inflammation is associated with intestinal inflammation disappearance. And vice versa, some studies suggest not only a persistence of symptoms but even an exacerbation. (7)

Linking dysbiosis in IBD and AS, *Farrera's Rozman* count a 50% of patients has subclinical gut inflammation with similar Chron's histopathology facts. Recent studies hypothesis talking about subclinical immune alterations are strong related with IBD and suggested that spondyloarthropathy is the model for studying early Crohn's disease. Current rheumatology studies support data. (3)

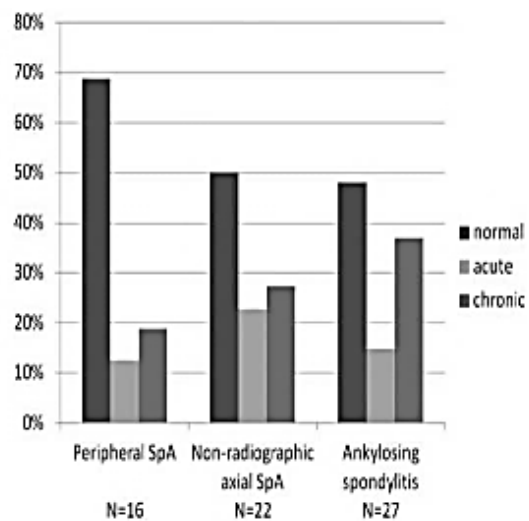


Illustration 2. Prevalence of gut inflammation on Peripheral spondyloarthritis (N=16), Non-radiographic axial SpA (N=22), Ankylosing spondylitis (N=27).

One of the most important facts to consider and support the hypothesis is that biological treatment with infliximab is effective for both intestinal and extraintestinal disease manifestations. (13)

1.5 WHY F.PRA/E.COLI INDEX?. Microbial Index Dependent- Variable.

Microbiota's role in the onset and maintenance of intestinal inflammation in IBD has been a matter studied but in order to link it with spondylitis is difficult to find literature. Based on a study made in Josep Trueta's Hospital, demonstrated a decreased of Firmicutes (*F.prausnitzii*) and increased of proteobacteria with a predominance of *E.coli* in Chron disease patients, specially marked on those with ileal involvement ($p < 0.001$), compared to healthy controls. This index can even differentiate between healthy controls (HC) and Crohn's disease phenotypes (CD). Moreover, they only could explain a depletion on *E. Coli* after anti-TNF α treatment in ileal CD patients concluding anti-TNF α treatment do not restore this index. (14)

Validated this index on IBD patients we want to see how it works on AS patients and if we can find differences as well as they have done. In this way, we introduce what they saw on colonoscopy biopsies but in faeces while we prove the power of this tool.

Good F. Prausnitzii

F. Prausnitzii: "A species of *Faecalibacterium*, previously classified in the *Fusobacterium* genus, that is a major constituent of the gut microbiota in healthy humans. It has anti-inflammatory activity and reduced numbers of this species occur in patients with inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease". (15)

In *Firmicutes* phyla *Faecalibacterium Prausnitzii* is one of the most abundant anaerobic bacteria representing about a 6-8% in healthy gut despite de fact that it can rise to a 20%. (16)

Role of *F. Prausnitzii* on microbiota: *F. Pra* handles a regulatory effects on microbiota by lowering cytokines proinflammatory production and enhances SCFAS (short chain fatty acids) metabolism. Lower SCFAS drops in enterocyte injury. Butyrate (product of SCFAS metabolism with anti-inflammatory effects) decreases and wall permeability increases. This all results in a higher [Tcells] and FoxP3 production.

Decreasing on *F. Prausnitzii* has been demonstrated on colorectal cancer, Ulcerative colitis and Chron disease. And more interesting Phylotypes of the main *F. Prausnitzii* bacteria have been defined and found on this different diseases. (16)

F. prausnitzii counts are expressed as log₁₀ CFU values/g faeces.

Counting gets difficult because *F. Prausnitzii* needs anaerobic environment. So, depending on the extraction stool place there will be different concentrations. *F. Prausnitzii* is better

representative on internal stool place (more anaerobic). To avoid this possible error, we introduce a mixing stool procedure explained on "Material and methods" section.

By a meta-analysis of 11 articles of SMD they found: *F. Prausnitzii* in IBD patients was significantly lower (6.7888 +/- 1.8875) log 10 CFU/g faeces; p < 0.0001.

The SMD of *F. Prausnitzii* in IBD patients was **-0.94** (95% confidence interval [CI]: (-1.07 - -0.80). They demonstrate a trend toward a greater effect for Crohn's disease when compared to UC that's why we prefer to include only CD population instead of UC. (17)

Bad Escherichia Coli

Escherichia coli is a gram-negative bacteria of Enterobacteriaceae family. Facultative anaerobic and most of them are potential pathogens. Increased number of mucosa-associated *E. Coli* are observed in CD and UC.

Adherent-invasive *E. Coli* (AIEC) colonize the intestinal mucosa by adhering to intestinal epithelial cells that is able to invade and replicate intracellularly. AIEC strains have best survival rate and extensively replicate within macrophages creating high blood production of Alpha tumour necrosis factor (TNF-alpha).

AIEC strain LF28 prevalence study showed association with ileal mucosa on CD. (18)

But non-specific diversity profile has been found on this bacteria like mentioned on *F. Prausnitzii* on IBD. (19)

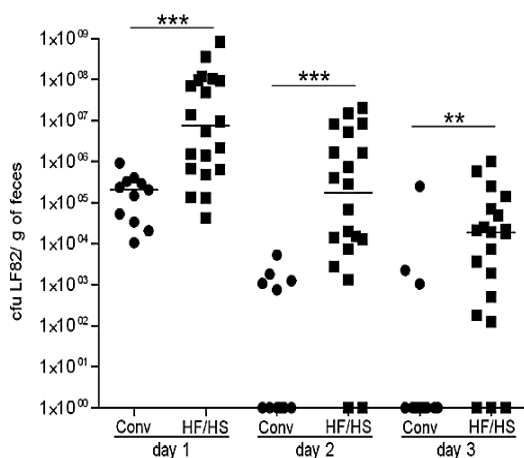


Illustration 4. Diet treatment and days after infection with LF82 shows an increase of Cfu LF82/ g feces.

Table 4 Distribution of virulence features of *E coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls

Item*	Control (15 subjects, 28 tissues)	UC (19 patients, 27 tissues)	CD (13 patients, 29 tissues)
Group			
A	3 (20)†	0	0
B1	0	1 (5.3)	1 (7.7)
B2	3 (20)	9 (47.4)	7 (53.8)
D	1 (6.7)	2 (10.5)	1 (7.7)
B2+D	4 (26.7)	11 (57.9)	8 (61.5)

Illustration 3. Distribution of virulence Features of *E. Coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls.

Factors studied as diet are difficult to gather but American studies reveal that High-fat/high-sugar western diet produce an increasing AIEC colonization demonstrating the susceptibility of this bacteria to this type of diet. (20)

1.6 FACTORS THAT AFFECT MICROBIOTA: Withdrawal criteria.

Based data on a Bmj review, there are two different kind of interactions. Host system regulation such as gastrointestinal motility and extrinsic factors as diet or some drugs that block acid secretion affects indirectly, NSAID, antibiotics and laxants act in a direct way of the microbial composition. In our study we took NSAID as a co-variable because is part of the AS treatment and is related to colitis so changes directly intestinal flora. (21)

About diet influence, there is a study that revealed African children diet (Polysaccharide-rich diet) have an enrichment in Bacteroidetes in comparison with Italian city children (high fat and protein diet). (22) But diet is difficult to collect and has a tendency of changing sufficiently between countries to be important and point them out. Therefore, in this study we assume it as a limitation despite population collected are from Girona.

Use of pre/probiotics have been collected as a withdrawal criteria because they demonstrated to change microbiota quantities through mechanisms of immunomodulation and neuromodulation. Probiotics are microorganisms that benefits gut communities. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are examples of typical probiotics. And Prebiotics are external body components that organism cannot digest but have a physiological effect on microbiota stimulating selected beneficial bacteria (*Lactobacillus* and *bifidobacterium*) most known Inulin and FOS (Fructooligosaccharides). Patients will be asked. (23)

Microbial and own metabolism influence remain already unknown. On mice investigations transplant microbiota of a fat and lean twins to them, having a same low-fat high fiber diet, traduced in an increased adiposity on the one who had obese twin microbiota transplant. (24)

Consequences of microbial immune conditions early in life is recently subject of studies. Weaning off breast milk, mode of delivery at birth, early introduction of solid food in babies, use of antibiotics and genetics have a major impact on composition of bowel microorganisms which affect to create a susceptibility to immune mediated disorders. (25).

