



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
"DR. EDUARDO LICEAGA"**

**TESIS
COMPARACION ENTRE DETERMINACION GENOMICA Y CULTIVO
MICROBIOLOGICO PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DE NEUMONIA ASOCIADO
A VENTILACION MECANICA.**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:

MEDICINA CRITICA

PRESENTA:

DRA.LETICIA NUÑEZ MENDEZ

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO CHAVEZ MORALES
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"**

CIUDAD DE MEXICO, OCTUBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hospital General de México
“Dr. Eduardo Liceaga”
Ciudad de México

DR. CHAVEZ MORALES
Jefa de Servicio de Terapia Intensiva Medica, Profesora Titular y Asesor de Tesis

DR. CALLEROS RODRIGUEZ SERGIO
Profesor Adjunto.

Agradecimientos.

A mis profesores que sin recompensa alguna día a día me brindaron su apoyo, conocimientos, e impulsarme a seguir adelante siempre en busca de la excelencia.

A mi familia por brindarme su apoyo incondicional en cada uno de los proyectos de vida.

INDICE

Parte	Página
Título	1
Presentación	2
Agradecimiento	3
Índice	4
Resumen	5
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	11
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	12
Metodología	13
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	13
Procedimiento	16
Análisis estadístico	17
Aspectos Bioéticos	17
Relevancia y expectativas	17
Recursos disponibles	18
Resultados	19
Discusión	28
Conclusiones	29
Bibliografía	30
Anexos	33

COMPARACION ENTRE DETERMINACION GENOMICA Y CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DE NEUMONIA ASOCIADO A VENTILACION MECANICA.

RESUMEN ESTRUCTURADO.

ANTECEDENTES

Las infecciones son muy frecuentes en los pacientes que se encuentran ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI)^{1,2,8} Las causas más frecuentes de infección adquirida en la comunidad que precisa ingreso en la UCI son las infecciones respiratorias, infecciones urinarias y las infecciones del sistema nervioso central.^{3,8} En el paciente crítico se añaden factores, haciéndolos especialmente vulnerables a las infecciones por lo cual la microbiología clínica, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado. En la secuenciación de Sanger, el ADN blanco es copiado muchas veces y se hacen fragmentos de diferentes longitudes. Nucleótidos fluorescentes que actúan como "terminadores de cadena" marcan los extremos de los fragmentos y permiten la determinación de la secuencia.⁵ La secuenciación de Sanger arroja secuencias de alta calidad para segmentos relativamente largos de ADN (de hasta aproximadamente 900 pares de bases).

OBJETIVO.

Conocer la especificidad de la determinación genómica vs cultivo microbiológico para la detección de agentes bacterianos en muestra bronquial para establecer tratamiento oportuno dirigido y de esta manera contribuir a la disminución de la mortalidad en pacientes con neumonía.

HIPOTESIS.

H1. La determinación de secuenciación de ADN microbiológico en muestra bronquial de pacientes de terapia intensiva por método de Sanger permitirá un pronto inicio de tratamiento antibiótico dirigido al ser una prueba diagnóstica con una baja tasa de error y, por ello, ha sido y es ampliamente utilizada para fines taxonómicos y para el diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas comparado con la determinación de cultivo microbiológico (Gold estándar) por el menor tiempo y menor número de muestras necesarias para reporte de resultados

DISEÑO DE ESTUDIO de prueba diagnóstica, observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

METODOLOGÍA. Se recolectaron las muestras de pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión en el periodo de 25 de septiembre a 30 de octubre de 2021, se enviaron una a departamento de genómica y otra a departamento de bacteriología, una vez obtenido el reporte de resultados se compararon en cuanto a tiempo y total de muestras requeridas para obtener el aislamiento bacteriano y la prontitud de respuesta de servicio de infectología para la autorización de tratamiento antibiótico dirigido a los aislamientos reportados, se realizó el análisis estadístico utilizando el software SPSS, la descripción demográfica de los pacientes se realizó a través de medidas de tendencia central, se realizaron pruebas de t de student y correlación de resultados se determinaron medidas de tendencia central.

PALABRAS CLAVE: microbiología clínica, secuenciación de ADN, método Sanger, infección

COMPARACION ENTRE DETERMINACION GENOMICA Y CULTIVO MICROBIOLOGICO PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DE NEUMONIA ASOCIADO A VENTILACION MECANICA.

ANTECEDENTES.

De forma general, el genoma es el conjunto de material genético hereditario que posee un organismo vivo y que determina su capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales y nutricionales ²⁶.

El genoma bacteriano se refiere al conjunto total de genes que posee una bacteria y comprende tanto su cromosoma como todos los elementos genéticos extracromosómicos en caso de poseer alguno.²⁶ El cromosoma bacteriano contiene toda la información genética esencial para la vida de la bacteria y está formado por una única molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena y circular, cerrando por enlace covalente.²⁷ Por su parte, el ADN extracromosómico comprende el ADN plasmídico, también circular y cerrado, y los bacteriófagos (virus bacterianos). Académicamente, el genoma bacteriano puede diferenciarse en el denominado genoma core y el denominado genoma accesorio, haciendo referencia el genoma core al conjunto de genes presentes en todos los individuos de una especie bacteriana concreta y el genoma accesorio al conjunto de genes variables entre miembros de una misma especie.²⁷

En los últimos años, el constante desarrollo y la continua mejora de los métodos de secuenciación del ADN ha permitido que la obtención de la secuencia del genoma completo sea accesible en la rutina de los servicios de Microbiología clínica, introduciendo así un nuevo paradigma en el diagnóstico microbiológico. Este nuevo paradigma implica el manejo de una gran cantidad de información, cuya gestión y análisis demanda inexorablemente el uso de herramientas bioinformáticas lo cual no debería ser un obstáculo para su implementación en los servicios de microbiología clínica ya que en los últimos años se han desarrollado aplicaciones web y/o interfaces que permiten una fácil utilización de muchas de estas herramientas sin la necesidad de requerir grandes conocimientos en lenguajes de programación.²⁶

Una de las principales ventajas de la secuenciación masiva es su universalidad, siendo de las principales ventajas de la secuenciación masiva es su universalidad, siendo posible obtener la secuencia de genoma completo de cualquier especie microbiana.²⁸ En este punto, cabe destacar el crucial papel que esta herramienta está teniendo en la pandemia causada por SARS-COV-2.²⁹ En los primeros días, disponer de estas herramientas permitió identificar el agente causal del brote de neumonía de origen desconocido reportado en la ciudad de Wuhan a finales de 2019 así como obtener rápidamente la secuencia del genoma completo del virus, hecho que permitió el inmediato desarrollo de las herramientas diagnósticas necesarias.³⁰ Posteriormente, la secuenciación de genoma completo se ha perfilado como una herramienta clave en la

monitorización y control de la pandemia. Instando a los gobiernos y organismos de la salud a su incorporación como herramienta para el control y vigilancia de la pandemia.³⁴ Hasta la fecha, y a pesar de su universalidad, el uso de la secuenciación de genoma completo como herramienta de diagnóstico microbiológico se ha enfocado mayoritariamente en el estudio de las especies bacterianas, centrándose por tanto el presente procedimiento exclusivamente en la aplicabilidad de la secuenciación para el estudio de genomas bacterianos y metagenomas. No obstante la secuenciación masiva está adquiriendo también relevancia en otros ámbitos de Microbiología Clínica, especialmente en la virología, incluyendo aspectos epidemiológicos, diagnósticos, detección de resistencias a antivirales.³⁵

La neumonía es la principal causa mundial de sepsis y se ha asociado con una alta morbilidad y altas tasas de mortalidad a corto y largo plazo. Como puede ser causado por un amplio espectro de microorganismos, el diagnóstico microbiano es un desafío y la elección de la terapia adecuada sigue siendo un problema importante. Esta revisión se centra en estudios publicados recientemente sobre pruebas de diagnóstico microbiológico y evaluaciones clínicas para la neumonía, incluida la neumonía adquirida en la comunidad, la neumonía adquirida en el hospital y la neumonía asociada a la ventilación.^{16,17}

