



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSIO VILLEGAS

ESPECIALIDAD EN NEUMOLOGÍA ADULTOS.

**Microbioma respiratorio en pacientes con influenza H1N1, caracterización molecular
y desenlace clínico.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO ESPECIALISTA EN
NEUMOLOGÍA

PRESENTA:

Dr. ANGEL EMMANUEL VEGA SÁNCHEZ

TUTOR DE TESIS.

Dr. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ-PÉREZ

Ciudad de México, Octubre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SECRETARÍA DE SALUD

DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

ISMAEL COSÍO VILLEGAS

NEUMOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA / DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Dr. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA.

DIRECTOR DE ENSEÑANZA.

PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD DE NEUMOLOGÍA.

Dra. MARGARITA FERNANDEZ VEGA

SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA

Dra. MARIA DEL CARMEN CANO SALAS

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO

DR. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ.

ASESOR Y TUTOR DE TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN

NEUMOLOGÍA

INVESTIGADOR DEPARTAMENTO EN INVESTIGACIÓN EN TABAQUISMO Y ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

Agradecimiento

Al final de un camino de 7 años en mi formación como médico especialista, sinceramente tengo muchos puntos y personas a quien agradecer, por lo que las mencionare de manera separada.

Indudablemente y de inicio a mis padres, Angel Gerardo Vega Laguna y Ma Soledad Sánchez Trejo, que me han apoyado durante toda la vida con todo lo que ha estado a su alcance de manera emocional, social, económica y siempre me han apoyado en todo momento y en cada meta que he emprendido sin importar lo difícil, extraña o poco probable que esta siempre haya sido.

A mis maestros durante la formación en medicina interna, que durante 4 años del camino, nos motivaron a siempre seguir adelante. Y entre ellos con gran gusto le extiendo un agradecimiento al Dr. Arturo Cortes Téllez quien desde los primeros años de la especialidad siempre se esforzaba por enseñarnos el gusto por la neumología y la fisiología pulmonar, y que además tuvo gran participación para que ingresara a este instituto nacional para formarme como neumólogo.

Así mismo debo agradecer a aquellas personas que fueron un gran pilar en este camino. En primer lugar a la Señora Martha Genoveva Martín Narváez quien sin su invaluable apoyo no habría podido iniciar este camino y al Dr. Enrique Monarez Zepeda quien también ha sido un gran amigo y aliado.

Así como ha muchos otros médicos, compañeros, amigos y toda la familia que he formado en estos 7 años de formación como especialista. Y en un punto aparte a Norma Téllez con quien siempre hemos compartido ideas, momentos y apoyo.

Finalmente a la paciente de mi tutor de tesis, por la dedicación y paciente para la realización de este trabajo.

Contenido

Agradecimiento	3
Resumen	6
Planteamiento del problema	7
Justificación.....	10
Pregunta de investigación.....	12
Hipotesis.....	12
Hipótesis Alternativa.....	12
Hipotesis nula.....	12
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Material y métodos.....	14
Población de estudio	14
Toma de muestras.	15
Procesamiento de las muestras.....	15
Análisis de la diversidad del microbioma.	16
Análisis de Beta diversidad y comparación de distancia.	17
Análisis estadístico.....	17
Resultados.	18
Table 1. Características demográficas de la población en estudio (n=19).	19
Tabla 2. Parametros iniciales de ventilación mecánica (n=19)	21
Tabla 3. Características gasométricas de la población (n=19)	22
Análisis de alfa diversidad.	23
Tabla 4. Indices de alfa diversidad en muestras positivas para influenza.....	23
Grupo 1: Antibiotico <48 horas, Grupo 2: Antibiotico >48 horas	24
Análisis de Beta diversidad.	24
Figura 1. Microbioma traqueal a nivel de Phylum	26
Figura 2. Microbioma traqueal a nivel de Género.....	27
Figura 3. Beta diversidad entre grupos con consumo de antibióticos de más de 48 horas.....	28
Figura 4. Gráficas de Box-plots. Entre grupos con exposición a antibióticos en relación con las diferentes escalas de gravedad. Prueba U de Mann Whitney.....	29
Tabla 5. Correlación entre la disbiosis del microbioma y las escalas de gravedad.....	30
Discusión.....	31

Conclusión..... 35

Resumen

El microbioma pulmonar recientemente se ha explorado en diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas. Se ha demostrado que la disbiosis que sufren las poblaciones, tiene implicaciones en la evolución, desenlace y gravedad de estas enfermedades. El microbioma en influenza grave, ha sido descrito en estos pacientes en el tracto respiratorio superior, sin que se describa las interacciones entre estas poblaciones y los desenlaces clínicos.

Metodología

El objetivo principal del estudio, fue describir el microbioma del tracto respiratorio inferior y correlacionarlo con los desenlaces clínicos. Reclutamos, pacientes mayores de 18 años, en el área de urgencias del INER, con diagnóstico de enfermedad similar a influenza y neumonía grave, los cuales tuvieran requerimiento de ventilación mecánica al ingreso o dentro de las primeras 24 horas. Se realizó aspirado traqueal a los pacientes incluidos. Se obtuvo DNA bacteriano de estas muestras y el gene ribosomal 16S completo fue amplificado por PCR. Se realizó secuenciación de nueva generación (MiSeq, Illumina) para conocer la secuencia nucleotídica. Posteriormente se realizó su asignación taxonómica (OTU's) mediante el programa QIIME. Los datos clínicos fueron tomados del expediente.

Resultados.

Se reclutaron a describen a 19 pacientes incluidos, de los cuales en 17 pacientes se caracterizó el microbioma. A nivel de Phylum las poblaciones más frecuentes fueron firmicutes 46%, bacteroidetes 24% y proteobacterias 22%. Con respecto a los géneros, los más frecuentes fueron Prevotella, Streptococcus, Granulicatella, Acinetobacter, Pseudomonas y Veillonella. En los pacientes con menos de 72 horas de antibióticos a su ingreso, el aumento del género prevotella tiene una correlación directamente proporcional con las escalas de gravedad siendo las más estadísticamente significativas SAPS II (P= 0.03) y CURB 65 (P= 0.01) y de manera inversamente proporcional con la disminución en la población de streptococcus para las escalas CURB 65 (P= 0.29) y APACHE II (P 0.038).

Conclusión.

En los pacientes con neumonía grave por influenza H1N1, existe una disbiosis en el microbioma traqueal, el cual es diferente al observado en otros estudios. La exposición a antibióticos tiene la capacidad de modificar la riqueza y diversidad del microbioma y tiene una tendencia a correlacionarse con las escalas de gravedad. Los hallazgos de este estudio deben explorarse en poblaciones mayores.