Another unremovable fact is that composition changes between ages: Before adulthood decreased *Lactobacillus Spp* and decline of *Bifidobacterium spp*. In old age people *Bacteroides spp* decrease and *Enterococcups spp* and *Escherichia coli* increase. In consequence is interesting to collect ages in co-variables.

1.7 INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. *Chron's Disease* Independent-Variable.

Inflammatory bowel disease includes Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Idiopathic relapsing, these diseases affect lifelong in chronic conditions with Intestinal and extraintestinal manifestations. CD is a transmural chronic inflammation and symptoms involved are: Diarrhoea and/or abdominal pain Prevalence increase in industrial and western countries. Chron disease incidence is 5-10/ 100.000 per year and continuous increasing being less incidence in Africa. Hereditary factors shown to have stronger association specially NOD2/CARD15 gene mutation. Diagnose is made by ileocolonoscopy. There are two peak incidences between ages: 10 and 40. Young males have worse complications and higher extraintestinal manifestations than female.

The etiology of both diseases remain unknow, but several factors are thought to contribute to the pathogenesis as they lead to an aberrant immune response on mucosa barrier (12):

- NSAIDs are known to cause colitis and have been related to IBD and with exacerbation of activity disease(26). The gastrointestinal toxicity and mucosal injury affects directly and is base of spondylitis treatment.
- Stress and smoking are factors that have been attributed to flare-ups, then, should be collected.
- Genetic factors with immune basis: HLA system. HLA-B27 positive are a 50-60% of IBD with SpA.

Classification used of inclusion criteria will be defined on activity: CDAI (*Chron's* activity index) (Annex 1). CDAI is a primary gold standard index not only used to graduate severity but to prove efficacy treatment(27). The scores CDAI <150 remission activity, 150-220 mild activity, 220-450 moderate to severe activity and CDAI >450 severe activity disease. (28)

The biomarkers are the point of improvement in our work: C- Reactive protein (CRP) is sensitive mark of inflammation and is a useful marker for detecting and following-up CD activity. The classical faecal biomarker F-Calprotectin clinically correlate with endoscopic and histological scores of CD activity (ileocolonic or colonic disease) and have demonstrated a better discrimination of degree inflammation on activity, monitoring and response treatment. Both have been selected as a co-variables to study association with Microbial Index. (29) Standard blood analysis should be registered to correlate them with clinical status.

According to Montreal classification location of Crohn's disease should be registered. Terminal-ileum, ileocolonic or colonic CD. Because index changed from one biopsy to another.

Importance of improvement in biomarkers before disease starts locates dysbiosis as a good point of reference knowing that it had being long suspected in the onset and chronicity of Crohn's disease as we commented.

1.8 SPONDYLOARTHRITIS. Ankylosing Spondylitis variable.

Ankylosing spondylitis is an inflammatory arthritis within a family of shared disorders: Peripheral arthritis but with a predominance of axial affection, enthesopathy, uveitis, buccal, genital or intestinal ulcers, genital-urinary inflammation and /or desquamative skin lesions, HLA-b27 + presence, familiar aggregation and absence of Rheumatic Factor and subcutaneous nodules. World prevalence is about 0.1%-1.4%.

Ankylosing Spondylitis results as an inflammation of the axial skeleton typically characterized by inflammatory low back pain and morning stiffness due to sacroiliitis and/or spondylitis, which has a big impact on life's quality. Presents at third decade and it takes time to reach diagnosis and it is based on clinical and radiological features used in inclusion criteria: New York new criteria (Annex 2). A 90% is HLA-B27 positive. Bath ankylosing spondylitis disease activity index (BASDAI) is used in rheumatology as routine but important tool for declaring activity. (Annex 3). And Bath ankylosing spondylitis functional index (BASFI) is useful in the same way to evaluate a correlation on statistical analysis with the microbial index. (Annex 4). Standard blood analysis should be registered to correlate them with clinical status.

IBD is one of the Extra-articular manifestations in AS. It is said that between 5-10% cases are associated with IBD. Illustration 6. (30) (31)

Extra-articular manifestations	Prevalence in % [reference]
Anterior uveitis	20-30 [5]
Inflammatory bowel disease	5-10 [15]
Histological inflammation of the gut	50-60 [14]
Lung abnormalities on high resolution CT	52 [60]
Heart conduction disturbances	3-33 [44]
Aortic insufficiency	6-10 [45]
Psoriasis	10-25 [22]
Renal abnormalities	10-35 [65]
Osteoporosis	11-18 [31]
Vertebral fractures	10-18 [39]

Illustration 5: Prevalence of Extra-intestinal manifestations in AS.

In order to link rheumatic disorders with dysbiosis one study showed etiological bacteria association reflected on Table 1. (32). Antigenic material in the synovial fluid in *Yersinia*-Reactive Arthritis (ReA) demonstrated a first correlation between gut and joint disease. *Klebsiella pneumonia* was expected to be higher in AS but studies have been controversial. (33) Table 1.

Searching for microbiota description of AS similarities found were: depletion of *Clostridials* (Stebbing and Stoll) and increase of *Bacteroides* (Costello and Stoll) are the. These studies are consistent with IBD about low levels of *F. Prausnitzii*. (34) Illustration 6.

Bacteria/Bacterial product	Disease
<i>Bacteroidetes</i> spp	Arthritis
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS and CD
Flagellin	CD
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	Colitis
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Colitis
<i>Mycobacteria</i>	Psoriasis
<i>Prevotella copri</i>	RA
<i>Prevotella</i> spp	RA
<i>Chlamydia tracomatis</i>	ReA
<i>Salmonella</i> Omp	ReA
<i>Shigella</i>	ReA
<i>Yersinia</i>	ReA

Table 1: Etiological rheumatic process associated with specific bacteria.

	Stebbing et al., 2002	Costello et al., 2014	Stoll et al., 2014
Methods			
Subjects	AS (adults)	AS (adults)	ERA (children)
Source of material	Feces	Ileal biopsy	Feces
Bacterial identification	DGGE	NGS	NGS
Family			
<i>Bacteroidaceae</i>	Decreased <i>Bacteroides</i>	Increased	Increased <i>Bacteroides</i> in subset of patients
<i>Bifidobacteriaceae</i>	Increased <i>Bifidobacterium</i>	No difference	Increased <i>Bifidobacterium</i>
<i>Coriobacteriaceae</i>	Increased <i>Atopobium-Eggerthella-Collinsella</i> group	No difference	No difference
<i>Lachnospiraceae</i>	Decreased <i>Clostridium leptum</i> (same order, different family)	Increased	Decreased <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>Porphyromonadaceae</i>	No difference	Increased	No difference
<i>Rikenellaceae</i>	No difference	Decreased	No difference
<i>Ruminococcaceae</i>	No difference	Decreased	No difference
<i>Veillonaceae</i>	No difference	Increased	No difference
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	Not evaluated ^a	Increased	Increased <i>Akkermansia muciniphila</i> in a subset of patients

^a Discovered in 2004.

Illustration 6: Comparison of microbiota findings in studies of SpA patients. Stebbings., Costello and Stoll et al. authors. ERA: Enthesitis-related arthritis, AS: Ankylosing Spondylitis.

Few studies used stool samples to study AS microbiota. One study do not found differences between AS cases and healthy controls using DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis), [IgA] and [IgM] antibodies reactive with *Klebsiella pneumoniae* or *bacteroides* were lower in healthy controls and higher sulphate-reducing bacteria. (35) Despite of these results, another study took terminal ileal biopsies from AS comparing to healthies and found higher abundance of: *Lachnospiraceae*, *ruminococcaceae*, *Rikenellaceae*, *phyromonadaceae* and *Bacteroidaceae*. And a decrease of *Veillonellacene* and *Prevotellaceae*. (36)

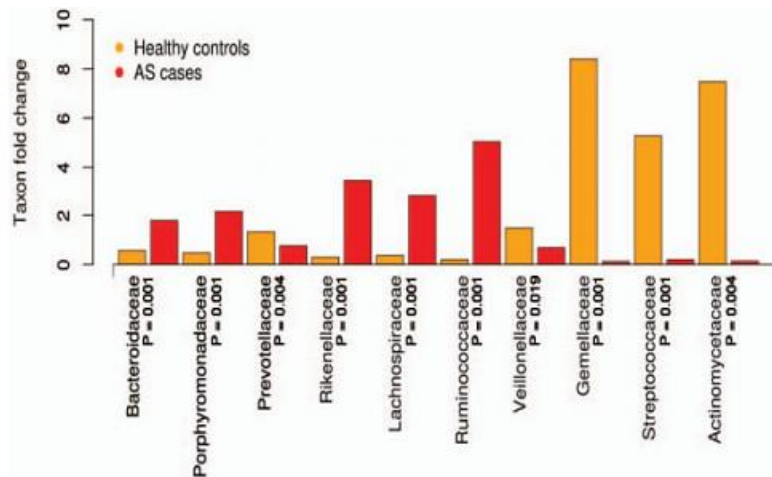


Illustration 7. Description of AS microbiota. Decrease of *Prevotellaceae* and *Veillonellacene* and increase of *Ruminococcaceae*, *Bacteriodaceae*.