La neumonía asociada a ventilador (NAV) se refiere a la inflamación del parénquima pulmonar causada por agentes infecciosos adquiridos específicamente al recibir ventilación mecánica.¹⁷ La NAV es una complicación nosocomial prevenible que potencialmente contribuye a la mortalidad y morbilidad, por lo tanto, se considera una medida clínica y epidemiológicamente importante de la calidad de la atención, contribuye al consumo de recursos adicionales, agregando tiempo y gastos a una estadía en cuidados intensivos, lo que representa una gran proporción de todas las prescripciones de antibióticos. Se considera que NAV es responsable de un costo adicional de aproximadamente 40 000 por episodio en los estados unidos y alrededor de 9000 en el reino unido. La literatura existente informa que la incidencia de NAV varía ampliamente entre 4.0 % y 28.8% de la población de riesgo.¹⁸

A partir del descubrimiento de las estructuras de la molécula de ADN (Watson y Crick 1953), hace poco más de 50 años, se han producido millones de secuencias de especies de arqueas, bacterias y eucariontes. En los inicios de la secuenciación, obtener la secuencia de un fragmento de 5 o 10 nucleótidos resultaba un proceso muy costoso y complicado. Sin embargo, los avances científicos y tecnológicos han permitido tener hoy en día una gran cantidad de secuencias de ADN con información de importancia médica, ecológica, fisiológica y evolutiva. En 1976, Walter Fiers y colaboradores, secuenciaron el genoma completo del bacteriófago Ms2 de aproximadamente unos 3 500 pares de bases (pb).¹⁹ Pero es en 1977 cuando surgen dos técnicas modernas de secuenciación de ADN:

la secuenciación química de Maxam y Gilbert (1977) y el método que revolucionó a la biología molecular, la secuenciación enzimática de Sanger.

En 1982 se crea el Gen Bank a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI), existían más de 2000 secuencias y para principios del 2011 esta base de datos estaba integrada por más de 10 000000 de secuencias. Se cuenta con 1548 secuencias de bacterias, 83 arqueas, 821 eucariontes, 281 genomas. En 1995 se secuenció el primer genoma completo de un organismo, de la bacteria oportunista *Haemophilus influenzae*.

¹⁹

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, se ha hecho necesaria la optimización de la especificidad, sensibilidad y rapidez de técnicas de diagnóstico tradicional; sin embargo, con el auge de la investigación y la necesidad de diagnósticos oportunos y eficaces, han surgido técnicas de laboratorio con fundamento en biología molecular aplicadas en programas de prevención, control y tratamiento.^{1,3,8}

El principio de la epidemiología molecular radica en el estudio de las enfermedades infecciosas a través del empleo de técnicas moleculares que permitan el estudio del genoma de bacterias, virus, viroides, hongos y parásitos, agentes etiológicos de dichas enfermedades.^{12,13}

Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva.^{5,13}

En microbiología clínica, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado.^{5,8} En la actualidad, la mayor parte de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el aislamiento previo del agente patógeno y se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita mucho tiempo, resulta difícil o, incluso, imposible. En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis de secuenciación enzimática de Sanger del ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.⁷ La técnica suele utilizarse para secuenciar fragmentos individuales de ADN, como plásmidos bacterianos o ADN copiado en la PCR. El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas.³³

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias.^{11,15}

El diagnóstico molecular es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico, mostrando un impacto en las áreas de salud, y

obligado a la implementación de herramientas claves para el equipo clínico que generan un beneficio directo para el paciente.^{4,6,11}

el uso de técnicas moleculares como la secuenciación de nueva generación (NGS), pirosecuencia, técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), permite el estudio de un genoma completo o secuencias específicas de ADN de secuencias largas o cortas con el fin de detectar y analizar secuencias de interés para la investigación en las ciencias agronómicas, forenses, diagnóstico clínico e investigación básica, traslacional y aplicada.⁷ La secuenciación de ADN es el proceso de determinar la secuencia de nucleótidos (As, Ts, Cs y Gs) de un fragmento de ADN.^{12,13,14} En la secuenciación de Sanger, el ADN blanco es copiado para la determinación de la secuencia. La secuenciación de Sanger arroja secuencias de alta calidad para segmentos relativamente largos de ADN (de hasta aproximadamente 900 pares de bases).^{6,12}

La identificación del microorganismo o microorganismos que pueden estar causando una infección es clave para el manejo adecuado del paciente y su ulterior recuperación.³⁵ En este sentido, los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico, directos e indirectos, pueden presentar limitaciones, pudiendo en ocasiones ser demasiado lentos o incluso resultar insuficientes para establecer el diagnóstico etiológico definitivo.³⁵ Para solventar estas limitaciones. Los servicios de Microbiología Clínica han ido paulatinamente incorporando técnicas diagnósticas basadas en la PCR, aunque, al igual que los métodos tradicionales, estos métodos moleculares presentan la desventaja de requerir de una sospecha etiológica que las diferencias de las técnicas de secuenciación masiva.³⁵

La secuenciación dirigida ha sido clásicamente utilizada en Microbiología para la identificación de bacterias y hongos mediante amplificación de regiones universalmente presentes en sus genomas. Así, para la identificación de bacterias se utilizan regiones del gen que codifica la subunidad 16S del ribosoma mientras que para la identificación de hongos se utilizan regiones de ADN espaciador de los genes que codifican las dos subunidades del ribosoma o bien regiones del gen que codifica la subunidad 18S del ribosoma.³² Como se adelantó, la secuenciación Sanger presenta una baja tasa de error y, por ello, ha sido y es ampliamente utilizada para fines taxonómicos y para el diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas.³³

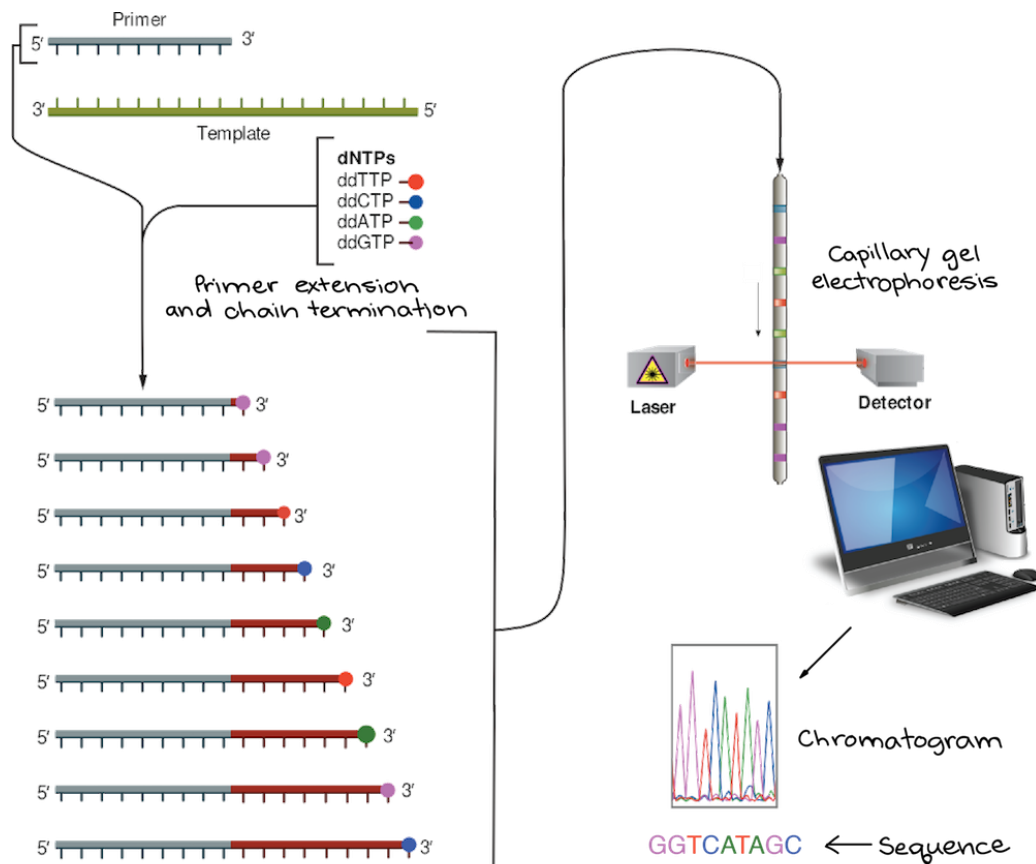


Imagen modificada de "Secuenciación de Sanger", de Estevezj (CC BY-SA 3.0). La imagen modificada se encuentra bajo una licencia (CC BY-SA 3.0)