Planteamiento del problema

El microbioma humano se conforma de todas las poblaciones de bacterias y el producto de sus genes en diferentes órganos(1). Recientemente se han incrementado los estudios que analizan el microbioma, con enfoque en las modificaciones en la abundancia y diversidad de las poblaciones bacterianas que ocurren a través de la vida y las exposiciones medio ambientales (1–3). Lo cual impacta en las interacciones, maduración y estimulación de la respuesta inmune celular y humoral(4). El estudio del microbioma inició en tubo digestivo en pacientes sanos, donde se describió su composición y las implicaciones clínicas y para la vida (5). Donsalson describe interesantemente que la diversidad y abundancia del microbioma es dependiente de las condiciones de físico químicas tubo digestivo (Ph, concentración de amonio, sales biliares, nutrientes, disponibilidad de oxígeno) (6). Posteriormente se ha correlacionado no solo con la actividad del sistema inmune, sino con el desarrollo y evolución de diversos padecimiento metabólicos, inmunológicos entre otros (7–11). La descripción del micorbioma en el sistema respiratorio ha avanzado en la descripción del microbioma, en la vía aérea inferior, de sujetos sanos, el cual tiene un papel muy importante en la regulación y maduración pulmonar(12). Charlson y cols describieron la composición del microbioma de la vía aérea superior, en pacientes sanos en comparación a pacientes no fumadoes, A nivel de la nasofaringe 4 phylas fueron la principalmente descritas: Firmicutes 73%, Proteobacterias 12.6%, Bacteroidetes 7%, y Actinobacterias 5.6%. y en la orofaringe los principales son: Bacteroidetes 36.4%, Firmicutes 27.7%, Proteobacterias 12.6%, y Fusobacterias 12.3%. a nivel de género Streptcoccus, Shigella, Acinetobacter y Corynebacterium spp dominanda la diversidad de la nasofaringe. Por otro

lado *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia* y *Veillonella* spp son los principales géneros en la orofaringe. Siendo la diversidad obtenida entre la vía aérea superior y las de lavado bronquiolo alveolar similares, solo con cambios mínimos en su abundancia relativa. En los pacientes fumadores el microbioma basado en sus componentes su abundancia y diversidad, demuestra que las poblaciones en fumadores son más heterogéneas, así como la diversidad entre las muestras es mayor en los fumadores, en la orofaringe *Capnocytophaga*, *Megasphaera*, *Veillonella*, *Haemophilus*, and *Neisseria* spp. Mientras que en Nasofaringe la gran abundancia de firmicutes como *Erysipelotrichaceae* I.S., *Lachnospiraceae* I.S., *Streptococcus* y *Staphylococcus* spp, son los phyla y género que más pueden permitir discriminar entre los fumadores(13). Estos cambios en el microbioma se conocen como disbiosis, y no solo esta asociada a factores patológicos como el tabaquismo también a los hábitos higiénico dietéticos, consumo de antibióticos y factores medioambientales, se ha observado además, que en diferentes enfermedades crónicas de la vía aérea, este microbioma se ve modificado teniendo efecto en la evolución, tratamiento y desenlace de estas diferentes enfermedades (2,4,14).

En los pacientes con bronquiectasias asociadas a fibrosis quística (FQ) y no asociadas (15), predomina el Phylum proteobacteria, (16,17). Siendo los géneros *Pseudomonas* y *Haemophilus* los más comunes, asociándose con la gravedad de la enfermedad y su respuesta a tratamiento(17). En el asma del mismo modo las proteobacterias son el género de mayor predominio, asociándose con la gravedad y la respuesta al tratamiento inhalado. Interesantemente estas alteraciones en la diversidad y riqueza de las poblaciones bacterianas se observan desde la infancia(18,19). En la EPOC una enfermedad obstructiva que tiene una asociación a tóxicos inhalados de la vía aérea como el cigarro o el humo de

combustibles fósiles, se han descrito dos características del microbioma: En la fase estable *H. Influenzae* perteneciente a las proteobacterias, tiene la mayor abundancia entre las poblaciones (20,21). Wang y cols. describen una diferente diversidad en los pacientes con exacerbaciones dividiéndolas en asociadas a procesos infecciosos bacterianos y a deterioros funcionales. Siendo predominante el aumento de proteobacterias (*Haemophilus*) en las exacerbaciones bacterianas y los firmicutes en las eosinofílicas(22).

Uno de los factores que más impactan en la disbiosis del microbioma en la vida adulta es el uso de antibióticos. Roger y cols, describen el predominio de *Pseudomonas* en pacientes con FQ, lo que se correlacionó con un mayor número de exacerbaciones, y aumento de la mortalidad en estos pacientes. (23–25). Weber y cols, describieron que la exposición a antibióticos fue un factor de riesgo para el desarrollo de asma. (26).

Justificación.

Como se ha descrito en la sección anterior las alteraciones en la diversidad y abundancia del microbioma en diversas enfermedades respiratorias se asocian con diversos estados de severidad y de respuesta a tratamiento. En este contexto se conoce poco del microbioma en influenza, ya que escasos trabajos han descrito el microbioma de la vía aérea superior en pacientes con influenza A H1N1(27,28). Chaban y cols. describen por medio de pirosecuenciación las principales alteraciones en el microbioma de la vía aérea superior del microbioma nasofaríngeo en este grupo de pacientes, pero desafortunadamente no realizaron correlaciones con el desenlace clínicos de sus pacientes (28).

La importancia de la exploración del microbioma en influenza radica en que la infección por el virus de influenza A H1N1 pandémica (H1N1pdm09), fue una emergencia de salud para México en 2009 (29), ocasionando 18,449 defunciones confirmadas (30) y cerca de 200,000 casos de enfermedad similar a influenza, con una mortalidad del 22% (31). La infección por el virus de influenza pandémica, y la coinfección con bacterias comunes provenientes de la vía aérea superior, es la principal asociación con infecciones graves de la vía aérea inferior (32). Estas interrelaciones tiene justificación en que la infección viral modifica la respuesta inmune y favorece la susceptibilidad a infecciones por patógenos aumentando la morbimortalidad de esta enfermedad, con una incidencia de coinfección del 19%, siendo los principales asociados; edad mayor de 65 años, choque séptico, y requerimiento de ventilación mecánica(33).

Por tal motivo, la exploración del microbioma de la vía aérea inferior en pacientes con neumonía grave por influenza es importante porque permitirá describir la ecología del

microbioma de la vía aérea inferior en estos pacientes, además nos permitirá identificar a las poblaciones bacterianas más frecuentes y analizar si existen asociaciones entre los parámetros clínicos, así como su impacto en la gravedad y mortalidad.

Finalmente otra importancia de la realización de este trabajo es describir el rendimiento de la muestra tomada por medio de aspiración de secreciones traqueales en pacientes intubados. Ya que los trabajos previamente descritos utilizaron muestras de hisopado nasal y faringeo(27,28). Y se ha descrito por Dickson y cols. que la distribución del microbioma representado por su riqueza y diversidad, desde la vía aérea superior hacia los pulmones se ve modificada por mecanismos de eliminación y reproducción local (teoría de la isla), describiendo que ecológicamente existe similitud con el microbioma de la vía aéreas superior y el lóbulo superior derecho y que la riqueza disminuye proporcionalmente a la distancia en el tracto respiratorio inferior(34). Por tal motivo es importante describir el microbioma a este nivel así como la utilidad de la muestra por aspirado traqueal.

Pregunta de investigación

¿ La disbiosis en el microbioma de la vía aérea inferior ocasionada por la infección de influenza A H1N1 en pacientes con neumonía grave, tiene repercusiones en la evolución clínica y mortalidad de los pacientes?

Hipotesis.

Hipótesis Alterna.

La disbiosis del microbioma en los pacientes con infección por influenza A H1N1, está asociada a mayor gravedad de la enfermedad.

Hipotesis nula

La disbiosis del microbioma en los pacientes con infección por influenza A H1N1, no está asociada a mayor gravedad de la enfermedad.

Objetivo general

Caracterizar el microbioma presente en la vía aérea inferior en pacientes con infección por influenza A H1N1 y describir si existen asociaciones con la evolución clínica y desenlace de estos pacientes.

Objetivos específicos

- Describir el microbioma en la vía aérea inferior en pacientes con neumonía grave por influenza A H1N1.
- Describir la diversidad y riqueza del microbioma de la vía aérea inferior en pacientes con neumonía grave por influenza A H1N1.
- Describir las variables epidemiológicas y factores de riesgo asociados al desarrollo de neumonía grave por influenza A H1N1.
- Describir el uso previo de antibióticos en pacientes con neumonía grave por influenza A H1N1 al ingreso a urgencias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
- Correlacionar si existe relación entre el microbioma de la vía aérea inferior y el desenlace clínico en los pacientes con neumonía grave por influenza A H1N1.