Last extended report on rheumatology explains specific dysbiosis characterise both SpA and Rheumatoid Arthritis and evidence as a twofold to threefold increased abundance of *Ruminococcus Gnavus* in SpA patients comparing to RA and healthy controls. *Ruminococcus Gnavus* demonstrate to be useful as a marker of disease activity helping to uphold the link between SpA and IBD. *R. Gnavus* is a Gram positive anaerobic microorganism and comes from the *Lachnospiraceae* family being a frequent gut commensal and has a mucolytic activity on mucin-2 (principal constituent of mucus layer). Moreover, has a glucuronidase activity which generates toxic metabolites in colon rising local inflammation. This observation is consistent with the known proinflammatory role of this bacteria and its association with IBD .(37)

To sum up, AS microbiota has been described and somehow have similarities of dysbiosis with IBD microbiota. What is not known is the role of this two bacteria of microbial index in AS patients.

1.8 MEASURING DYSBIOSIS

Currently is possible to identify bacteria utilizing extraction of DNA from samples, followed by amplification of S16 ribosomal RNA (rRNA) gene regions and analysis using pyrosequencing method.

Ribosomal RNA (rRNA) is the most widely used macromolecule in bacterial phylogenetic and taxonomic studies. The sequencing of the variable regions of the gene encodes for the 16S rRNA and identifies the phylogenetic likeness of the bacteria and the archaea making a classification. The genetic information obtained from the microbiome through the 16S rRNA is grouped into the so-called operational taxonomic units (OTUs), according to the similarity percentage of their 16S rRNA. When there is a 95% similarity in the 16S rRNA, genus is being referred to, and when the similarity is 97%, the reference is to species.

1.9 FROM COLONOSCOPY TO STOOL SAMPLES:

Microbiota collected in stool samples changed for the first moment in a study before and 6 months later after colonoscopy. Colonoscopy's preparation can change bacteria concentration in a closer time sight (1-2 months). That is why we chose it as a withdrawal criteria (38). Disadvantages of colonoscopy are: Probability of perforation, distention gas induced, intestinal pain... Reasons that in addition support our theory to improve another diagnostic method.

Noticing that biopsies from different parts of the colon or small intestine are the gold standard representation of what is happening on the gut, we dare say that the whole microbiota changes from one part to another and having a rheumatic disease does not justified to use it.

2 JUSTIFICATION

The role of microbiota in spondyloarthropathy has been recently studied. Inflammatory bowel disease appears in a 10% of spondylitis, but most of them have subclinical colonic inflammation and there are no tools for early diagnosis or prevention. On the one hand, colonoscopy is an invasive and non-cost-effective method, knowing that the ones who develop IBD are a minority. And, on the other hand, NSAIDs first-treatment could lead to IBD development. Then, we are presented with the following question:

¿How can we foresee IBD in ankylosing people whose intestine we know is suffering?

The aim of this base study is to find biomarkers to help IBD early diagnose and to look for associations. Taking two IBD defined bacteria (*F. Pra* and *E.coli*), that demonstrated to be good biopsy-markers on Crohn's patients, we want to introduce them as a microbial index and see how they behave on stool samples, but this time on Ankylosing Spondylitis patients.

Currently faecal calprotectin is the best biomarker we have on stool sample. But it is not useful for early diagnosis or for prevention. Same biologic treatment for both diseases has demonstrated equal immune basis, but there is no defined management of dysbiosis until intestinal symptoms break out. Ankylosing spondylitis is a chronic disease and we should consider that NSAIDs chronic treatment could be a trigger to develop IBD. The gut is suffering, therefore, in which time would be recommended to stop NSAIDs, biological treatment should be started, or just define dysbiosis management, needs to be clarified.

This study thus could provide substantial new insights into the microbiota of Spondylitis Ankylosant patients developing IBD by a simple transversal descriptive study.

3 HYPOTHESIS

There is a lower and higher significant abundance of *F.Prausnitzii* and *E. Coli* in stool samples of spondiloarthritic patients with and without Inflammatory Bowel Disease.

4 OBJECTIVES

- Principal: To compare the microbial index (concentration of *F.prausnitzii* and *E.coli*) on stool sample in two groups of patients with ankylosing spondylitic; those with and without Crohn's disease.

- Secondary: Compare microbial index with Crohn's disease patients.

5 TYPE OF STUDY

Transversal or descriptive study

6 POPULATION STUDY

1. Chron disease: 20 Anti-TNF naïve patients with a CDAI >200 low-moderate activity
2. Spondylitis without IBD: 20 Anti-TNF naïve patients
3. Spondylitis with IBD: 20 Anti-TNF naïve patients.

Inclusion criteria:

- 18-40 years
- Signed de informed consent
- Ankylosing spondylitis following New York Classification Criteria
- Anti- TNF naïve

Withdrawal criteria:

- Active tuberculosis or another chronic infection (*C. Difficile...*)
- Diabetes mellitus
- Irritable Bowel disease
- Chronic alcoholic disease
- Antibiotics in the last month
- Colectomy
- Colonoscopy in a two months period
- Pre/probiotics

Independent variables:

- Inflammatory bowel disease:
 - CDAI (Crohn's activity index) Score: 0-600. CDAI>200 Moderate to severe
 - CRP (C-reactive protein) serum (mg/L)
 - Faecal calprotectin (ug/g)
 - Standard Analysis: Haemoglobin (g/dl), Haematocrit (%), platelets (x103/ ul), Leucocytes (x103/ ul), Albumin (g/dl), Creatinine levels (mg/dl)

- Spondyloarthritis:

New York modified diagnostic criteria for AS

BASDAI (Bath Ankylosing spondylitis disease activity Index) Score: 1-10 measuring discomfort, pain and fatigue.

Functional Status BASFI score 0-10

HLA B-27 serum sample

CRP (c-reactive protein) serum (mg/L)

Standard Analysis: Haemoglobin (g/dl), Haematocrit (%), platelets (x10³/ul), Leucocytes (x10³/ul), Albumin (g/dl), Creatinine levels (mg/dl)

Dependent variable: Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli*

Co-variables:

- Tobacco. YES/NO / Ex-smoker
- Diet. Probiotics YES/NO
- Gender. Male/Female
- IMC
- CD patients with and without AS:
 - Localization disease: Ileal CD, Ileocolonic CD, colonic CD.
 - Treatment: Corticoesteroids, aminosalicylates (mesalamine, balsalazide, olsalazine), immunosuppressant drugs.
- AS patients with and without IBD:
 - NSAIDs or SMARD – disease anti-rheumatic drug current treatment.

7 MATERIAL AND METHODS

Including 60 patients with CD or Axial Spondyloarthritis with or without IBD (20 patients/group) over 18 years, that have signed the informed consent.

Blood sample for clinical analysis and stool sample will be collected in rheumatology and digestive visits. And when those analysis can be checked then clinical data (CDAI, BASDAI, ASDAS index) and confounding factors can be registered. The closest in time the stool sample, blood analysis, index and demographic data the best coherence and correlation with the main pathology.

Faecal sample:

1. Stool sample will be collected and stored in Hospital Universitari de Girona, Dr Josep Trueta until be processed. These laboratory steps should be afforded:
 - a. 20 milligrams of stool sample and mix it with 600 microliters of lysis buffer to bead tube. (Some microbes have very thick cell walls so efficient lysis of all bacteria on faeces is an important step). A combination of heat chemical and mechanical disruption with specialized beads and lysis-buffers will provide purity to sample.
 - b. Depending of the lysis buffers the isolation of the sample will have a better or worse purity, which it means that a good lyser-buffer provide a better access to DNA.
 - c. Once the sample has been purified, then should be homogenized with centrifugation.
 - d. Removal of contaminants with Nucleospin® inhibitor removal columns.
 - e. Bind DNA to Nucleospin® soil column ready for PCR.




1. Homogenization and lysis		Add sample and lysis buffer to Nucleospin Bead Tube, vortex to use homogenizer.
2. Removal of contaminants		Precipitate contaminants and load supernant to Nucleospin inhibitor removal columns.
3. Bind-Wash- Elute		Bind DNA to NucleoSpin soil column and elute pure DNA ready to use in downstream PCR.

Table 2: Nucleospin® steps for having the best DNA ready to use in downstream PCR. Phases: 1. Homogenization and lysis, 2. Removal of contaminants with inhibitors, 3. Bind, wash and elute.

2. Before microbiological analyses, genomic DNA of 16s RNA gene will be extracted using NucleoSpin® Soil Kit (Machery-Nagel GmbH & Co., Germany).
3. DNA concentration will be determined with Qubit® BR (Invitrogen) Kit.
4. Genomic DNA will be amplified by qPCR system using TaqMan primers (Applied Biosystems). Specific primers for *Escherichia coli*, *Faecalibacterium Prausnitzii* quantification will be used.