Las infecciones son muy frecuentes en los pacientes que se encuentran ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI)^{1,2,8} Las causas más frecuentes de infección adquirida en la comunidad que precisa ingreso en la UCI son las infecciones respiratorias, infecciones urinarias y las infecciones del sistema nervioso central.^{3,8} En el paciente crítico se añaden factores, haciéndolos especialmente vulnerables a las infecciones por lo cual la microbiología clínica, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado. Por lo que se hace necesario implementar técnicas de detección de microorganismos responsables del proceso infeccioso, tomando en cuenta la experiencia en el servicio de terapia intensiva del Hospital General de México en la cual se ha requerido al toma de múltiples tomas de muestra bronquial para obtener el reporte de aislamiento por medio de cultivo microbiológico, lo que aumenta costos en cuanto a recursos materiales y personal, además de contribuir al retraso de administración de tratamiento específico lo que aumenta los días de estancia en el servicio aumentando los gastos día cama de cada paciente, razón por la que se propone la determinación genómica de bacterias por medio de la secuenciación enzimática de Sanger en la cual se sugiere se obtendrán resultados con la toma de una sola muestra y en menor tiempo.

En los últimos años se han realizado importantes avances en los métodos de diagnóstico para la detección de patógenos respiratorios. Se han diseñado plataformas de diagnóstico molecular capaces de identificar múltiples patógenos en la misma muestra. Estas plataformas se han consolidado como una opción de diagnóstico adicional y han demostrado su superioridad a los métodos de diagnóstico convencionales. El diagnóstico molecular de neumonía, incluida la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), la neumonía adquirida en el hospital (HAP) y la neumonía asociada al ventilador (NAV), debe detectar patógenos y sus patrones de resistencia de forma precisa y rápida para poder orientar la terapia antibiótica inicial. El principal inconveniente del diagnóstico de NAC convencional es el tiempo que se tarda en identificar y determinar la susceptibilidad antibiótica de los microorganismos causantes de la neumonía, ya que los resultados definitivos solo pueden estar disponibles entre las 24 y las 72 h. Además, el tipo de muestra y su calidad son muy importantes para un diagnóstico microbiológico preciso.^{16,17}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha identificado retraso en el tratamiento antibiótico dirigido en pacientes de terapia intensiva por el retardo en la identificación y reporte del departamento de bacteriología en diferentes muestras pero sobre todo en la determinación de agentes en cultivo bronquial haciendo necesario la toma de múltiples muestras para poder obtener una determinación específica, lo que condiciona aumento de costos en recursos de laboratorio y de recursos materiales para la toma de muestras así como aumento de días de estancia en terapia intensiva y con ello el aumento de mortalidad ya que se inician tratamientos empíricos que en ocasiones no condicionan mejoría del estado clínico del paciente incluso teniendo progresión del proceso infeccioso a choque séptico por lo que se considera de suma importancia el reconocimiento oportuno de los agentes causantes de los procesos infecciosos motivo por el cual se realizó secuenciación de ADN en muestra bronquial de pacientes mediante ventilación mecánica en el departamento de genómica del hospital general de México para determinar su superioridad diagnóstica y con esto ahorro de recursos así como disminución de mortalidad y de días estancia de en terapia intensiva ante la identificación en menor tiempo y en menor número de muestras comparado con la determinación en cultivo microbiológico en laboratorio central.

JUSTIFICACION.

Se planteo la realización de esta proyecto debido a que se detectó en el servicio de terapia intensiva la necesidad de toma de múltiples muestras bronquiales para poder obtener la determinación por medio de cultivo microbiológico del agente bacteriano en muestra bronquial de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica, lo cual conlleva a un retraso en brindar el tratamiento antibiótico específico por parte del servicio de infectología permitiendo el deterioro clínico del paciente con el consiguiente aumento de la mortalidad, además de aumento en resistencia bacteriana por

administración de tratamientos empíricos con antimicrobianos de amplio espectro, por lo que se propuso este protocolo de estudio para conocer si mediante la determinación genómica de aislamiento bacteriano se acortan los tiempos de obtención de la identificación bacteriana con lo cual se pretende obtener un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno contribuir a la disminución de la mortalidad de los paciente, así como para disminuir gastos en los recursos para la toma de las muestras requeridas ya que actualmente han sido necesaria la toma de hasta 3 a 4 muestras por paciente para poder obtener un aislamiento mediante el cultivo microbiológico.

HIPOTESIS.

H1. La determinación de secuenciación de ADN microbiológico en muestra bronquial de pacientes de terapia intensiva por método de Sanger permitirá un pronto inicio de tratamiento antibiótico dirigido al ser una prueba diagnóstica con una baja tasa de error y, por ello, ha sido y es ampliamente utilizada para fines taxonómicos y para el diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas comparado con la determinación de cultivo microbiológico (Gold estándar) por el menor tiempo y menor número de muestras necesarias para reporte de resultados.

H0. La determinación de secuenciación de ADN microbiológico en muestra bronquial de pacientes de terapia intensiva por método de Sanger no permitirá un pronto inicio de tratamiento antibiótico dirigido al ser una prueba diagnóstica con una baja tasa de error, sin embargo, al no contar con el reporte de antibiograma comparado con la determinación de cultivo microbiológico (Gold estándar) para la especificación de resistencias bacterianas.

OBJETIVO GENERAL.

Conocer la especificidad de la determinación genómica vs cultivo microbiológico para la detección de agentes bacterianos en muestra bronquial para establecer tratamiento oportuno dirigido y de esta manera contribuir a la disminución de la mortalidad en pacientes con neumonía.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Caracterizar la epidemiología de neumonía en el servicio de terapia intensiva

Determinar tiempo de reporte de resultados por el departamento de genómica y el servicio de bacteriología.

Demostrar la asociación de mortalidad en cuanto al tiempo de reporte de resultado de cultivo microbiológico

Identificar proceso final y conocer el tiempo de reacción de servicio de infectología ante el reporte de resultados por el servicio de genómica.

Determinar si existe mala técnica de la toma de muestra en el servicio de acuerdo a la cantidad de resultados reportados como contaminados por el servicio de bacteriología comparado con los resultados reportados por genómica en muestra tomadas pareadas.

Contabilizar días de estancia asociados a retardo de reporte de resultados de aislamientos.

METODOLOGIA.

TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO.

DE PRUEBA DIAGNOSTICA, OBSERVACIONAL, DESCRIPTIVO, TRANSVERSAL, PROSPECTIVO.

POBLACION.

Se incluyeron muestras de pacientes que ingresaron al servicio de terapia intensiva del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo comprendido de 25 de septiembre de 2021- 30 de octubre de 2021 que cumplieran con los criterios de inclusión.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

No se realizó cálculo matemático para la selección de la muestra, se realizó técnica de muestreo no probabilístico a conveniencia, considerando a todos los pacientes que fueron ingresados en el servicio de terapia intensiva del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, en el periodo comprendido entre 25 de septiembre 2021 a 30 de octubre de 2021, con el diagnóstico de Sepsis o desarrollen sepsis por neumonía asociada a ventilación mecánica en el transcurso de su estancia, que reúnan todos los criterios de inclusión.

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

CRITERIOS DE INCLUSION.