Material y métodos.

Población de estudio

Se realizó un estudio ambispectivo, anidado en una cohorte activa con título Epidemiología molecular de virus emergentes relacionados con la enfermedad respiratoria aguda, con autorización del comité de ética en fecha 26 de octubre de 2016. Se realizó reclutamiento de una cohorte prospectiva con recolección de datos y cultivos de forma retrospectiva. En la cual se incluyeron pacientes mayores de 18 años, de ambos géneros, ingresados a urgencias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), entre enero de 2016 a mayo de 2017, con diagnóstico al ingreso de neumonía grave por enfermedad similar de influenza y con requerimiento de ventilación mecánica al ingreso o dentro de las primeras 24 horas. Realizando aspirado traqueal dentro de las primeras 24 horas. Se excluyeron pacientes con diagnóstico de enfermedad pulmonar crónicas como: 1.- Enfermedad intersticial, 2.- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, 3.- bronquiectasias, 4.- Asma. Además antecedentes de haber ingerido inhibidor de neuroaminidasa por más de 72 horas. Pacientes quienes al ingreso tuvieran requerimiento de ventilación mecánica con parámetros ventilatorios fuera de rangos de seguridad para toma de muestras respiratorias en las primeras 24 horas. Aquellos pacientes con familiares quienes no quisiera firmar el consentimiento informado al momento del ingreso o pacientes con registros clínicos incompletos. Por otro lado se dio seguimiento a los pacientes con diagnóstico de influenza A H1N1 que cumplieran con todas las variables clínicas aunque no se lograra realizar la secuenciación del microbioma. Realizamos dos grupos para la comparación del microbioma basado en el consumo de antibióticos, tomando como valor de corte 48 horas de ingesta de antibióticos, en relación a la literatura está descrito la disbiosis asociada a la

ingesta de antibióticos, sin embargo no está definido un punto de corte, por lo que tomamos este arbitrariamente(35,36). esta separación de grupos no fue utilizada para la comparación de variables clínicas

Se realizó firma de consentimiento informado autorizado por el comité de ética previo a la recolección de los datos clínicos al ingreso y se dio seguimiento durante su estancia y a los 28 días del egreso, estos datos fueron extraídos de los expedientes clínicos.

Toma de muestras.

Se realizaron dentro de las primeras 24 horas en urgencias. Para la toma de muestra respiratorias se empleó una sonda de aspiración traqueal de circuito cerrado nueva, con una trampa para secreciones bronquiales, este procedimiento se realizó en pacientes con PEEP inferior a 10 cmH₂O y una Fio₂ menor a 80%. Una vez tomada la muestra se procedió a su conservación en ultracongelador a temperatura de -70 grados centígrados y posteriormente a su análisis para secuenciación y análisis que se describe más adelante.

Procesamiento de las muestras

Extracción de ADN.

La extracción de ADN, fue realizada con 2 ml de aspirado traqueal usando el QIAmp Cador Pathogen Mini Kit (Quiagen,) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

16S rDNA preparación y secuenciación para la biblioteca.

Se amplificó el gen ribosomal 16S (16SrDNA) usando primers ya descritos por Anderson y Cols. 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y 1492R (reverse: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Con los productos de amplificación se hicieron

bibliotecas empleando el estuche Nextera XT (Illumina). Brevemente las muestras fueron normalizadas a 0.2 ng/μl usando el estuche Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher) y posteriormente fueron fragmentados y etiquetados, seguido por un proceso de purificación por perlas AMPure XP (Beckman Coulter). Las bibliotecas fueron analizadas en el secuenciador MiSeq Desktop Sequencer (Illumina) con lecturas pareadas de 250 pb de longitud.

Análisis de secuencias y asignación taxonómica.

Se realizó el demultiplexado de las secuencias y se descartaron las que presentaron un valor de calidad menor a Q30. [39]. Las secuencias fueron analizadas por el programa QIIME version 1.8.0 [40], usando el algoritmo *pick_open_reference_otus.py*. Las unidades taxonómicas operativas (OTU por sus siglas en Inglés) fueron obtenidas mediante alineación con la base de datos de 16S Greengenes 13.8. Las OTUs fueron obtenidas con una similitud del 97% y las secuencias quiméricas fueron removidas usando el clasificador RDP. Se obtuvieron un total de 2,093,378 lecturas, con un rango entre 10643 a 547056 lecturas (promedio 71600). Los OTUs fueron agrupados y diferenciados a niveles taxonómicos en phylum, clase, orden, familia y género. Se obtuvo en cada nivel la abundancia relativa, usando el *summarize_taxa_through_plots.py* script. Los árboles filogenéticos fueron creados usando FastTree2 con los parámetros determinados, y se emplearon para el cálculo de alfa y beta diversidad.

[Análisis de la diversidad del microbioma.](#)

Para evaluar si se realizó adecuadamente el muestreo en el grupo de pacientes, se emplearon gráficos de rarefacción. El análisis de rarefacción fue realizado sobre 10 a 1000

lecturas de profundidad con 10 tiempos de submuestreo por cada secuenciación. Las curvas de rarefacción fueron generadas, por tres índices; distancia filogenética, OTUs observados e índice de Chao1 usando el algoritmo de QIIME *alpha_rarefaction.py*. Se calcularon los índices de riqueza; distancia filogenética (PD whole tree), chao1 y el número de OUTs, así mismo se calculó el índice de diversidad Simpson.

Análisis de Beta diversidad y comparación de distancia.

Para comparar la diversidad entre dos grupos de muestras, empleamos el método de Unifrac metric. El análisis de Beta diversidad fue realizado utilizando el algoritmo jackknifed (*jackknifed_beta_diversity.py*) en el programa QIIME para crear matrices de distancias, arboles UPGMA y gráficos de análisis de principales coordinados (PCoA). Para comparar la distancia entre grupos creamos gráficos de comparaciones y para determinar si existe significancia estadística entre distancias se realizaron por prueba T de student.

Análisis estadístico.

Las variables se expresaron como medianas con rangos intercuartilares (RIC) o medias con desviación estandar según fuera el caso y las variables categóricas como frecuencias con porcentajes, para la comparación de grupos se utilizó U-Mann Whitney y T de student para el análisis de variables según fuera el caso. La correlación de variables se hizo por Rho de Spearman. Se tomo como valor de $p < 0.05$ a dos colas. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22.0

Resultados.

Características de la población.

28 pacientes fueron incluidos al inicio, se excluyeron 9 pacientes, 2 por registros incompletos en el expediente, 4 por diagnósticos diferentes a la enfermedad similar a influenza (VIH 3, crisis asmática 1) y 1 paciente por influenza B. En 2 pacientes no se obtuvo muestra de aspirado traqueal. Finalmente incluimos 19 pacientes con diagnóstico de influenza H1N1, sin embargo en 2 pacientes no se pudo realizar secuenciación para describir el microbioma. Se decidió incluirlos dentro de la descripción de las variables clínicas de la población ya que esto no afecta la metodología del estudio. 12 pacientes fueron incluidos en el grupo de consumo de antibióticos por más de 48 horas, los otros 5 pacientes tenían menos de 48 horas de antibióticos.