Target	Primers and sequence	Sequence 5'-3'
E. coli	<i>E.coli 437 PR</i>	6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-TAMRA
	<i>E.coli 395 F</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA
	<i>E.coli 490 R</i>	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA
F. Pra	<i>F.Pra 493 P</i>	6FAM-CAAGGAAGTGACGGCTAACTACGTGCCAG-TAMRA
	<i>F.Pra 428 F</i>	TGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAA
	<i>F.Pra 583 PR</i>	GCGCTCCCTTTACACCCA

Table 3: Primers and sequence 5'-3' specific for each bacteria for qPCR amplification with TaqMan primers

5. Quantifications of F. Pra and E.coli will be performed in duplicate using Stratagene Mx3005P thermocycler. We will include an internal control of amplification (AIC).
6. Data will be given as log10.

<ul style="list-style-type: none"> - NucleoSpin® soli kit: <ul style="list-style-type: none"> Soil Columns 2 Lysis-buffer Bead Tubes Inhibitor removal columns Collection tubes - Qubit® (Invitrogen) Kit - Stratagen Mx 3005P thermocycler

Table 4: Compilation of material needed.

8 STATISTICS ANALYSIS

1. Sample size: 60 patients have already been selected from rheumatology and digestive service for another study in Josep Trueta's hospital. To calculate statistical power admitting an alpha risk of 5% and maximum indetermination (population is already selected) statistical power is: **81.57%** to find a difference of **25%** in microbial index between groups. To low the difference detected (25%) we should rise risk to 15% but we didn't do it because it will rise type 1 error.
2. Sample- size and clinical characteristics table.
3. Abundance of *F. Pra*/ *E. coli* table.
4. We will use t-student for comparing 2 groups (AS +/- IBD patients) or the non-parametric test Mann-Whitney's test, if the distribution of the microbial index is not symmetric.
5. ANOVA multivariant analysis (AS +/- IBD and CD patients) for parametric variables or the non-parametric Kruskal-Wallis test (as in point 3).
6. Friedman test non-parametric variables to compare bacterial abundance between groups. Statistical significance will be considered when $p < 0.05$.
7. Multilinear regression will be asses to answer co-variables (age, gender, CD localization disease, IgA, calprotectin, IMC, YES/NO smoker...)
8. Spearman correlation between stool sample *F. Prausnitzii* and *E.coli* in Ankylosing Spondylitis with Intestinal Bowel Disease (ASIBD), Ankylosing Spondylitis without Intestinal Bowel Disease (ASNIBD), Chron disease (CD) patients (16 rRNA gene copies/million bacterial 16S rRNA genes copies).
9. Area under curve (AUC) and cut-off values obtained by receiver operating characteristic analysis (ROC curve) to establish the usefulness of *F. Prausnitzii*, *E. coli* and F-E Index to distinguish amongst different pathologies or not (ASIBD, ASNIBD- ileal, ASNIBD-ileocolonic, ASNIBD colonic, CD- ileal, CD- ileocolonic, CD-colonic). Sensitivity and specificity values at a set threshold should be included for comparative purposes.

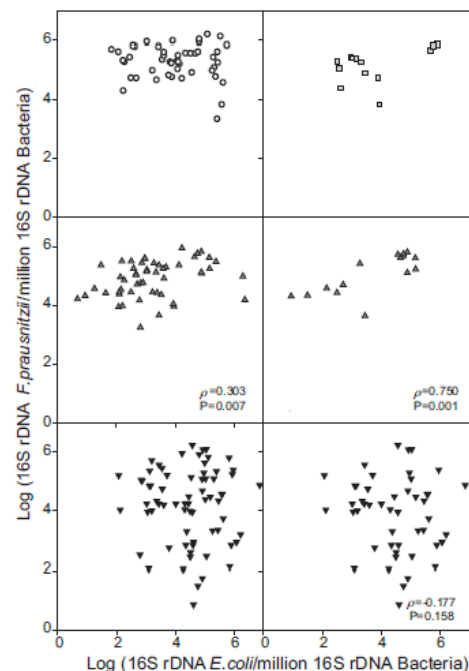


Illustration 8: Example of Spearman correlation of bacteria *F. Pra* and *E.Coli* quantities between 6 different groups.

- **X** Continuous variable: *F. Prausnitzii*/ *E. coli* and **Y** Dicotomic variable: AS- IBD YES/NO

9 FEASIBILITY

9.1 Chronogram

TASKS	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEPT	OCT
Coordination Reunion												
Rh and Dg 1 visit												
Rh and Dg 2 visit												
Blood collect.												
Data collect.												
Results												

9.2 Work planning

0 Phase: Preparation

- Every reunion will take place once every two months: DS (Digestive boss service), RR (Rheumatologist), M (Microbiologist), SM (Statistic manager) must be present. SM can only be at the first and last sessions.

1 Phase: Data collection

- Rheuma and Digestive first visit collection of people with inclusion criteria. All of them should be asked for list of withdrawal criteria. Explaining study, giving the information study paper and collecting IC signed. It is advisable wait for another visit to make sure she/he understands what is signing. Ask for stool and blood sample for the next visit. Plan a next visit and blood analysis.
- Rheuma and Digestive second visit collecting stool samples and blood analysis should be already taken.
- Stool Samples should be sending to microbial analyses through nurse's service.

2 Phase: Final analysis and evaluation

- Data collection includes: Microbial analysis from microbiologist, as explained in material and methods, and blood data collection.
- Statistical analysis results.
- Final report and dissemination on results.

10 BUDGET

MATERIAL	euros
DNA extraction	1.231
PCR reactives and microbiologic determinations	11.100
Fungible and other little laboratory material (Nucleospin soil kit...)	2.000
SERVICES	
Sample transport	600
OTHERS	
Laboratory technician	9.300
CEIC fees	1.000
Overhead IDIBGI (professional services)	7.679
Publication and dissemination	1.500
TOTAL	35.000

11 LIMITATIONS

- This type of study does not permit causality but association.
- Patients included where only Crohn's disease because of the previous results on Index (it is more representative on this population-type).
- NSAIDs chronic treatment could be a trigger of IBD or produce colitis and it would be better to study our dependent-variable in NSAIDs-naïve people but we cannot do that.
- Faecal extraction presents complex sometimes because of the sample collection.
- Population is already selected and statistical power >80% finding a difference of 25% would reduce our finding data on microbial index. We would find more results with a lower difference (15-20%) but statistical power will be reduced.
- Diet influences are not taken in this study because of the difficulty of registration and because we believe that in a province as Girona there will not be high differences.

12 ETHICS

This study has been carried out under the principles of justice, non-maleficence, autonomy and beneficence. As in most observational study ethical conflicts have been avoided.

1. This study should pass CEIC approval.
2. Patients/donor must sign informed consent for this specific investigation.
3. By de organic law 15/1999, of 13th of December, about data of personal character, all information and data collected will be anonymised.
4. Donation is free and this means to renounce to economic values.
5. There will be a guarantee of personal data protection and confidential guarantees.
6. Biological human samples traceability about every step from sample collected to store will be guarantee following "Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación biomédica"
7. Biological samples will be encoded to anonymise data.
8. The CEIC should stablish if there is any invasive procedure included in this study such as analytic extraction.

13 ANEX

Annex 1: CDAI (Crohn's disease Activity Index)

CALCULO DEL CDAI	Días / Semana	Suma	Factor	Subtotal
Número de deposiciones líquidas o blandas			x 2	
Dolor abdominal (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo)			x 5	
Bienestar general (0 = en general bueno; 1 = leve compromiso; 2 = malo; 3 = muy malo; 4 = muy terrible)			x 7	
Contar entre las 6 categorías listadas, las presentes actualmente				
<ul style="list-style-type: none"> • Artritis / Artralgias • Iritis / Uveítis • Eritema nodoso, pioderma gangrenoso, estomatitis aftosa • Fisura, fistula o absceso anal • Otra fistula • Fiebre > de 37,8° C durante la semana previa 			x 20	
Necesidad de lomotil u opiáceos por diarrea (0 = no; 1 = si)			x 30	
Masa abdominal (0 = no; 2 = cuestionable; 5 = definida)			x 10	
Hematocrito (Hto) *Hombres = 47- Hto *Mujeres = 42- Hto			x 6	
Sumar o restar el porcentaje de peso ganado / perdido respectivamente, en relación a peso estándar			x 1	

Annex 2: New York criteria

TABLA VI. Criterios modificados de Nueva York para el diagnóstico de espondilitis anquilosante¹⁴

A. Criterios diagnósticos	B. Grados
1. Criterios clínicos a) Dolor lumbar y rigidez de más de 3 meses que mejora con el ejercicio pero no con el reposo b) Limitación de la movilidad de la región lumbar tanto en el plano frontal como en el sagital c) Limitación de la expansión torácica 2. Criterios radiológicos Sacroileítis grado ≥ 2 bilateral o grados 3-4 unilaterales	1. Espondilitis anquilosante definitiva: cuando los criterios radiológicos se asocian con al menos un criterio clínico 2. Espondilitis anquilosante probable si: a) presencia de 3 criterios clínicos, o b) presencia de criterios radiológicos sin ningún criterio clínico 3. Grados de sacroileítis radiológica Grado 1: cambios sospechosos; grado 2: mínimas anomalías (pequeñas áreas con erosión o esclerosis sin alteración de la articulación); grado 3: anomalías inequívocas (erosiones, evidencia de esclerosis, estenosis o anquilosis parcial); grado 4: grave (anquilosis total)

Annex 4: BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)

Por favor, marque con una X el recuadro que representa su respuesta (ejemplo 10)
Todas las preguntas se refieren a **la última semana**.