- Pacientes mayores de 18 años.
- Ingreso a terapia intensiva con al menos un diagnóstico de ingreso de infección clínicamente sospechada o documentada.
- Pacientes que desarrollen datos clínicos y bioquímicos de proceso infeccioso durante su estancia en el servicio de terapia intensiva.
- Pacientes que ingresen con ventilación mecánica invasiva
- Pacientes que requieran ventilación mecánica invasiva en el transcurso de su estancia.
- Que cuenten con registro de toma de muestra bronquial con reporte de muestra contaminada, muestra no valorable, o reporte de 1 gram-, 2 gram +.

- Que cuenten con registro de muestra recibida en el departamento de genómica
- Pacientes que ingresen en el periodo establecido de recolección de datos.
- Pacientes que cuenten con firma de consentimiento informado

CRITERIOS DE EXCLUSION.

- Pacientes que ingresen sin requerimiento de ventilación mecánica

CRITERIOS DE ELIMINACION.

- Pacientes que no cuenten con registro de muestra bronquial en laboratorio central
- Pacientes que no cuenten con registro de muestra bronquial en departamento de genómica

DEFINICION DE VARIABLES.

variable	Definición conceptual	Unidad de medición	Tipo de variable	Codificación
ID (ID)	Identificador único de cada paciente	La base de datos se mantendrá anonimizada. La única relación del número de identificación con datos como nombre o expediente de paciente se tendrá en resguardo solo por el investigador principal	Categórica nominal	No aplica
Días de estancia intrahospitalaria.	Número de días que suceden entre el ingreso a Urgencias y el traslado a pabellón con criterios de resolución.	días	Cuantitativa discontinua	numérico

edad	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento	años	cuantitativa	numérico
Genero	Fenotipo masculino o fenotipo femenino	Masculino/femenino	Cualitativa Dicotómica	0= masculino 1=femenino
Sitio de infección	Sitio primario del foco infeccioso al que se atribuye principalmente la hospitalización actual	No aplica	Categórica nominal (pulmonar / urinario/ abdominal / tejidos blandos / otros)	
Neumonía asociada a ventilación mecánica	Complicación pulmonar que se desarrolla después de 48 a 72 horas de la intubación endotraqueal, en pacientes sometidos a ventilación mecánica.	SI/NO	Cualitativa dicotomica	0= si 1= no
Muestra bronquial	Secreción que se obtiene de la aspiración de vías respiratorias	No aplica	Cuantitativa dicotomica	0=si 1=no
Aislamiento genoma bacteriano	Conjunto total de genes que posee una bacteria y comprende tanto su cromosoma como todos los elementos genéticos extracromosómicos	Reporte de bacterias	cuantitativa	0= sin reporte de bacterias 1= con reporte de bacterias
Aislamiento bacteriano microbiológico	Es la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan. El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de petri	Reporte de bacterias	cuantitativa	0= sin reporte de bacterias 1=con reporte de bacterias

PROCEDIMIENTO.

Para la recolección de datos se incluyeron los pacientes que ingresaron en el servicio de terapia intensiva en el periodo de 25 de septiembre de 2021- 30 de octubre de 2021 que cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales se obtuvieron dos muestras bronquiales por el personal de servicio de inhaloterapia de las cuales una se etiquetó mediante solicitud de laboratorio para su envío al área de bacteriología para el cultivo microbiológico, la segunda muestra se etiquetó y se transportó en una hielera con frío (sin especificarse temperatura) al departamento de genómica y se registró en una hoja de recepción y entrega de muestra en la cual a su recepción se chequeó la temperatura y se anotó en la hoja de registro de la muestra junto con los datos del personal quien recibe, la hora y fecha, posteriormente se inició el proceso de preparación de la muestra para la secuenciación de ADN con técnica de Sanger en la cual se obtuvo el fragmento que se deseaba secuenciar, el fragmento de ADN que se secuenció dependió completamente del objetivo del estudio, se pudo obtener mediante PCR o por clonación en algún vector, posteriormente se purificó el fragmento secuenciado, se cuantificó el fragmento en un espectrómetro para asegurarse de tener la cantidad necesaria para la reacción (5 a 10 nanogramos por cada 100 pb), se preparó la reacción de secuenciación con 2 microlitros de tinta, 2 microlitros de buffer, la cantidad de fragmento secuenciado determinado, 1 microlitro del iniciador y se completó la reacción a 10 microlitros con agua bidestilada esterilizada o inyectable, se colocaron los microtubos en la termocicladora, se purificó el producto de PCR, se centrifugó la columna en una microcentrífuga a 730 xg por dos minutos, se secó la muestra en un concentrador al vacío o dejando destapado los tubos en un lugar completamente oscuro hasta que no quedo nada de agua, una vez que estuvieron secas se almacenaron envueltas en papel aluminio a 4 °C, se desnaturizó con formamida, se centrifugó por 5 minutos a 13 000 rpm, se capturaron los datos de la muestra en el programa 3100 Data collection posteriormente, se inició con la electroforesis y posteriormente con el análisis de los resultados, se obtuvo la secuencia consenso al comparar el sentido Forward (5'-3') y el sentido reverse (3'-5'). Este paso es muy importante por que las polimerasas tienen diferentes porcentajes de fidelidad o en ocasiones existen problemas en la electroforesis de secuenciación y esto nos puede generar falsos polimorfismos. También es útil el consenso cuando el fragmento que se está analizando es mayor de 700 pb debido a que permite obtener un tamaño mayor de secuencia al complementar ambas cadenas. Una vez obtenida la secuencia de interés, independientemente del objetivo, es indispensable comparar con las secuencias disponibles en las diferentes bases de datos ubicadas en internet. Este tipo de análisis se puede llevar a cabo mediante programas de cómputo, los cuales usan distintos algoritmos de búsqueda, siendo el más usado el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) de esta manera se verificará si se logró secuenciar el fragmento que se esperaba. Una vez enviadas las muestras se mantuvo en espera de resultados para la posterior comparación de los mismos, se evaluó el tiempo en el cual se reportaron los aislamientos y el número de muestras necesarias para el reporte de resultados, así como el tiempo de respuesta del servicio de infectología para la autorización de tratamiento antibiótico dirigido al aislamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La descripción demográfica de los pacientes se realizará a través de medidas de tendencia central, se realizará prueba de t de student y correlación de resultados y prueba diagnóstica con chi cuadrada de hosmer lemeshow y curva receptor operativo comparando Gold Standar “cultivos bacteriológicos” vs determinación genómica de bacterias y tablas de contingencia.

Se utilizará el software SPSS versión 23.0 (IBM Co) 2015. Se asegurará una confianza del 95%.

ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD.

El presente protocolo se desarrollo dando cumplimiento estricto a la Ley General de Salud y su reglamento en Materia de Investigación, a las Guías de la Conferencia Internacional de Armonización sobre Buenas Prácticas y a la NOM-012- SSA3-2012. Asimismo, se respetarán invariablemente los principios plasmados en la Declaración de Helsinki y en el Código de Nuremberg. Se garantizará en todo momento el máximo bienestar para los pacientes por encima de cualquier objetivo de la investigación, se protegerá la vida, la salud, la dignidad, la integridad, la intimidad y la confidencialidad de la información desarrollada durante la investigación.

Consentimiento informado. la toma de muestras son actividades propias a la atención proporcionada en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes hospitalizados en el servicio de terapia intensiva del hospital general de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Sin embargo, se otorgará un consentimiento informado para la toma de las mismas y para la inclusión al proyecto de investigación.

RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS.

Con los resultados se podrá determinar si existen superioridad en cuanto a ahorro de recursos mediante la secuenciación de ADN en muestra bronquial vs cultivo microbiológico por la cantidad de muestras que en ocasiones se deben tomar y procesar para poder obtener un resultado del servicio de bacteriología , con lo que se pretende reducir el tiempo de estancia en el servicio de terapia, además valorar el impactando en la morbilidad del paciente, así como generar nuevos protocolos de tratamiento.

RECURSOS DISPONIBLES.

Personal de inhaloterapia.

Personal de área de bacteriología.