Evolución clínica

Se describen 19 pacientes. 68% eran hombres, la media de edad fue 41.3 (± 10) años, entre el grupo se documentaron las siguientes comorbilidades de relevancia diabetes mellitus (16%), tabaquismo (21%) de los cuales el 100% era activo, 84% (n= 16) habían recibido tratamiento antibiótico previo, las cefalosporinas fue el grupo más usado (62%), seguido por la combinación de macrólidos o quinolonas. (25%). Interesantemente ningún paciente incluido en este estudio tenía vacunación previa. El resto de sus características demográficas se presentan en la tabla 1. Bioquímicamente destacó: linfopenia de $800\text{cel}/\text{mm}^3$ ($0.32\text{cel}/\text{mm}^3$). Elevación de deshidrogenasa láctica (DHL) 512 mg/dl (343-752) y la creatininfosfoquinasa (CPK) 339 mg/dl (125-568), sin un impacto notorio en la función renal al ingreso, pero al seguimiento clínico 26% de los pacientes requirieron terapia de sustitución renal con hemodiálisis. El uso de ventilación mecánica no invasiva al

ingreso se aplicó en 26% (n=5). La ventilación controlada por volumen fue el método más común, 68% (n=13), con PEEP \geq 10 cmH₂O en 85% (n= 16) y se pronó al 26% (n= 5) En la tabla 2 y 3 se presenta las variables ventilatorias y gasométricas de los pacientes. En el seguimiento hospitalario 53% presentaron neumonía hospitalaria con aislamiento de 1 germen y 31% presentó dos aislamientos. *Acinetobacter baumannii* fue el germen más frecuente (31%) en contraste *pseudomonas* se presentó en 10%. La estancia hospitalaria de los pacientes fue de 28 días (20-40), con una estancia en la unidad de cuidados intensivos de 21 días (11-28). Se estadificaron por las escalas de gravedad APACHE II y SAPS II, las cuales mostraron una media de puntaje de 12 (\pm 3.05) y 35 (\pm 7.17) respectivamente. Con una mortalidad del 21% al seguimiento.

Table 1. Características demográficas de la población en estudio (n=19).

Variable	Valor*
Edad en años	41.3 \pm 10.0
Sexo masculino	13 (68.4)
Habitantes de la ciudad de México	14 (73.7)
IMC, kg/m²	33.2 \pm 5.3
Fumadores activos.	4 (21.1)
Diabetes mellitus tipo 2	3 (15.8)
Otras comorbilidades[†]	4 (21.1)
Vacunación para influenza	0
Tratamiento antibiótico previo a la hospitalización (>48 hrs)	12 (70.5%)
Cefalosporinas n=16	10 (62.5)
Cefalosporinas más macrólidos o quinolonas n=16	4 (25.0)
Penicilina o macrolidos n=16	2 (12.5)
Días desde el inicio de síntomas.	8 (7-10)
Días de estancia en UCI.	21(11.5-27.8)

Días de hospitalización.	28(20-40)
Mortalidad a 28 días.	4(21.1)
Leucocitos x 10³/mm³	8.45(4.08)
Linfocitos x 10³/ mm³	0.83 (0.32)
Neutrofilos x 10³/ mm³	7.13 (3.84)
Hemoglobina, gr/dL	15.07 (1.78)
Plaquetas x 10³/ mm³	174.84 (57.05)
Glucosa, mg/dL, median (IQR)	129 (108-199)
Creatinina, mg/dL	1.19 (0.61)
Nitrogeno ureico en sangre, mg/dL	20.42 (12.13)
Albumina, g/ dL	2.64 (0.55)
Bilirrubina, mg/ dL	0.98 (0.59)
CPK, U/ml, median(IQR)	339 (125-568)
DHL, U/ml, median(IQR)	512 (343-752)
Procalcitonina ng/ml	1.74 (2.80)
Lactato > 1.8 mmol/lt	5 (26.3)
Procalcitonina > 1 ng/ml	9 (47.4)
Requerimiento de hemodiálisis.	5 (26.3)
Uso de previo de VMNI	5 (26.3)
Escala APACHE II	11.74 (3.05)
Escala SOFA II	4.89 (1.41)
Escala SAPS II	35.11 (7.17)
Escala CURB 65 > 1 point	8 (42.10)

*los datos se presenta como media con \pm DS o No. (%), o medianas (RIC). Hipertensión arterial, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, tuberculosis, alcoholismo. IMC= índice de masa corporal, RIC= Rango intercuartil, CPK= creatinin fosfoquinasa; DHL= dehidrogenasa lactica; APACHE= Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, SOFA= Sequential Organ Failure Assesment; SAPS= Symplified Acute Physiologic Score; CURB= escala de gravedad de neumonía.

Tabla 2. Parametros iniciales de ventilación mecánica (n=19)

PARÁMETROS DE VM INICIAL	
VMNI	5 (23.8%)
VMI	21(100%)
Volumen	13(61%)
Presión	7 (33%)
PEEP <10 cmH2O	3 (14.3%)
PEEP ≥10 cmH2O	18 (87.5%)
Vol/min	9.2 (7-10)
Fio2 %	100 (78-100)
Pronación	5 (23.8%)

VMNI: Ventilación mecánica no invasiva, VMI ventilación mecánica invasiva, PEEP Presión positiva al final de la espiración, Vol/min. Ventilación/minuto. Fio2% porcentaje de fracción inspirada de oxígeno.

Tabla 3. Características gasométricas de la población (n=19)

Gasometría Ingreso	
pH	7.44 (7.31-7.45)
PaCO₂	31 (24.5-36.4)
PaO₂	43.2 (38.1-51.4)
HCO₃	19.3 (17.5-22.7)
Exceso de base	-2.4 (-4.5-1.3)
Lactato	1.4 (1.1-2.1)
Saturación	75 (68.2-86.5)
PaO₂/FiO₂	171 (108-203)

pH potencial de hidrogeno, PaCo₂ presión parcial de dióxido de carbono arterial, PaO₂ presión parcial de oxígeno arterial. HCO₃ Bicarbonato. PaO₂/FiO₂% Relación entre la presión parcial de oxígeno y la fracción espirada de oxígeno.

Análisis de alfa diversidad.

La diversidad y la riqueza del gén 16S en cada muestra fue evaluada usando diferentes índices. Observamos dos grupos de muestras en quienes tienen menor índice de diversidad (7 muestras) y otras con mayor número índice de diversidad (10 muestras). Estos grupos mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) para Chao1, observadas especies y PD whole tree mientras que para el índice de diversidad de Simpson la significancia fue $p < 0.01$. Sin embargo, las muestras que integran los grupos no comparten características clínicas u otro tipo de características. Además analizamos la alfa diversidad en dos grupos de pacientes. Un grupo que recibió más de 48 horas de antibióticos (AA) y pacientes con menos de 48 horas de administración de antibióticos o sin administración de ellos (ANA). Todos los índices de riqueza y de diversidad calculados en el grupo AA, tuvieron valores menores en comparación con los grupos que no tuvieron exposición a antibióticos (Tabla 4) sin embargo esta diferencia no fue significativa.

Tabla 4. Índices de alfa diversidad en muestras positivas para influenza.