1. ¿Cómo describiría el grado global de fatiga / cansancio que ha experimentado?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ausente muy intensa

2. ¿Cómo describiría el grado global de dolor en **cuello, espalda o caderas** debido a su enfermedad?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ausente muy intenso

3. ¿Cómo describiría el grado global de dolor-hinchazón **en otras articulaciones fuera de** cuello, espalda o caderas?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ausente muy intenso

4. ¿Cómo describiría el grado global de malestar que ha tenido en zonas dolorosas al tacto o a la presión?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ausente muy intenso

5. ¿Cómo describiría el grado global de rigidez matutina que ha tenido al despertar?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 ausente muy intensa

6. ¿Cuánto tiempo dura su rigidez matutina tras despertarse?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 0 horas 1 hora 2 horas o más

Annex 5: BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index)

<p>¿Puede ponerse los calcetines (o medias) sin la ayuda de otros medios externos? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<p>Evaluación del doctor</p> <input type="text"/>
<p>¿Puede agacharse a recoger un bolígrafo del suelo sin la ayuda de otros medios? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede alcanzar un objeto elevado sin la ayuda de alguien o de otros medios? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede usted levantarse de una silla sin utilizar las manos o alguna otra ayuda? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede usted darse la vuelta en la cama sin ayuda? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede permanecer de pie durante 10 minutos sin sentir molestias? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede subir 12-15 escalones poniendo sólo un pie en cada uno de ellos sin utilizar el pasamanos o algún otro tipo de apoyo? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede usted mirar por encima de su hombro sin tener que volverse? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede realizar actividades que requieran esfuerzo: ejercicio, deporte, jardinería? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>
<p>¿Puede realizar actividades durante todo el día, en el hogar o en el trabajo? fácilmente 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 imposible</p>	<input type="text"/>

BASFI =

$BASFI = (1+2+3+4+5+6+7+8+9+10) / 10$

Annex 6: Data collection sheet (to refill by the participant and clinical researchers)

PARTICIPANT CODE: _____

- **Age (years):** _____
- **Gender:** Female ____ Male ____
- **Body Mass Index (kg/m²):** _____
- **Pre/Probiotics last 2 months:** ____ YES ____ NO
- **Antibiotics last 2 months:** ____ YES ____ NO
- **Colonoscopy last 2 months:** ____ YES ____ NO
- **Active Tuberculosis or another chronic infection to declare:** ____ YES ____ NO
- **Medical history:**
 - **Personal diseases (Diabetes, alcoholism...):**

 - **Specific gastrointestinal disorders:** _____
- **Current treatments:** _____
- **Smoking:** Non-smoker Smoker (____cig/d) Ex-smoker
- **CD Patients:** ____ Ileal ____ ileocolonic ____ Colonic
- **HLA-B27:** ____POSITIVE ____NEGATIVE

Annex 7: Information sheet for participants

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE (CASTELLANO)

(Noviembre/2017)

TÍTULO DEL ESTUDIO: Comparación de un índice microbiano en pacientes con Espondilitis Anquilosante con y sin enfermedad inflamatoria intestinal.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Xavier Aldeguer

CENTRO: Hospital universitario Josep Trueta

INTRODUCCIÓN: Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Cataluña, de acuerdo a la legislación vigente, y se lleva a cabo con respeto a los principios enunciados en la declaración del Helsinki y a las normas de buena práctica clínica.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno. Si tiene alguna duda diríjase a la Dra. Mijancos

DESCRIPCIÓN GENERAL: El estudio consiste en recoger muestras de heces para establecer un índice microbiológico que en un futuro podría ayudar a la investigación sobre personas con enfermedad reumatológica (espondilitis anquilosante) y/o enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Chron). El objetivo que buscamos es establecer un índice microbiológico y compararlo entre subgrupos de población (60 pacientes en total) con los que usted comparte características, razón por la cual le invitamos a participar. Tenga en cuenta que todos los datos serán codificados lo que comporta que su nombre no será revelado a quien haga uso de sus datos.

En las visitas que se hará en seguimiento por su enfermedad se le pedirá una recogida de muestra de heces y un análisis de sangre de control. Será hoy citado para otro día donde también se le harán preguntas sobre las características de su enfermedad. No hay riesgos derivados del estudio más de los que pudiera conllevar la extracción de sangre.

RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS: La recogida de muestras se realizará en el Hospital universitario Josep Trueta. La primera muestra de heces se hará en consultas externas y se le citará previamente para extracción de sangre para. La realización del análisis de destino de la muestra para investigación tendrá lugar en el departamento de microanálisis.

La muestra será codificada y tratada confidencialmente durante la duración de este estudio, mediante un código que sólo el investigador y personal de su equipo podrá vincular con usted para preservar su identidad.

Al término de la investigación, su muestra podrá ser:

- Destruída.
- Anonimizada (es decir, se destruirá completamente el vínculo que relaciona dicha muestra con usted, con lo que ni el investigador ni ninguna otra persona del equipo será capaz de identificar de nuevo a quién pertenece su muestra).
- Incorporada en una colección cuyo responsable es el investigador (Dr. Aldeguer), para continuar ser utilizada en el estudio de análisis microbiológico de la microbiota.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE: Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis, si bien los responsables del estudio podrán seguir utilizando la información recogida sobre usted hasta ese momento, a no ser que usted se oponga expresamente.

También debe saber que usted puede ser retirado del estudio en caso de que los responsables del estudio lo consideren oportuno o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Si usted es retirado del estudio, por alguno de los motivos expresados, su médico le prescribirá un tratamiento adecuado a su enfermedad.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO: Es posible que no obtenga ningún tipo de beneficio en este estudio pero estará contribuyendo a la mejora del conocimiento sobre su enfermedad y por tanto al desarrollo e investigación médica.

CONFIDENCIALIDAD: El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre*, de protección de datos de carácter personal, y en su reglamento de desarrollo. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico especialista que le presentó esta hoja.

Sus datos serán tratados informáticamente y se incorporarán a un fichero automatizado de datos de carácter personal cuyo responsable es el Doctor Xavier Aldeguer, que ha sido registrado en la Agencia Española de Protección de Datos.

Para garantizar la confidencialidad de la información obtenida sus datos serán **codificados**:

Sus datos y muestra estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio y colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo en caso de urgencia médica, requerimiento de la administración sanitaria o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países, previa notificación a la Agencia Española de Protección de Datos, los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité de Ética de la Investigación de las Illes Balears y personal autorizado, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA: Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin dar ningún tipo de explicación, así como solicitar la destrucción de la muestra, sin que por ello se altere la relación con su médico o el tratamiento que debe Ud. recibir.

Si usted decide revocar su consentimiento, no se recogerán nuevos datos, ni se realizarán nuevos análisis de la muestra, pero esta revocación no afectará a las investigaciones realizadas hasta el momento.

AGRADECIMIENTO: Sea cual sea su decisión, tanto el promotor como el equipo investigador quieren agradecer su tiempo y atención. Usted está contribuyendo al mejor conocimiento y cuidado de su enfermedad lo que en el futuro puede beneficiar a multitud de personas.

Por favor, firme en el recuadro en acuerdo a su participación:

Sr/Sra: _____ de _____ de _____
--

FULL D'INFORMACIÓ AL PACIENT (CATALÀ)

(Novembre / 2017)

TÍTOL DE L'ESTUDI: Comparació d'un índex microbià en pacients amb Espondilitis Anquilosante amb i sense malaltia inflamatòria intestinal.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Xavier Aldeguer

CENTRE: Hospital universitari Josep Trueta

INTRODUCCIÓ: Ens dirigim a vostè per informar sobre un estudi en el qual se li convida a participar-hi. L'estudi ha estat aprovat pel Comitè d'Ètica de la Recerca de Catalunya, d'acord amb la legislació vigent, i es porta a terme amb respecte als principis enunciats en la declaració de l'Hèlsinki i a les normes de bona pràctica clínica.