Personal de departamento de genómica

Médicos residentes para transportar las muestras

Material para la toma de muestras

Material para el transporte de muestras

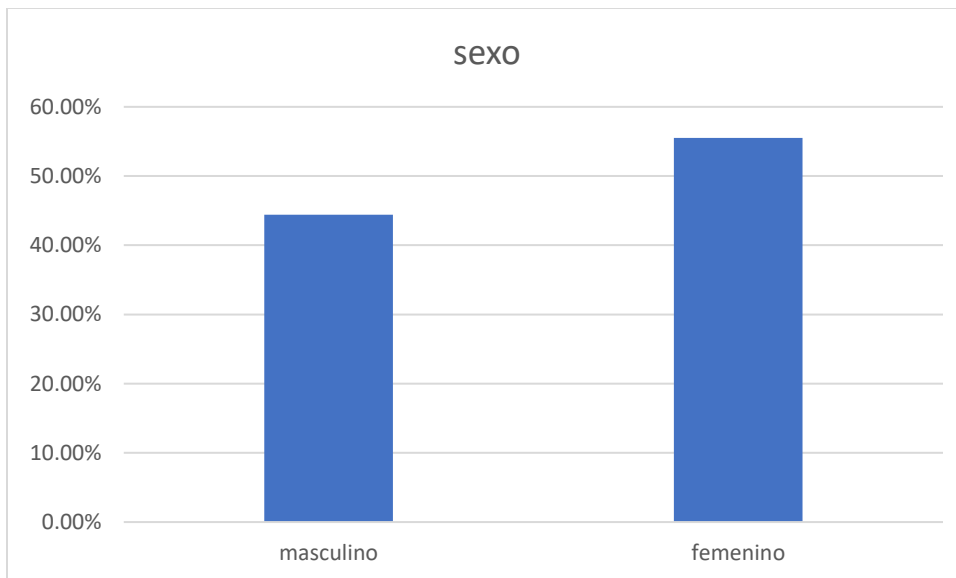
Papelería para las hojas de registro de muestras

Etiquetas para la identificación de muestras para envío a área de bacteriología

RESULTADOS

En el periodo de 1 mes comprendido entre el 25/09/2021 al 30/10/2021 se recibieron 20 pacientes con diagnósticos de neumonía asociada a ventilación mecánica lo cual representa el 14.1% de los ingresos a terapia intensiva (IC95% 1.10, 1.79). 18 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión. Dos pacientes más fueron excluidos debido a que no se tienen muestras registradas. Se estudiaron los 18 pacientes restantes, cuyas características demográficas se muestran en la gráfica 1, la población es homogénea con un porcentaje de pacientes masculinos de 55.5 %%, femenino de 44.5 % , con una media de edad de 46.8 años .

Grafica 1. Características demográficas de la población.



Las mediciones somatométricas se realizan en todos los pacientes que son hospitalizados en el servicio de terapia intensiva, el peso promedio encontrado fue de 85 kg, con rango intercuartílico de 88.75, la talla promedio fue de 1.75 con rango intercuartílico de 1.67- 1.75 m, la mediana del índice de masa corporal se encontró en 27.7, con respecto a la tensión arterial sistólica esta se encontró con mediana de 68.7, con desviación estándar correspondiente a 5.54, en cuanto a la frecuencia cardiaca la mediana fue de 22.4, con desviación estándar 0.86, la saturación de oxígeno por oximetría de pulso fue de 93.4% con desviación estándar de 3.6. (tabla 1)

Tabla 1. Mediciones somatometricas.

MEDICIONES SOMATOMÉTRICAS	
Peso – kg, mediana (RIQ)	85 (85, 88.75)
Talla – m, mediana (RIQ)	1.75 (1.675, 1.75)
IMC – kg/m², mediana (RIQ)	27.75 (26.6, 30.6)
Presión arterial sistólica – mmHg, media (DE)	113 .75 (14.08)
Presión arterial diastólica – mmHg, media (DE)	68.75 (3.54)
Frecuencia cardiaca – min-1, media (DE)	104.0 (17.9)
Frecuencia respiratoria – min-1, media (DE)	22.4 (3.0)
Temperatura – °C, media (DE)	36.95 (0.86)
Saturación por pulsooximetría – %, media (DE)	93.4 (3.6)

A todos los pacientes a su ingreso al área de terapia intensiva se les realiza toma de estudios de laboratorio entre estos se incluye la biometría hemática, química sanguínea, dentro de los hallazgos encontrados en las muestras de estudio son : la determinación media de leucocitos fue de 13.3, con desviación estándar de 2.5, los valores medios de neutrófilos son reportados en 10.6 con desviación estándar de 2.5 en cuanto al recuento al linfocitos la media fue de 1.6, con mediana de 0.9, el conteo de monocitos es encontrado en 1, con desviación estándar de 0.3, los valores de hematocrito medidos se reportaron con media de 42.9 , con desviación estándar de 8.5, los valores de hemoglobina se reportaron con media de 15.8 con desviación estándar de 2.3.(tabla 2).

Tabla 2. Medidas de celularidad.

Medidas de celularidad	
Glucosa capilar – mg/dL, media (DE)	115.6 (47.1)
Leucocitos – células/uL, media (DE)	13.3 (2.5)
Neutrófilos – células/uL, media (DE)	10.6 (2.5)
Linfocitos – células/uL, media (DE)	1.6 (0.9)
Monocitos – células/uL, media (DE)	1 (0.4)
Eosinófilos – células/uL, media (DE)	0.1 (0.3)
Hemoglobina – g/dL, media (DE)	15.8 (2.3)
Hematócrito – %, media (DE)	42.9 (8.5)
VCM – fL, media (DE)	91.9 (3.6)
HCM – pg, media (DE)	30.9 (0.8)
CMHC – pg, media (DE)	33.6 (0.9)
Ancho de distribución eritrocitaria – %, media (DE)	13.6 (0.9)

La siguiente tabla evidencia el resto de hallazgos encontrados en las mediciones de laboratorio que se realizaron a los pacientes ingresados al protocolo de estudio con el diagnóstico de sepsis por neumonía asociada a ventilación mecánica, se encontró la glucosa con media de 123mg/dl con desviación estándar de 48.9, la medición de urea fue con media de 38.4 con desviación estándar de 11.2, en cuanto a los valores de creatinina se encontró una media de 1, con desviación estándar de 0.4, la mediana obtenida de ácido úrico fue de 6.1, con desviación estándar de 1.3, la mediana de los valores de colesterol en sangre fue de 152 con una mediana de 155 con desviación estándar de 71.8, se midieron las bilirrubinas indirectas con media de 1.7 con desviación estándar de 1.5 en cuanto a la bilirrubina directa al mediana fue de 2.1 con desviación estándar de 2.8, los valores de albumina se encontraron en 3.9, con desviación estándar de 0.7, también se realizó mediciones de transaminasas encontrando alanina aminotransferasa con media de 151 con desviación estándar de 237, los valores de fosfatasa alcalina medios fueron de 144.5 con desviación estándar de 64, en cuanto a gamma glutamil transferasa la media fue de 429 con desviación estándar de 369, los niveles séricos de deshidrogenasa láctica se reportaron con media de 241, con desviación estándar 714. (Tabla 3).