Muestra	PD_whole_tree	Simpson ^o	_otus observed	chao1	Grupo
INF432	134.04323	0.980744288	2674	4312.923077	1
INF433	73.8777	0.947035814	1712	3249.819549	1
INF442	48.55639	0.954167709	796	1714.69697	1
INF704	333.7895	0.990585297	12458	15079.12538	1
INF718	108.62278	0.986437207	1968	3416.639576	1
INF434	168.08847	0.987683742	4610	7732.094595	1
Mean	119.6252041	0.974288752	2727.671689	4608.028286	
INF440	82.85487	0.984265675	2219	3814.443548	2

INF656	88.51882	0.768343827	2631	3654.126195	2
INF702	167.06655	0.985921669	5353	7719.994123	2
INF689	135.1165	0.967589265	3353	5303.005217	2
INF573	126.50481	0.976891507	3299	5571.451613	2
INF726	149.62138	0.989354616	4701	7019.72306	2
INF437	42.6752	0.970215636	1237	2167.532995	2
INF566	131.53908	0.955475813	3880	4920.266094	2
INF430	41.59642	0.972960353	899	1322.036585	2
INF666	35.2049	0.950238303	779	1540.486957	2
INF559	187.86278	0.983589875	6437	9567.615385	2
Mean	93.61465832	0.95284192	2589.873244	4036.708783	

Mann-Whitney test. No se encontraron Diferencias significativas

Grupo 1: Antibiotico <48 horas, Grupo 2: Antibiotico >48 horas

Analisis de Beta diversidad.

El análisis de principales coordinados (PCoA) mostró que las muestras pertenecientes al grupo sin exposición de antibióticos, se organizaron en un grupo bien definido (Figura 2), en contraste 6 de lass 10 muestras con antibiótico AA se encontraron dispersas en el gráfico. Cuando comparamos la distancia entre los grupos de muestras se encontró una diferencia estadísticamente entre ambas ($p < 0.01$).

Figura 2

Descripción del microbioma

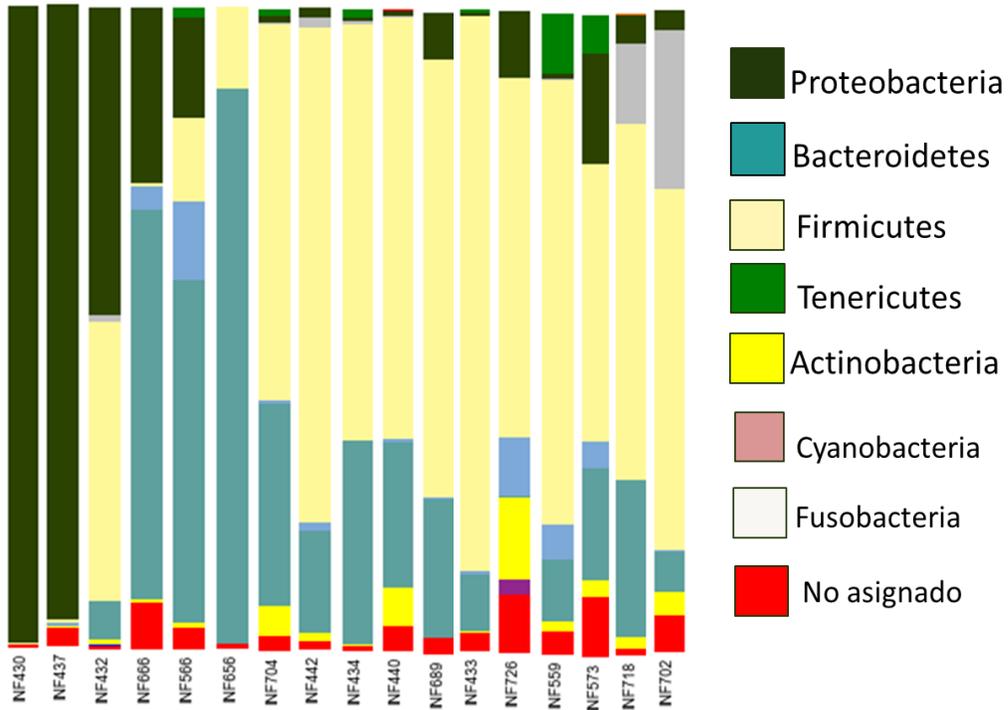
Se caracterizó el microbioma del aspirado traqueal de 17 pacientes, observándose las siguientes características. A nivel de Phylum las poblaciones más frecuentes fueron

Firmicutes 46%, Bacteroidetes 24% y Proteobacterias 22%, el resto de los phylums se describen en la figura 1. Con respecto a los géneros, los más frecuentes fueron *Prevotella*, *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Veillonella* (figura 2). Cuando examinamos las variables clínicas y la presencia de los géneros bacterianos, se identificó una tendencia en pacientes fumadores al aumentó en la población de *Prevotella* y *Acinetobacter*, así como la disminución en la población de estreptococos.

En lo que respecta a la exposición a antibióticos, se observó disminución en el número de especies en las muestras en este grupo además, un aumento en el género *Prevotella* y un descenso significativo en la población de *Estreptococcus* ($p < 0.05$) es observado en los pacientes. Por otro lado, en los pacientes que fallecieron se observó una mayor población de *Prevotella* y *Granulicatella*.

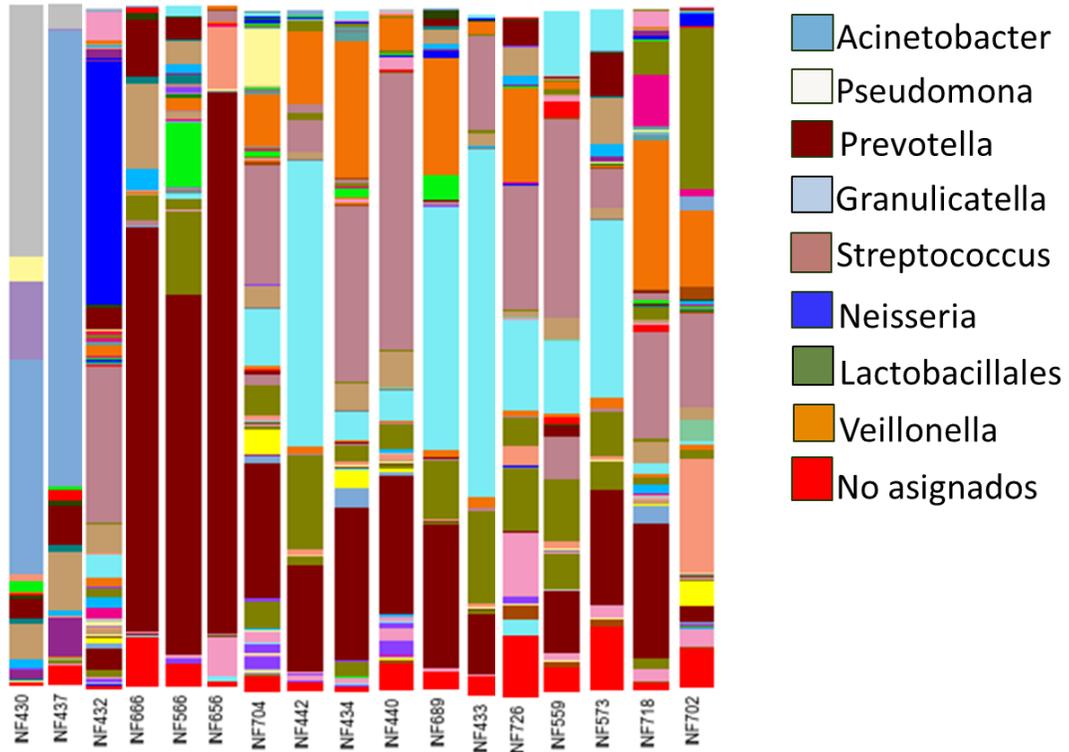
Se encontró que en los pacientes con menos de 72 horas de antibióticos a su ingreso, el aumento del género *Prevotella* tiene una correlación directamente proporcional con las escalas de gravedad CURB 65, APACHE II, SAPS II siendo las más estadísticamente significativas SAPS II ($P = 0.03$) y CURB 65 ($P = 0.01$) y de manera inversamente proporcional con la disminución en la población de *Streptococcus* para las escalas CURB 65 ($P = 0.29$) y APACHE II ($P = 0.038$), los valores se expresan en la tabla 5.