La nostra intenció és tan sols que vostè rebí la informació correcta i suficient perquè pugui avaluar i jutjar si vol o no participar en aquest estudi. Per a això llegeixi aquest full informatiu amb atenció i nosaltres li aclarim els dubtes que li puguin sorgir després de l'explicació. A més, pot consultar amb les persones que consideri oportú. Si té algun dubte adreceu-vos a la Dr. Aldeguer.

DESCRIPCIÓ GENERAL: L'estudi consisteix a recollir mostres de femta per establir un índex microbiològic que en un futur podria ajudar a la investigació sobre persones amb malaltia reumatològica (espondilitis anquilosant) i / o malaltia inflamatòria intestinal (malaltia de Chron). L'objectiu que busquem és establir un índex microbiològic i comparar-lo entre subgrups de població (60 pacients en total) amb els que vostè comparteix característiques, raó per la qual us convidem a participar. Recordeu que totes les dades seran codificades el que comporta que el seu nom no serà revelat a qui faci ús de les seves dades.

En les visites que es farà en seguiment per la seva malaltia es la demanarà una recollida de mostra de femta i una anàlisi de sang de control. Serà avui citat per a un altre dia on també se li faran preguntes sobre les característiques de la seva malaltia. No hi ha riscos derivats de l'estudi més dels que poguéu comportar l'extracció de sang.

RECOLLIDA DE MOSTRES BIOLÒGIQUES: La recollida de mostres es realitzarà a l'Hospital universitari Josep Trueta. La primera mostra de femta es farà en consultes externes i se li citarà prèviament per extracció de sang per a. La realització de l'anàlisi de destinació de la mostra per a investigació tindrà lloc al departament de microanàlisi.

La mostra serà codificada i tractada confidencialment durant la durada d'aquest estudi, mitjançant un codi que només l'investigador i personal del seu equip podrà vincular amb vostè per preservar la seva identitat.

Al final de la investigació, la seva mostra podrà ser:

- Destruïda.
- Anonimitzada (és a dir, es destruirà completament el vincle que relaciona aquesta mostra amb vostè, amb la qual cosa ni l'investigador ni cap altra persona de l'equip serà capaç d'identificar de nou a qui pertany la seva mostra).
- Incorporada en una col·lecció de responsabilitat de l'investigador (Dr. Aldeguer), per continuar ser utilitzada en l'estudi d'anàlisi microbiològic de la microbiota.

ALTRA INFORMACIÓ RELLEVANT: Si vostè decideix retirar el consentiment per participar en aquest estudi, cap dada nova serà afegit a la base de dades i, pot exigir la destrucció de totes les mostres identificables prèviament retingudes per evitar la realització de noves anàlisis, si bé els responsables de l'estudi podran seguir utilitzant la informació recollida sobre vostè fins a aquest moment, tret que vostè s'oposi expressament.

També ha de saber que vostè pot ser retirat de l'estudi en cas que els responsables de l'estudi ho considerin oportú o perquè consideren que no està complint amb els procediments establerts. En qualsevol dels casos, vostè rebrà una explicació adequada del motiu que ha ocasionat la seva retirada de l'estudi.

Si vostè és retirat de l'estudi, per algun dels motius expressats, el seu metge li prescriurà un tractament adequat a la seva malaltia.

En signar el full de consentiment adjunta, es compromet a complir amb els procediments de l'estudi que se li han exposat.

BENEFICIS I RISCOS DERIVATS DE LA SEVA PARTICIPACIÓ EN L'ESTUDI: És possible que no obtingui cap tipus de benefici en aquest estudi però estarà contribuint a la millora del coneixement sobre la seva malaltia i per tant al desenvolupament i investigació mèdica.

CONFIDENCIALITAT: El tractament, la comunicació i la cessió de les dades de caràcter personal de tots els subjectes participants s'ajustarà al que disposa la *Llei Orgànica 15/1999, de 13 de desembre*, de protecció de dades de caràcter personal i, si reglament de desenvolupament. D'acord al que estableix la legislació esmentada, vostè pot exercir els drets d'accés, modificació, oposició i cancel·lació de dades, per a això haurà de dirigir al seu metge especialista que li va presentar aquest full.

Les seves dades seran tractades informàticament i s'incorporaran a un fitxer automatitzat de dades de caràcter personal el responsable del qual és el Doctor Xavier Aldeguer, que ha estat registrat a l'Agència Espanyola de Protecció de Dades.

Per garantir la confidencialitat de la informació obtinguda seves dades seran **codificades**: Les seves dades i mostra estaran identificats mitjançant un codi i només seu metge de l'estudi i col·laboradors podran relacionar aquestes dades amb vostè i amb la seva història clínica. Per tant, la seva identitat no serà revelada a cap persona excepte en cas d'urgència mèdica, requeriment de l'administració sanitària o requeriment legal.

Només es transmetran a tercers i a altres països, prèvia notificació a l'Agència Espanyola de Protecció de Dades, les dades recollides per l'estudi que en cap cas han de contenir informació que li pugui identificar directament, com nom i cognoms, inicials, adreça, número de la seguretat social, etc. En el cas que es produeixi aquesta cessió, serà per als mateixos fins de l'estudi descrit i garantint la confidencialitat com a mínim amb el nivell de protecció de la legislació vigent al nostre país.

L'accés a la seva informació personal quedarà restringit al metge de l'estudi / col·laboradors, autoritats sanitàries, al Comitè d'Ètica de la Investigació de les Illes Balears i personal autoritzat, quan ho necessitin per comprovar les dades i procediments de l'estudi, però sempre mantenint la confidencialitat dels mateixos d'acord amb la legislació vigent.

PARTICIPACIÓ VOLUNTÀRIA: Ha de saber que la seva participació en aquest estudi és voluntària i que pot decidir no participar o canviar la seva decisió i retirar el consentiment en qualsevol moment, sense donar cap tipus d'explicació, així com sol·licitar la destrucció de la mostra, sense que per això s'alteri la relació amb el seu metge o el tractament que ha de rebre.

Si vostè decideix revocar el seu consentiment, no es recolliran noves dades, ni es realitzaran noves anàlisis de la mostra, però aquesta revocació no afectarà les investigacions realitzades fins al moment.

AGRAÏMENT: Sigui quina sigui la seva decisió, tant el promotor com l'equip investigador volen agrair el seu temps i atenció. Vostè està contribuint al millor coneixement i cura de la seva malaltia el que en el futur pot beneficiar multitud de persones.

Si us plau, ferm en el requadre en acord a la seva participació:

<p>Sr/Sra:</p> <p>_____ de _____ de _____</p>

Annex 8: Information consent

CONSENTIMENT INFORMAT

Declaració del participant:

Jo, _____

- He llegit la fulla informativa sobre l'estudi que se m'ha entregat.
 - He pogut fer totes les preguntes necessàries respecte l'estudi.
 - He rebut suficient informació sobre l'estudi.
 - He estat informat per l'investigador.....de les implicacions i finalitats de l'estudi.
 - Entenc que la meva participació és voluntària.
 - Entenc que les mostres obtingudes seran etiquetades amb un codi per tal de mantenir la confidencialitat de les meves dades.
 - Entenc que d'acord amb la Llei de Biomedicina 14/2007 d'Investigació Biomèdica la mostra sobrant de l'estudi serà utilitzada per futurs projectes relacionats amb aquest projecte, o amb la malaltia, o bé destruïda, segons la meva voluntat.
 - Entenc que puc revocar el meu consentiment de participació a l'estudi, sense haver de donar justificacions i sense afectar la meva assistència sanitària.
- ❖ Accepto que els investigadors principals del projecte puguin contactar amb vostè si en un futur es considera oportú? Sí No
- ❖ Lliurement, dono la meva conformitat per participar en l'estudi amb mostres de femta? Sí No
- ❖ Autoritzo, que en cas de sobrant de les meves mostres, aquestes siguin utilitzades en investigacions futures relacionades amb l'estudi? Sí No
- ❖ Autoritzo, que en cas de sobrant de les meves mostres, siguin introduïdes al Biobanc de l'hospital? Sí No

Firma del participant

Firma de l'investigador

Data: __ / __ / __

Data: __ / __ / __

Annex 9: Biobank information sheet



FULL D'INFORMACIÓ AL PACIENT

OBTENCIÓ I UTILITZACIÓ DE MOSTRES BIOLÒGIQUES I DADES CLÍNiques PER INVESTIGACIÓ MÈDICA I CONSERVACIÓ EN UN BIOBANC

A l'Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta (HUGJT) i/o altres Centres Hospitalaris adscrits, igual que en la majoria d'hospitals, a més de l'assistència als pacients, es realitza investigació biomèdica. La finalitat d'aquesta investigació és progressar en el coneixement de les malalties i en la seva prevenció, diagnòstic i tractament. Aquesta investigació biomèdica requereix recollir dades clíniques i mostres biològiques de pacients i donants sans per a analitzar-los i obtenir conclusions amb l'objectiu de conèixer millor les malalties i avançar cap al seu diagnòstic i/o tractament. Les mostres i dades clíniques obtingudes per al diagnòstic o control de les malalties, una vegada utilitzades amb aquesta finalitat, resulten també útils i necessàries per a la investigació. De fet, molts dels avenços científics obtinguts en aquests últims anys en medicina són fruit d'aquest tipus d'estudis.