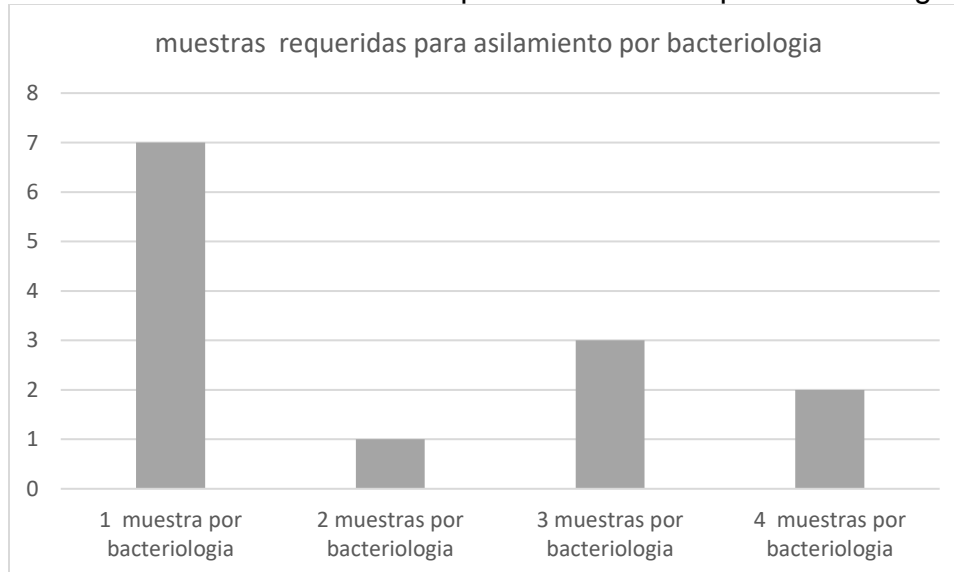
Tabla 3. Resultados de laboratorio.

medidas de laboratorio	
Glucosa (mg/dL) , media (DE)	123 (48.9)
Urea (mg/dL) , media (DE)	38.4 (11.2)
Creatinina (mg/dL) , media (DE)	1 (0.4)
Ácido úrico (mg/dL) , media (DE)	6.1 (1.3)
Colesterol (mg/dL) , media (DE)	152 (39.1)
Triglicéridos (mg/dL) , media (DE)	155.6 (71.8)
Colesterol-HDL (mg/dL) , media (DE)	32.4 (24.9)
Colesterol-LDL (mg/dL) , media (DE)	100 (39.6)
Bilirrubina directa (mg/dL) , media (DE)	2.1 (2.8)
Bilirrubina indirecta (mg/dL) , media (DE)	1.7 (1.5)
Proteínas totales (g/dL) , media (DE)	6.5 (0.5)
Globulinas (g/dL) , media (DE)	2.7 (0.3)
Albúmina (g/dL) , media (DE)	3.9 (0.7)

ALT (U/L) , media (DE)	151.6 (237)
AST (U/L) , media (DE)	102.9 (127.2)
FA (U/L) , media (DE)	144.5 (64)
GGT (U/L) , media (DE)	429.6 (369)
DHL (U/L) , media (DE)	241.8 (73.1)
Amilasa (U/L) , media (DE)	788.5 (714.7)
Lipasa (U/L) , media (DE)	1393.5 (1245.4)
Sodio (mEq/L) , media (DE)	135.5 (3.2)
Potasio (mEq/L) , media (DE)	4 (0.3)
Cloro (mEq/L) , media (DE)	101.9 (4.5)
Calcio (mg/dL) , media (DE)	9.1 (0.7)
Fósforo (mg/dL) , media (DE)	3.3 (0.7)
Magnesio (mg/dL) , media (DE)	2 (0.2)
Tiempo de protrombina (s) , media (DE)	12.3 (0.8)
INR, media (DE)	1 (0.1)
Tiempo de tromboplastina activada (s) , media (DE)	26.1 (2.8)
Fibrinógeno, media (DE)	331.1 (218.7)

Las muestras requeridas para obtener un aislamiento en muestra bronquial por el servicio de bacteriología mediante cultivo microbiológico fue de la siguiente manera en 7 pacientes se requirió la toma de una sola muestra, 1 paciente requirió la toma dos muestras, 3 pacientes requirieron la toma de 3 muestras, 2 pacientes requirieron la toma de 4 muestras (grafica 2).

Grafica 2. Muestras necesarias para aislamientos por bacteriología.



Las muestras necesarias para la detección de microorganismos por secuenciación genómica de ADN mediante técnica de Sanger requirió la toma de una sola muestra (grafica 3) con la cual se reportó la detección de pseudomonas aeruginosa en 4 pacientes don un porcentaje de 22.2 %, stenotrophomonas maltophila en 3 pacientes con porcentaje de 16.6 %, enterococcus faecalis en 3 pacientes con un porcentaje de 16.6 %, E. coli en 2 pacientes con un porcentaje de 11.1%, acinetobacter baumannii en 2 pacientes con porcentaje de 11.1 %, klebsiella pneumonie en 2 pacientes con porcentaje de 11.1 %, enterobacter en 1 paciente con porcentaje de 5.5% (grafica 4).

Grafica 3. Muestras por genómica.

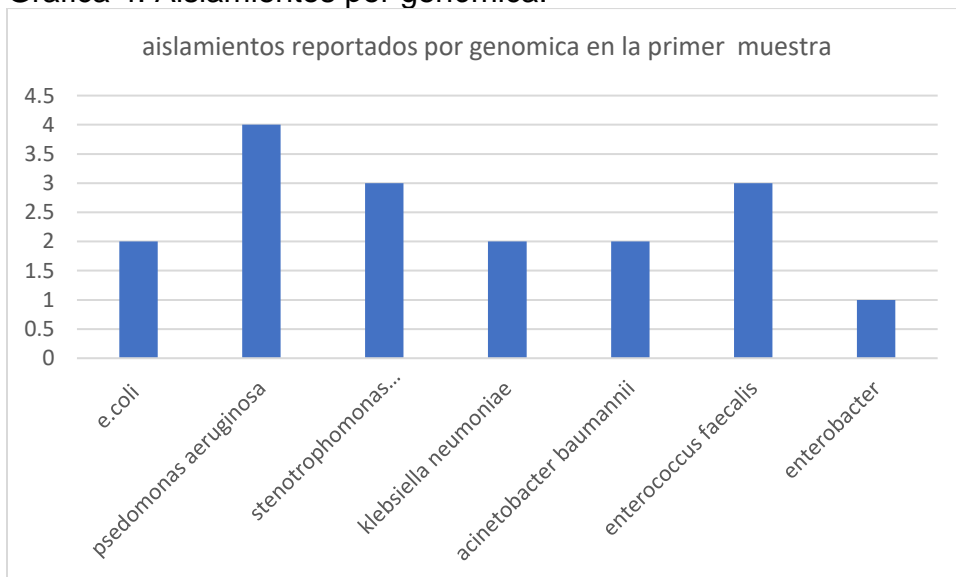


Estadísticas para una muestra				
	N	Media	Desviación tp	Error tp de la media
MUESTRA GENOMICA	10	1.00	.000*	.000
ASILEAMIENTO	10	1.40	.516	.163
MUESTRA BACTERIOLOGICA	10	3.20	1.317	.416

* N° no puede calcularse T porque la desviación típica es 0.

Prueba para una muestra						
	Valor de prueba t 0				95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	t	df	Sig. (Bilateral)	Diferencia de medias	inferior	superior
ASILEAMIENTO	8.973	9	.000	1.400	1.03	1.77
MUESTRA BACTERIOLOGICA	7.888	9	.000	3.200	2.38	4.14

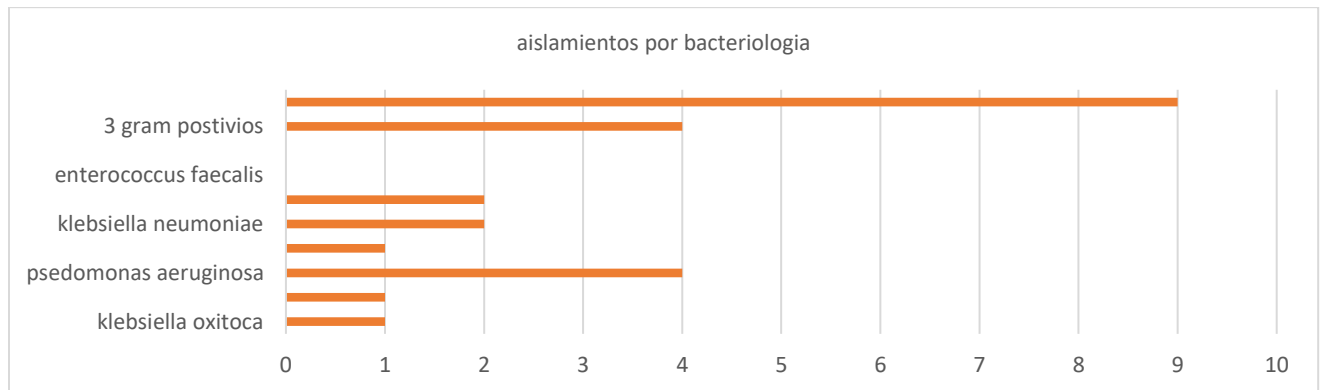
Grafica 4. Aislamientos por genómica.