Figura 1. Microbioma traqueal a nivel de Phylum .



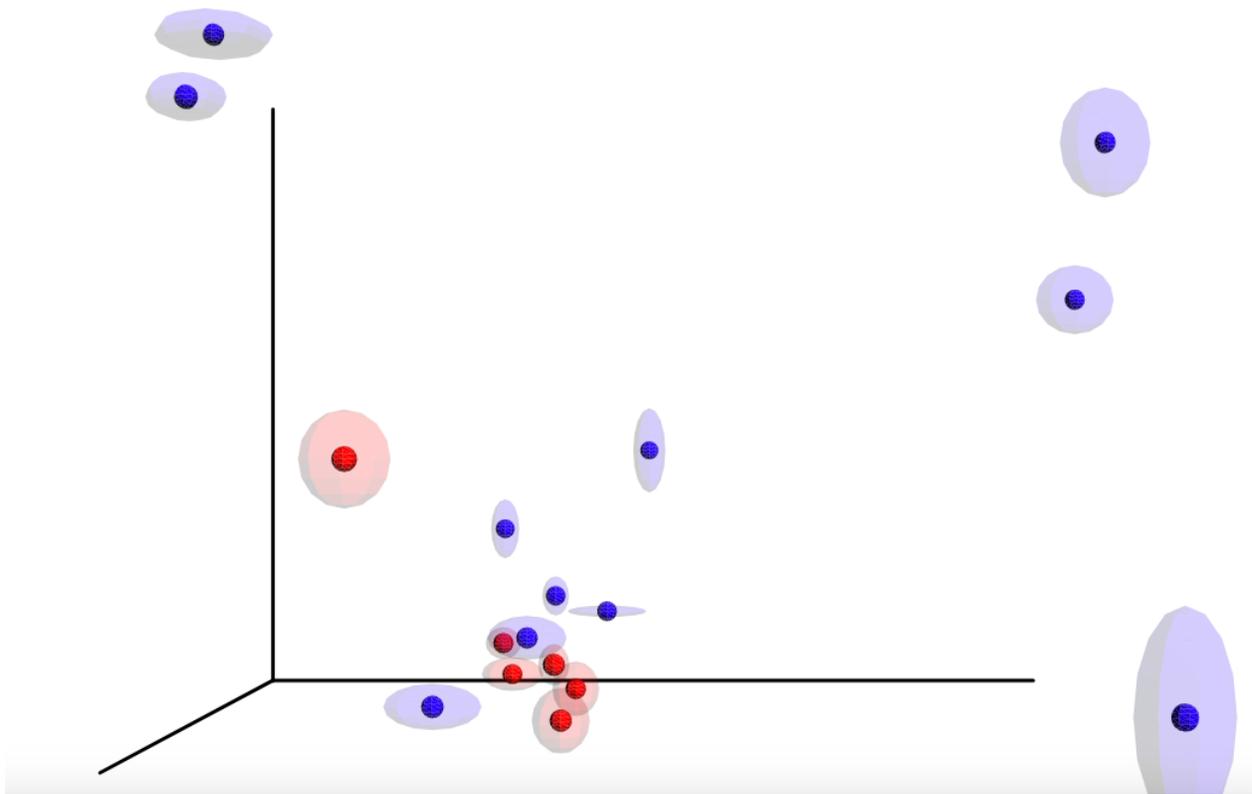
Microbioma traqueal por paciente, se expresa a nivel de phylum.

Figura 2. Microbioma traqueal a nivel de Género.



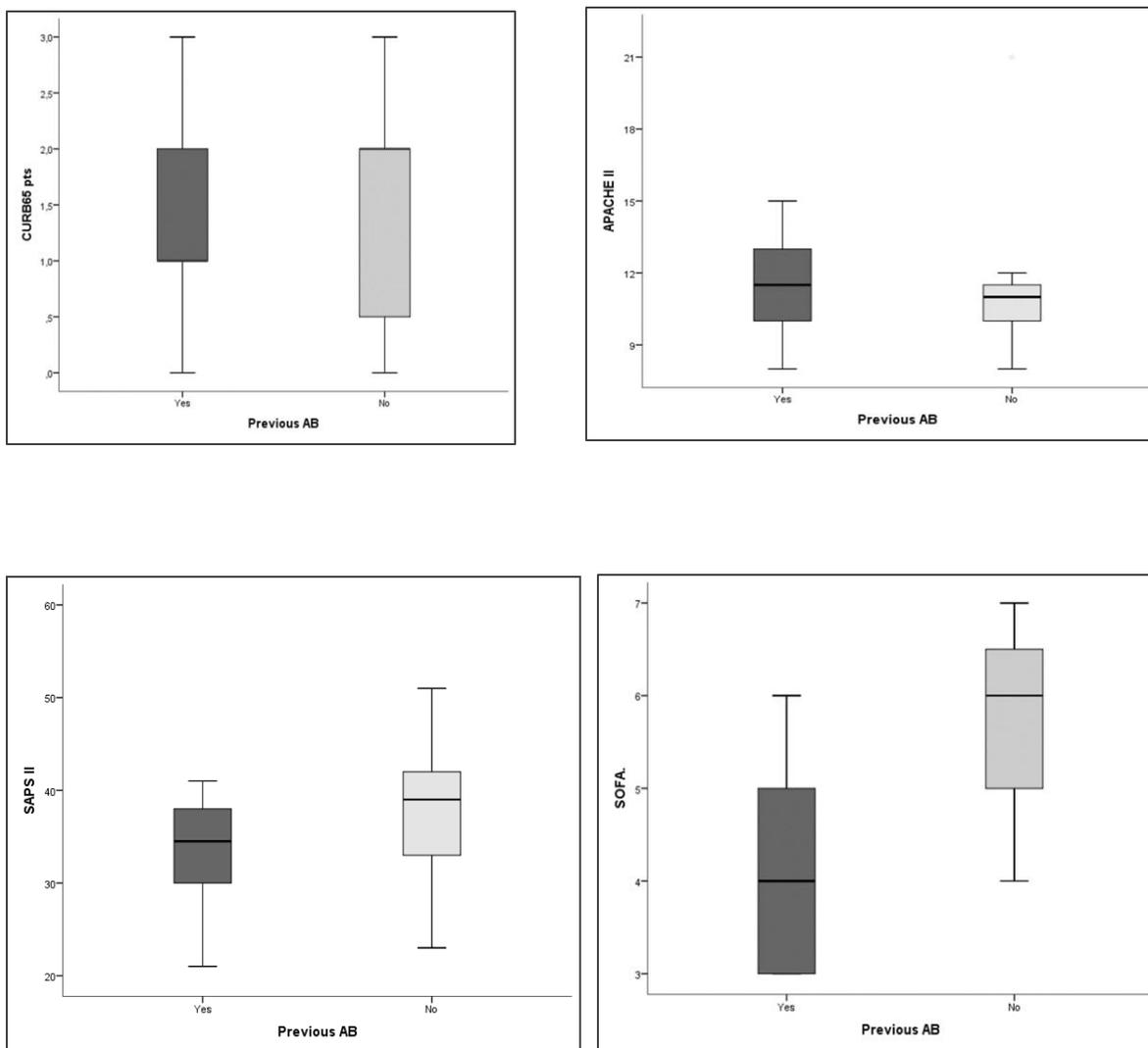
Microbioma traqueal por paciente, se expresa a nivel de género.