Sol·licitem la seva autorització per a l'obtenció d'una mostra biològica addicional que se li extraurà a l'HUGJT i/o altres Centres Hospitalaris adscrits, amb la finalitat de dipositar-la al Biobanc IDIBGI, així com la seva autorització per utilitzar la informació clínica associada a aquest material biològic per prosseguir amb la investigació biomèdica.

Seguint el que estableix la Llei 14/2007, d'Investigació Biomèdica, la Llei Orgànica 15/1999, de Protecció de Dades Personals, i les seves normes de desenvolupament, li sol·licitem que llegeixi detingudament aquest document d'informació i el consentiment informat que se li adjunta al final per a la seva firma, si està d'acord en participar en aquesta proposta.

FINALITAT DE LA INVESTIGACIÓ: Progressar en el coneixement de les malalties.

La finalitat de la investigació és millorar el nostre coneixement de les malalties. Les mostres, les dades clíniques i analítiques i les proves d'imatge s'utilitzaran per a la recerca biomèdica.

MOSTRES BIOLÒGIQUES I INFORMACIÓ ASSOCIADA: Les mostres obtingudes es custodiaran i conservaran en el Biobanc IDIBGI fins la seva extinció.

Es guardarà i disposarà de la mostra biològica addicional de FEMTA per a realitzar estudis d'investigació biomèdica, sense que aquest fet li causi molèsties addicionals. La donació d'aquestes mostres cedides al Biobanc IDIBGI no impedirà que vostè o la seva família puguin usar-les, quan sigui necessari per motius de salut. Les mostres i la informació associada a aquestes es custodiaran i conservaran al Biobanc (banc de mostres biològiques) IDIBGI, fins a la seva extinció.

Aquest Biobanc és un establiment sense ànim de lucre i inscrit en el *Registro Nacional de Biobancos* dependent de l'*Instituto de Salud Carlos III* amb la referència B.0000872, que acull col·leccions organitzades de mostres biològiques i informació associada en les condicions i garanties de seguretat que exigeix la legislació anteriorment referida i els codis de conducta aprovats per els Comitès d'Ètica. Les esmentades mostres i la seva informació associada queden disponibles per aquells investigadors que ho sol·licitin al Biobanc.

Qualsevol estudi d'investigació per al qual se sol·liciti la utilització d'aquestes dades o mostres haurà de disposar sempre de l'aprovació del Comitè d'Ètica de la Investigació Clínica (CEIC) competent, que vetllarà per a què els investigadors desenvolupin els seus estudis seguint sempre les més estrictes normes ètiques i legals. A més, el comitè científic del Biobanc garantirà que els projectes siguin d'excel·lència científica. La investigació biomèdica és actualment un fenomen global, de manera que ocasionalment aquestes mostres podran ser cedides a grups d'investigació fora d'Espanya, sempre que compleixin els requisits de la legislació espanyola i ho aprovin els corresponents comitès.

A partir de les mostres donades, en els casos en que la investigació ho requereixi, es realitzaran estudis genètics, i a partir d'ells es pot obtenir informació sobre la seva salut i la dels seus familiars. Sempre s'actuarà vetllant per la protecció d'aquesta informació (apartat protecció de dades).

En el cas de ser necessària alguna mostra addicional, la institució sanitària es podria posar en contacte amb vostè per a sol·licitar-li novament la seva col·laboració. En aquest cas se li informará dels motius i se li sol·licitarà de nou el seu consentiment.

PROTECCIÓ DE DADES I CONFIDENCIALITAT: Les mostres es conservaran codificades.

Les dades personals que es recullin seran obtingudes, tractades i emmagatzemades complint en tot moment el deure del secret, d'acord amb la legislació vigent en matèria de protecció de dades de caràcter personal.

La identificació de les mostres biològiques del Biobanc serà sotmesa a un procés de codificació. A cada mostra se li assigna un codi d'identificació, que serà l'utilitzat per els investigadors. Només el personal autoritzat per el Biobanc podrà relacionar la seva identitat amb els citats codis. Mitjançant aquest procés els investigadors que sol·licitin mostres al Biobanc no podran conèixer cap dada que reveli la seva identitat. De la mateixa manera, encara que els resultats obtinguts de la investigació realitzada amb les seves mostres es publiquin en revistes científiques, la seva identitat no serà facilitada. En aquells estudis en els quals no es prevegin resultats potencialment útils per a la seva salut, i d'acord amb el corresponent Comitè d'Ètica, les mostres i dades podran ser anonimitzades, és a dir, no hi haurà cap possibilitat de tornar a associar la mostra amb la seva identitat.

Les seves mostres i dades clíniques associades a les mateixes passaran a formar part del fitxer del Biobanc, inscrit en l'Agència de Protecció de Dades sota la responsabilitat de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI).

Vostè podrà exercir els seus drets d'accés, rectificació, cancel·lació i objecció, així com obtenir informació sobre l'ús de les seves mostres i dades associades, dirigint-se a:

DIRECCIÓ DEL BIOBANC IDIBGI	Avinguda de França s/n
Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta	17007 Girona
Biobanc@IDIBGI.org	Tlfn. 972 940 282

CARÀCTER ALTRUISTA DE LA DONACIÓ: La cessió de mostres biològiques que vostè realitza al Biobanc IDIBGI és gratuïta:

La donació té per disposició legal caràcter altruista, per la qual cosa vostè no obtindrà ni ara ni en el futur cap benefici econòmic de la mateixa, ni tindrà drets sobre possibles beneficis comercials dels descobriments que es puguin aconseguir com a resultats de la investigació biomèdica.

PARTICIPACIÓ VOLUNTÀRIA: La seva negativa NO repercutirà en la seva assistència mèdica, present o futura:

La seva participació és totalment voluntària. Si firma el consentiment informat, confirmarà que desitja participar. Pot negar-se a participar o retirar el seu consentiment en qualsevol moment posterior a la firma sense haver d'explicar els motius i que això repercuteixi en la seva assistència mèdica, present o futura.

COST I RISCOS ASSOCIATS: La seva donació no li suposa CAP cost.

L'extracció de la mostra no suposarà cap cost econòmic per a vostè. En el cas d'una extracció de sang, el risc per a la seva salut és molt petit, però pot incloure les molèsties habituals d'una extracció de sang: dolor de molt poca importància, pell contusionada, sagnat per on entra l'agulla o l'ansietat davant les agulles. Es prendran precaucions per a evitar aquests inconvenients. En el cas d'una mostra de **femta**, l'extracció es realitzarà en el context assistencial, de manera que no afegeix cap risc addicional per a vostè. Mai es realitzarà una intervenció exclusivament per a l'obtenció de mostres per a investigació.

REVOCACIÓ DEL CONSENTIMENT: Si vostè decideix firmar aquest consentiment podrà també cancel·lar-lo lliurement. Això comportarà la destrucció de les seves mostres.

Si en un futur vostè volgués anul·lar el seu consentiment, les seves mostres biològiques serien destruïdes i les dades associades a les mateixes serien retirades del Biobanc. També podria sol·licitar l'anonimització de les mostres, de manera que en aquest cas s'eliminarà la relació entre les seves dades personals (que revelen la seva identitat) i les seves mostres biològiques i dades clíniques associades. Els efectes d'aquesta cancel·lació o anonimització no es podrien estendre a la investigació que ja s'hagi realitzat. Si desitgés cancel·lar el consentiment, ho hauria de sol·licitar per escrit a la Direcció del Biobanc IDIBGI, a l'adreça anteriorment mencionada.

INFORMACIÓ SOBRE ELS RESULTATS DE LA INVESTIGACIÓ: Se li proporcionarà informació si vostè la desitja rebre.