En los aislamientos reportados por bacteriología mediante cultivo microbiológico fueron los siguientes predominando el reporte de 3 gram negativos diferentes en un porcentaje

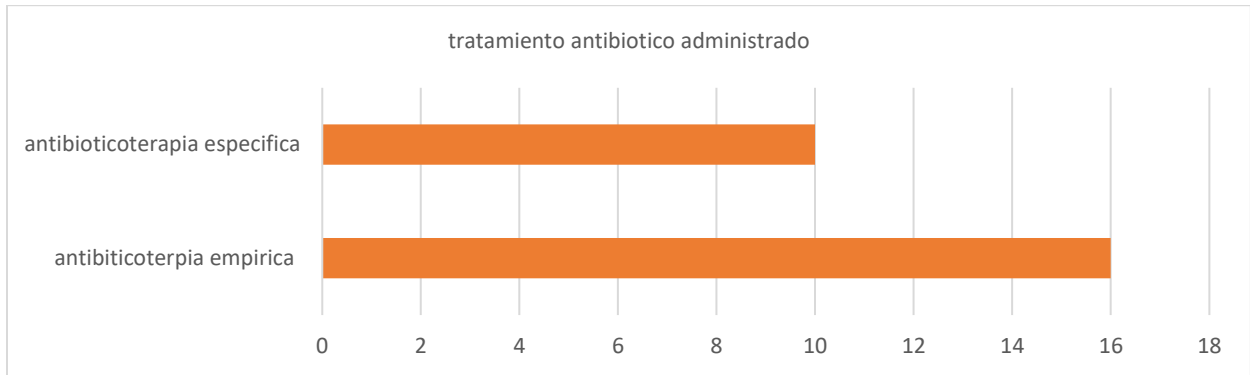
de 37.5% requiriendo la toma de más muestras para obtener el aislamiento, se reportó el aislamiento de 3 gram positivos en el 16.6 % del total de las muestras, se aisló pseudomonas aeruginosa en el 16.6%, acinetobacter baumannii en el 8.3%, klebsilla pneumonioe en el 8.3%, E. coli en el 4.1 %, klebsiella oxytoca en el 4.1 %, stenotrophomonas maltophila en el 4.1 %, no se reportó aislamiento de enterococcus faecalis ni de enterobacter (grafica 5).

Grafica 5. Aislamientos por bacteriología.

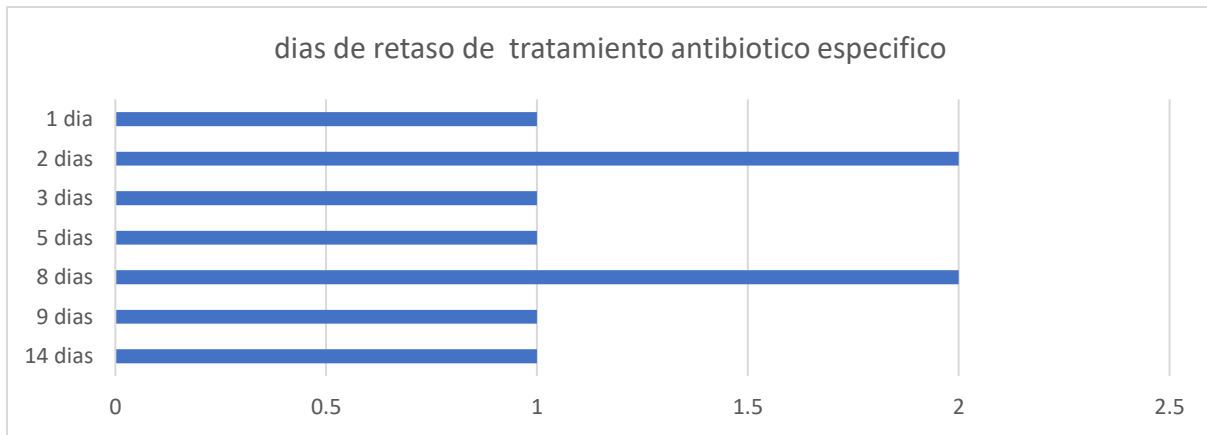


Los pacientes recibieron tratamiento antibiótico empírico en un porcentaje de 88.8% lo que corresponde a 16 pacientes, una vez obtenidos los aislamientos reportados por el servicio de bacteriología se administro antibioticoterapia especifica en un 55.5 % (grafica 6) debido a que en algunas muestras de pacientes procesadas por bacteriología no se logro el aislamiento de algún agente bacteriano comparado con los reportes de genómica en los cuales a pesar de haberse reportado el aislamiento el servicio de infectología no otorgo el tratamiento específico por la falta de reporte de antibiograma para la consulta de farmacoresistencia de los agentes bacteriológicos, en algunos pacientes se retraso el inicio de tratamiento específico por el mismo motivo se mantuvo a la espera de reporte del aislamiento y su antibiograma por el servicio de bacteriología, se reporta retraso de hasta 14 días de inicio de tratamiento específico en 1 paciente que corresponde al 10% de los pacientes que recibieron el antibiotico específico, 9 días en 1 paciente que corresponde al 10%, 8 días en dos pacientes que corresponde al 20%, 5 días en 1 paciente que corresponde al 10%, 3 días en 1 paciente que corresponde al 10%, 2 días en 2 pacientes que corresponde la 20% , 1 día en 1 paciente que corresponde al 10% (grafica 7).

Grafica 6. Antibioticoterapia administrada.

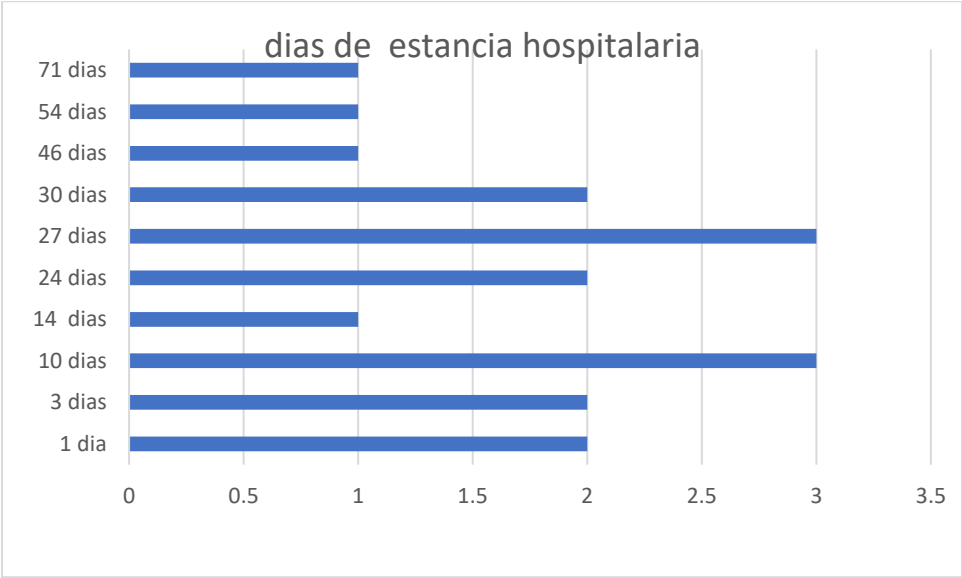


Grafica 7. Días de retraso de tratamiento.