Figura 3. Beta diversidad entre grupos con consumo de antibióticos de más de 48 horas.



Grupo 1: En rojo se expresa la Beta diversidad del microbioma traqueal en los pacientes con menos de 48 horas de antibióticos. En azul se expresan los pacientes con más de 48 horas.

Figura 4. Gráficas de Box-plots. Entre grupos con exposición a antibióticos en relación con las diferentes escalas de gravedad. Prueba U de Mann Whitney.



Escalas de gravedad CURB 65, APACHE II, SAPS II, SOFA. En relación con el consumo de antibióticos.

Tabla 5. Correlación entre la disbiosis del microbioma y las escalas de gravedad.

	N=7	<i>prevotella</i>	<i>streptococcus</i>
CURB 65	<i>Rho</i>	,954**	-,805*
	<i>Spearman</i>		
	<i>p</i>	.001	.029
APACHE II	<i>Rho</i>	,818*	-,782*
	<i>Spearman</i>		
	<i>p</i>	.024	.038
SAPS II	<i>Rho</i>	,927**	.
	<i>Spearman</i>		
	<i>p</i>	.003	.
SOFA	<i>Rho</i>	.753	.
	<i>Spearman</i>		
	<i>p</i>	.051	.

Correlación de Rho de Spearman. Entre las escalas de gravedad CURB 65, APACHE II, SAPS II, SOFA. Y los géneros *Prevotella* y *Streptococcus*.

Discusión.

La caracterización del microbioma respiratorio en las diferentes enfermedades crónicas y agudas, es de vital importancia para conocer sus alteraciones en comparación con un estado de salud previo. La principal aportación de este trabajo es la descripción del microbioma en muestras de aspirado traqueal en paciente con influenza A H1N1. Encontramos a nivel de Phylum los principales grupos son los Firmicutes, Proteobacterias y Bacteroidetes, Por otro lado a nivel de género los principales fueron *Granulicatella*, *Prevotella*, *Pseudomonas spp*, y *Acinetobacter*. Mientras que disminuyeron los generos *Streptococcus spp*, *Veillonela* y *Lactobacillales*. Esta descripción es una de las pocas encontradas en la literatura en pacientes con influenza y ninguna ha empleado el aspirado traqueal como muestra respiratoria, esto se corroboró haciendo una búsqueda exhaustiva en la biblioteca de Pubmed (ref). Debido a esto, la comparación de los resultados obtenidos con otros estudios es muy limitada ya que no existen suficientes datos para hacer el análisis. Por otra parte la composición del microbioma depende de muchos factores como son los nutricionales, físico químicos y de la respuesta inmunológica innata y adaptativa, así mismo es dependiente del sitio anatómico. En el caso del sistema respiratorio, el microbioma de la vía respiratoria supraglótica, difiere del infraglótico (ref), ($p < 0.006$). Por otro lado la riqueza, se va modificando conforme avanza la vía respiratoria (34). Por tal motivo la comparación entre la muestra traqueal y la descrita a nivel nasofaríngea en pacientes con influenza A H1N1, presenta muchas limitaciones en términos de diversidad y riqueza. Sin embargo son los únicos datos disponibles nos indican que a nivel de género *S aureus*, *S pneumoniae* y *Corynebacterium Accolens* predominan en el microbioma nasal, desafortunadamente, estos autores no realizan correlaciones clínicas con sus hallazgos(28). En otro reporte, la relación

de diversas bacterias con el desarrollo de un proceso infeccioso pulmonar asociado, fue explorado en pacientes con neumonía comunitaria con y sin infección por influenza A H1N1. Realizando la toma de muestras de secreciones nasofaríngeas, describen en pacientes con influenza H1N1pdm09 que a nivel de Phylum, *Pseudomonadaceae*, se encuentra aumentado, y los phylum *Prevotellaceae*, *Veillonellaceae* y *Neisseriaceae* se encuentran disminuidos. Por otro lado la abundancia relativa de especies comunes de neumonía como neumococo, *H. Influenzae*, *Moraxella Catarrhalis* y *S aureus*, no son diferentes entre ambos grupos y no parecen influir en el desarrollo de procesos infecciosos(27).

En conjunto podemos concluir en este punto que la neumonía grave ocasionada por el virus de la influenza, tiene como desenlace el desarrollo de una disbiosis del microbioma en la vía aérea a diferentes niveles, lo cual tiene implicaciones clínicas en los pacientes.

En este estudio, las características clínicas de los pacientes fueron similares a las descritas por otras cohortes de pacientes, en la que estos cursan con hipoxemia refractaria a tratamiento(37). Sin embargo, destacamos que el 100% de los pacientes en quien se inicio ventilación mecánica no invasiva fracasaron y requirieron intubación orotraqueal y ventilación mecánica que en el 100% de los casos fue ventilación prolongada. Los resultados en la literatura al respecto son controversiales ya que la tasa de éxito al uso de ventilación mecánica no invasiva se encuentra descrita entre el 40% al 60%, incluso siendo similar en población latina(38–40). Los factores de riesgo asociados a fracaso principalmente fueron: la gravedad representado por la escala de APACHE II, el grado de hipoxemia manifestado por la PaO₂/Fio₂, así como el requerimiento de vasopresor(40,41). Además Masclans y cols. describen que en población con neumonía por influenza A H1N1

un APACHE II > 7 puntos confiere un riesgo de 10.7 (OR) veces más de requerir ventilación, mientras que la media de puntaje en nuestra población fue de 11.7 (± 3.0), otros factores descritos en esta población fueron: múltiples opacidades en la radiografía OR 3.5 y requerimiento de vasopresor OR 8.1. Aunque es importante señalar que en estos pacientes el uso de ventilación mecánica no invasiva, no representa un retraso en el tratamiento y no tiene efectos en desenlaces como días de ventilación o mortalidad(38). Por otro lado la importancia de estas condiciones radica en la limitación de la toma de muestras en la vía aérea inferior para el estudio del microbioma, ya que sobre presiones positivas al final de la espiración superiores a 10 cmH₂O y requerimientos elevados de fracción inspirada de oxígeno en este grupo de pacientes, aumentan la morbimortalidad de las muestras por broncoscopía.

Se correlacionaron las alteraciones descritas en el microbioma traqueal, con las escalas de gravedad descritas en pacientes con neumonía comunitaria grave por influenza, entre las cuales se utilizó CURB 65 que es una escala diseñada para neumonía(42). Entre otras escalas de gravedad utilizamos APACHE II(43), SAPS II(44) y SOFA(45). De todos los Phylums y géneros descritos en nuestro trabajo, el género *Prevotella* se observó incrementado en los pacientes con exposición a tabaquismo, así mismo este incremento se observó en aquellos pacientes que fallecieron y tuvo una correlación franca con la gravedad del cuadro al ingreso documentado por las escalas CURB 65 y SAPS II (Rho 0.954, p = 0.001 / 927 p = 0.003). Esta descripción es concordante con la literatura Charlson y cols. describieron el microbioma de los pacientes fumadores sanos, en la cual el grupo expuesto al cigarro tuvo aumento en la abundancia relativa del Phylum Bacteroidetes y entre los principales anaerobios que aumentaron su abundancia fueron *Prevotella*, *Capnocytophaga*

y *Rhotia*(13). Aunque este hallazgo es contrastante con el trabajo de Leung y cols, quienes describieron el microbioma orofaríngeo en pacientes con neumonía por influenza A H1N1, encontrando que tanto a nivel de Phylum como de género *Prevotella* tiene una disminución muy importante en su abundancia y riqueza en el microbioma supraglótico(27).

Conclusión.