En el cas que vostè ho demani expressament, el Biobanc podrà proporcionar informació sobre quines són les investigacions en què s'han utilitzat les seves mostres i dels resultats globals d'aquestes investigacions, excepte en el cas de cancel·lació o anonimització. Els mètodes utilitzats en investigació biomèdica solen ser diferents dels aprovats per a la pràctica clínica, per el que no han de ser considerats amb valor clínic per a vostè. Malgrat això, en el cas que aquestes investigacions proporcionin dades que poguessin ser clínica o genèticament rellevants per a vostè i interessar a la seva salut o a la seva família, li seran comunicats si així ho estima oportú. Així mateix, podria donar-se el cas que s'obtingui informació rellevant per a la seva família. En aquest supòsit, li correspondrà a vostè decidir si vol o no que aquesta informació li sigui comunicada. En cas afirmatiu, ha de consignar-ho a la casella que apareix al final d'aquest document. Si vostè no desitja aquesta informació, tingui en compte que la llei estableix que, quan la informació obtinguda sigui necessària per a evitar un greu perjudici per a la salut dels seus familiars biològics, un Comitè d'experts estudiarà el cas i haurà de decidir si és convenient informar als afectats o als seus representants legals.

Si us plau, pregunti al personal sanitari que li ha comunicat aquesta informació sobre qualsevol dubte que pugui tenir, ara o en el futur, en relació a aquest consentiment. Així mateix, pot comentar els seus dubtes al seu metge, que el posarà en contacte amb el personal sanitari autoritzat.

Moltes gràcies per la seva col·laboració.

BIOBANC IDIBGI

CONSENTIMENT INFORMAT

OBTENCIÓ I UTILITZACIÓ DE MOSTRES BIOLÒGIQUES I DADES CLÍNiques PER INVESTIGACIÓ MÈDICA I CONSERVACIÓ EN UN BIOBANC

Si ha comprès la informació que se li ha proporcionat en el document informatiu, resolt qualsevol dubte que pogués tenir i decideix col·laborar amb el Biobanc IDIBGI en els termes abans explicats, si us plau, llegeixi i firmi a continuació aquest full:

Qui signa el present document autoritza a l'HUGJT i/o altres Centres Hospitalaris adscrits a obtenir la mostra biològica addicional de FEMTA per tal que puguin ser incorporada al Biobanc IDIBGI, el qual podrà emmagatzemar i utilitzar científicament tant la informació clínica i assistencial del seu historial mèdic com les proves d'imatge i les mostres biològiques obtingudes, amb la finalitat de desenvolupar projectes d'investigació biomèdica, sempre que aquests comptin amb l'obligada aprovació del Comitè d'Ètica d'Investigació competent.

Confirmo que:

1. Autoritzo que la mostra biològica cedida i la informació clínica associada s'utilitzi en investigacions:

Nacionals: SÍ NO Internacionals: SÍ NO

2. Desitjo que se'm comuniqui la informació derivada de la investigació que realment sigui rellevant i aplicable per a la meua salut o la de la meua família:

SÍ

NO Telèfon o email de contacte.....

3. Autoritzo a ser contactat en el cas de necessitar més informació o mostres biològiques addicionals:

SÍ NO

Telèfon o email de contacte.....

4. He expressat el meu desig de que se'm respectin les següents excepcions respecte a l'objectiu i mètodes de les investigacions:

.....

DONANT	PERSONA QUE INFORMA	<input type="checkbox"/> TESTIMONI ⁽¹⁾ / <input type="checkbox"/> TUTOR ⁽²⁾
<i>Nom</i> <i>Cognoms</i> <i>DNI</i> <i>Edat</i> <i>Signatura</i>	<i>Nom</i> <i>Cognoms</i> <i>DNI</i> <i>Signatura</i>	<i>Nom</i> <i>Cognoms</i> <i>DNI</i> <i>Relació amb el donant:</i> <i>Signatura</i>

⁽¹⁾ Autoritzat pel
donant ⁽²⁾ Representant
legal

A, ade.....de.....

Arribada la majoria d'edat, el donant té dret a l'anul·lació del consentiment. En cas que no l'exerceixi, es considerarà que l'actual document de consentiment continua vigent.

14 BIBLIOGRAPHY

1. Harmsen S, Zinsmeister AR, Ph D, Matteson EL. Incidence of Spodyloarthropathy in patients with ulcerative colitis. Population-based study. 2014;40(7):1–12.
2. Wendling D. The gut in spondyloarthritis. *Jt Bone Spine*. 2016;83(4):401–5.
3. Van Praet L, Van den Bosch FE, Jacques P, Carron P, Jans L, Colman R, et al. Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2013;72(3):414–7. Available from: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2012-202135>
4. Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, Reveille JD. Epidemiology of Spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(3):441–76.
5. Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(1):128–39.
6. Costello ME, Robinson PC, Benham H, Brown MA. The intestinal microbiome in human disease and how it relates to arthritis and spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2015;29(2):202–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2015.08.001>
7. Estévez EC. El intestino en la patogenia de las espondiloartritis. *Reumatol Clin Supl*. 2007;3(SUPPL. 2):29–32.
8. Hooper L V., Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Oct 21];10(3):159–69. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2710>
9. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol*. 2011;17(5):557–66.
10. Icaza-Chávez ME. Gut microbiota in health and disease. *Rev Gastroenterol México* (English Ed [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2017 Nov 7];78(4):240–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255534X14000103>
11. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 Nov 1];16(7):1024–33. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798552>

12. G.G. Delaini Editor. Inflammatory Bowel Disease and Familial Adenomatous Polyposis. 2006. 62-63 p.
13. Peluso R, Manguso F, Vitiello M, Iervolino S, Di Minno MND. Management of arthropathy in inflammatory bowel diseases. *Ther Adv Chronic Dis* [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Nov 1];6(2):65–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25729557>
14. Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, et al. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2014;304(3–4):464–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.009>
15. *Faecalibacterium prausnitzii* - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2017 Oct 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=faecalibacterium+prausnitzii>
16. Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Abellà C, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, et al. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(21):7582–92.
17. Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease : A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. 2014;2014.
18. Bringer MA, Glasser AL, Tung CH, Méresse S, Darfeuille-Michaud A. The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2006;8(3):471–84.
19. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. 2007;56(5):669–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1942160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, et al. Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function

- favouring AIEC colonisation. *Gut* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2017 Nov 7];63(1):116–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598352>
21. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: A review. *Altern Med Rev*. 2004;9(2):180–97.
 22. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Aug 17 [cited 2017 Nov 7];107(33):14691–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679230>
 23. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Nov 7];6(1):39–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320049>
 24. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science (80-)* [Internet]. 2013 Sep 6 [cited 2017 Nov 7];341(6150):1241214–1241214. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009397>
 25. Geuking MB, Köller Y, Rupp S, McCoy KD. The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes*. 2014;5(3).
 26. Kvasnovsky CL, Aujla U, Bjarnason I. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and exacerbations of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Mar 4 [cited 2017 Nov 7];50(3):255–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25314574>
 27. Summers RW et al NCCDS. Results of drug treatment. *Gastroenterology*. 847-869 p.
 28. Herfarth H, Cohen RD. A Reassessment of the CDAI as an Index of Crohn’s Disease. *AGA Perspect*. 2013;9(2):1–20.
 29. D’Inca R, Caccaro R. Measuring disease activity in Crohn’s disease: what is currently available to the clinician. *Clin Exp Gastroenterol* [Internet]. 2014 [cited 2017 Nov 2];7:151–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876789>
 30. Baeten D, Keyser F De, Mielants H, Veys EM. Ankylosing spondylitis and bowel disease. 2002;16(4):537–49.

31. Maghraoui A El. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: Prevalence, characteristics and therapeutic implications. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2011 [cited 2017 Nov 7]; Available from: <http://www.rhumato.info/docs/ASextra.pdf>
32. Gill T, Translational P, Diseases S, Asquith M, Diseases R, Health O, et al. HHS Public Access. 2016;27(4):319–25.
33. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, De Vos M. Course of gut inflammation in spondylarthropathies and therapeutic consequences. *Baillieres Clin Rheumatol* [Internet]. 1996 Feb [cited 2017 Oct 29];10(1):147–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950357996800100>
34. Stoll ML. Gut microbes, immunity, and spondyloarthritis. *Clin Immunol* [Internet]. 2014;159(2):134–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.05.001>
35. Stebbings S, Munro K, Simon MA, Tannock G, Highton J, Harmsen H, et al. Comparison of the faecal microflora of patients with ankylosing spondylitis and controls using molecular methods of analysis. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2002;41(12):1395–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12468819>
36. Costello ME, Ciccia F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, et al. Brief Report: Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):686–91.
37. Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2017;annrheumdis-2016-211064. Available from: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2016-211064>
38. O'Brien CL, Allison GE, Grimpen F, Pavli P. Impact of colonoscopy bowel preparation on intestinal microbiota. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2017 Oct 23];8(5):e62815. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650530>

*A Xavier Castells por su paciencia,
tiempo, dedicación y pasión no
renumerados.*

*A Xavier Aldeguer por dejarme
formar parte de su equipo y su
ejemplo de una fascinante carrera
profesional.*

*A Virgina Piñol por su enseñanza y
compañía en mis prácticas.*

*A Caroline Ruelle porque sin su
vista de reumatóloga clínica este
trabajo no tendría sentido*