El microbioma de la vía aérea inferior específicamente a nivel traqueal, sufre diversas modificaciones en su abundancia relativa y riqueza. Factores externos como el uso de antibióticos y el tabaquismo en este estudio parecen tener el mayor peso en este resultado. Sin embargo como se describió previamente existe una disminución gradual de la riqueza y la abundancia en el microbioma respiratorio de vía respiratoria superior a inferior por lo que no es posible comparar nuestros resultados con otros autores que describieron el microbioma de la vía aérea superior. Y el mayor aporte de este trabajo es la descripción puntual del microbioma traqueal en pacientes con influenza y la disbiosis que este manifiesta. Por último proponemos caracterizar el microbioma en aspirados traqueales de personas sin neumonía para comparar nuestros hallazgos y corroborar la disbiosis presente en estos pacientes y correlacionarla con la gravedad de la enfermedad respiratoria.

1. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet.* 2013 [2017];29(1):51–8.
2. Lynch S V. The Lung Microbiome and Airway Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2016 [2017];13(Supplement_5):S462–5.
3. Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin Transl Immunol.* 2017 [2017];6(3):e133.
4. Man WH, de Steenhuijsen Piters WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017 [2017];15(5):259–70.
5. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010 [2018];464(7285):59–65.
6. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2016 [2018];14(1):20–32.
7. Yang AL, Kashyap PC. A clinical primer of the role of gut microbiome in health and disease. *Trop Gastroenterol.* [2018];36(1):1–13.
8. Kabeerdoss J, Sandhya P, Danda D. Gut inflammation and microbiome in spondyloarthritis. *Rheumatol Int.* 2016 [2018];36(4):457–68.
9. Øyri SF, Múzes G, Sipos F. Dysbiotic gut microbiome: A key element of Crohn’s disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015 [2018];43:36–49.
10. Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible

- Explanation for Obesity. *Curr Obes Rep.* 2015 [2018];4(2):250–61.
11. Cresci GA, Bawden E. Gut Microbiome. *Nutr Clin Pract.* 2015 [2018];30(6):734–46.
 12. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The Role of the Bacterial Microbiome in Lung Disease. [2018];
 13. Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H. Disordered Microbial Communities in the Upper Respiratory Tract of Cigarette Smokers. *PLoS One.* 2010 [2018];5(12):15216.
 14. Lyon J. The Lung Microbiome: Key to Respiratory Ills? *JAMA.* 2017 [2017];317(17):1713.
 15. Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, Aliberti S, Marshall SE, Loebinger MR, et al. European Respiratory Society guidelines for the management of adult bronchiectasis. [2017];
 16. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, Tunney MM, et al. The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. Fleiszig S, editor. *PLoS One.* 2012 [2017];7(9):e45001.
 17. Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, Drain M, Klem ER, Cardwell C, et al. Lung Microbiota and Bacterial Abundance in Patients with Bronchiectasis when Clinically Stable and during Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 [2017];187(10):1118–26.
 18. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, et al. Airway

microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 [2017];127(2):372-381.e1-3.

19. Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 [2017];131(2):346–352.e3.
20. Barker BL, Haldar K, Patel H, Pavord ID, Barer MR, Brightling CE, et al. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. *Chest.* 2015 [2017];147(1):46–55.
21. Tufvesson E, Bjermer L, Ekberg M. Patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronically colonized with *Haemophilus influenzae* during stable disease phase have increased airway inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015 [2017];10:881–9.
22. Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, Spivak A, Mayhew D, Miller BE, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J.* 2016 [2017];47(4):1082–92.
23. Rogers GB, Bruce KD, Martin ML, Burr LD, Serisier DJ. The effect of long-term macrolide treatment on respiratory microbiota composition in non-cystic fibrosis bronchiectasis: an analysis from the randomised, double-blind, placebo-controlled BLESS trial. *Lancet Respir Med.* 2014 [2017];2(12):988–96.
24. Finch S, McDonnell MJ, Abo-Leyah H, Aliberti S, Chalmers JD. A Comprehensive Analysis of the Impact of *Pseudomonas aeruginosa* Colonization on Prognosis in

- Adult Bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 [2017];12(11):1602–11.
25. Taylor SL, Rogers GB, Chen AC-H, Burr LD, McGuckin MA, Serisier DJ. Matrix metalloproteinases vary with airway microbiota composition and lung function in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 [2017];12(5):701–7.
 26. Weber J, Illi S, Nowak D, Schierl R, Holst O, von Mutius E, et al. Asthma and the hygiene hypothesis. Does cleanliness matter? *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 [2017];191(5):522–9.
 27. Leung RK-K, Zhou J-W, Guan W, Li S-K, Yang Z-F, Tsui SK-W. Modulation of potential respiratory pathogens by pH1N1 viral infection. *Clin Microbiol Infect*. 2013 [2018];19(10):930–5.
 28. Chaban B, Albert A, Links MG, Gardy J, Tang P, Hill JE. Characterization of the Upper Respiratory Tract Microbiomes of Patients with Pandemic H1N1 Influenza. Tompkins SM, editor. *PLoS One*. 2013 [2018];8(7):e69559.
 29. Gallaher WR. Towards a sane and rational approach to management of Influenza H1N1 2009. *Virology*. 2009 [2017];6(1):51.
 30. WHO | Pandemic (H1N1) 2009 - update 112. WHO. 2015 [2017];
 31. WHO | Influenza. WHO. 2004 [2017];
 32. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*. 2008 [2018];198(7):962–70.
 33. Cillóniz C, Ewig S, Menéndez R, Ferrer M, Polverino E, Reyes S, et al. Bacterial co-

- infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *J Infect.* 2012 [2017];65(3):223–30.
34. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, Mccloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. [2018];
 35. Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta M-C, Finlay BB. Effects of Antibiotics on Human Microbiota and Subsequent Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2014 [2018];68(1):217–35.
 36. Yallapragada SG, Nash CB, Robinson DT. Early-Life Exposure to Antibiotics, Alterations in the Intestinal Microbiome, and Risk of Metabolic Disease in Children and Adults. *Pediatr Ann.* 2015 [2018];44(11):e265–9.
 37. Martínez-Briseño D, Torre-Bouscoulet L, Herrera-Zamora J de J, Díaz-Rico J, Sandoval-Macías G, Pérez-Padilla R, et al. Clinical Characteristics and Mortality of Influenza A H1N1 and Influenza-Like Illness in Mexico City in the 2013-2014 Winter Season. *Rev Invest Clin.* [2017];68(3):147–53.
 38. Masclans JR, Pérez M, Almirall J, Lorente L, Marqués A, Socías L, et al. Early non-invasive ventilation treatment for severe influenza pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2013 [2018];19(3):249–56.
 39. Liu CM, Price LB, Hungate BA, Abraham AG, Larsen LA, Christensen K, et al. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Sci Adv.* 2015 [2018];1(5):e1400216.
 40. Timenetsky KT, Aquino SH, Saghabi C, Taniguchi C, Silvia C V, Correa L, et al.

High success and low mortality rates with non-invasive ventilation in influenza A H1N1 patients in a tertiary hospital. *BMC Res Notes*. 2011 [2018];4(1):375.

41. Chawla R, Mansuriya J, Modi N, Pandey A, Juneja D, Chawla A, et al. Acute respiratory distress syndrome: Predictors of noninvasive ventilation failure and intensive care unit mortality in clinical practice ☆,☆☆. 2016 [2018];
42. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*. 2003 [2018];58(5):377–82.
43. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985 [2018];13(10):818–29.
44. Le Gall J-R, Lemeshow S, Saulnier F. A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 1993 [2018];270(24):2957.
45. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996 [2018];22(7):707–10.