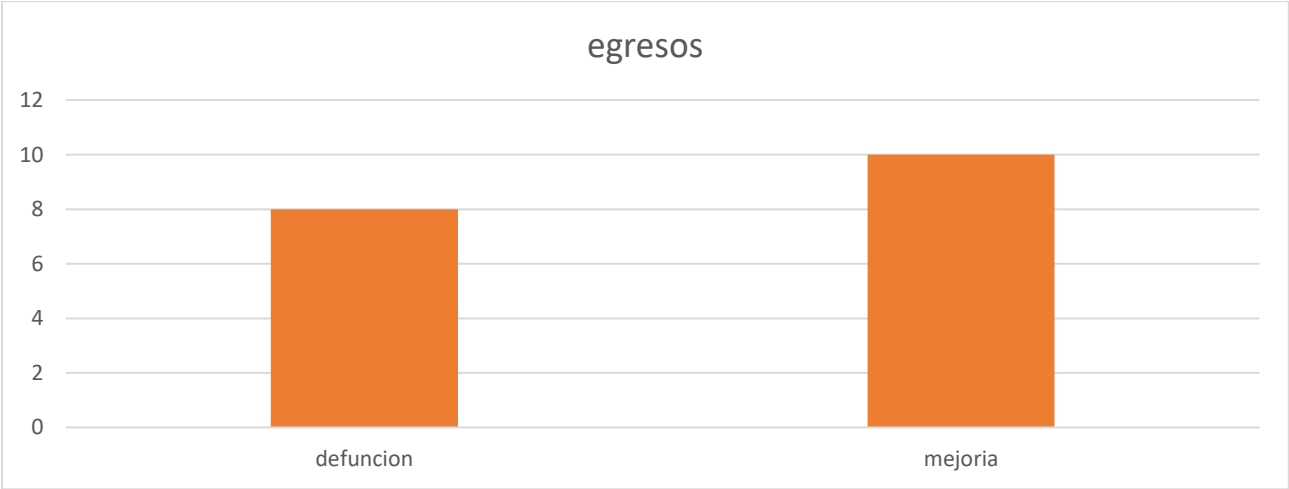


Los días de estancia en la unidad de cuidados intensivos fueron desde 71 días correspondiente al 5.5 % del total de los pacientes incluidos en el estudio, 54 días para el 5.5%, 46 días para 5.5 %, 30 días para 11.1 %, 27 días para 16.6 %, 24 días para 11.1%, 14 días para 5.5 %, 10 días para 16.6 %, 3 días para 11.1 %, 1 día para 11.1% (grafica 8) de los cuales los egresos reportados por mejoría fueron de 55.5 % de un total de 10 pacientes y egresos por defunción en un porcentaje de 45.5 % con un total de 45.5% (grafica 9 y 10)

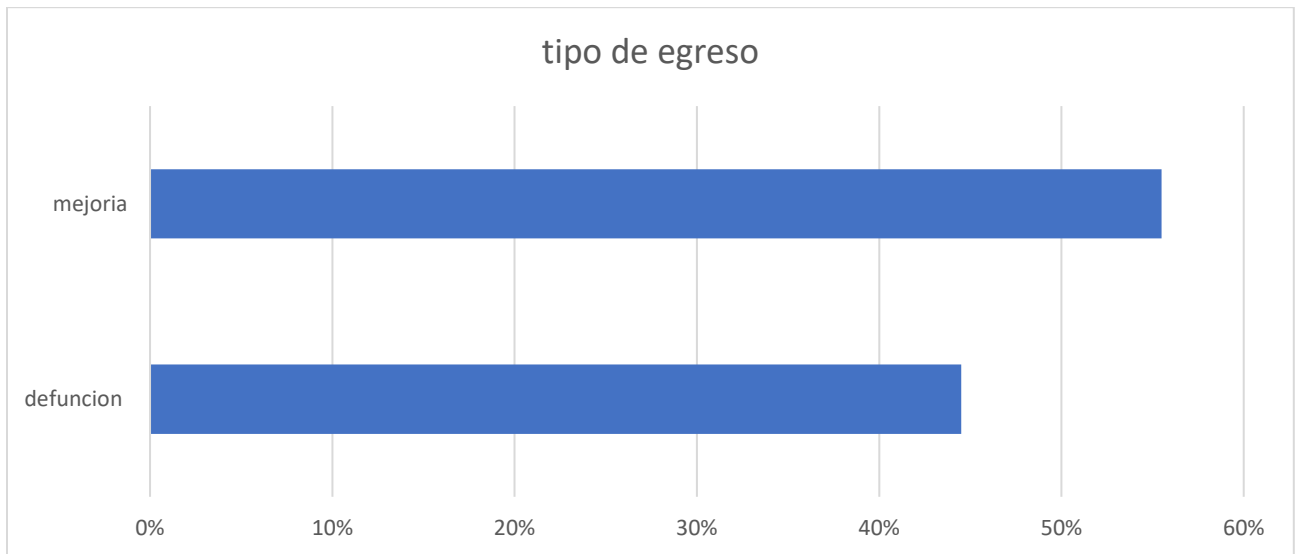
Grafica 8. Estancia hospitalaria.



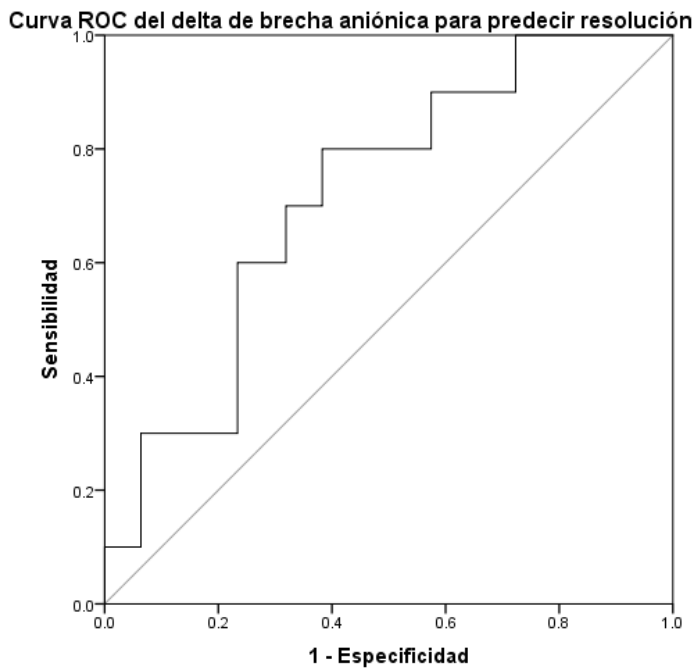
Grafica 9. Tipo de egreso.



Grafica 10. Porcentaje de egresos.



Se realizó una curva ROC para evaluar el desempeño diagnóstico de la muestra procesada por genómica encontrándose que su área bajo la curva es de 0.717 (IC 95%: 0.557 , 0.877; $p = 0.032$). Se encontró que la mayor precisión para reporte de detección de agentes bacteriológicos es de -6.2 (sensibilidad 80%, especificidad 92%). La curva ROC se muestra en la figura 1.



DISCUSIÓN

Se encontró en nuestro estudio que en el servicio de terapia intensiva médica del hospital general de México la incidencia de neumonía asociada a ventilación mecánica es de 14.1% de los ingresos a terapia intensiva (IC95% 1.10, 1.79) sin embargo también encontramos que hubo un error de diagnóstico en un porcentaje de los pacientes por lo cual reduce la incidencia del diagnóstico en nuestro hospital a 13.1% (IC95% 1.01, 1.68, es preciso contar con los criterios específicos establecidos ya en la guías internacionales para el diagnóstico de neumonía asociada a ventilación mecánica para no incurrir en el error de diagnóstico, en nuestro estudio buscamos si la detección por medio de secuenciación de ADN mediante la técnica de Sanger brinda un reporte más oportuno en cuanto a la detección de agentes bacteriológicos en muestra bronquial de pacientes con diagnóstico de neumonía asociada a ventilación mecánica, encontrándose que su área bajo la curva es de 0.717 (IC 95%: 0.557, 0.877; $p = 0.032$). Se encontró que la mayor precisión para reporte de detección de agentes bacteriológicos es de 0.62 (sensibilidad 80%, especificidad 92%). sin embargo no contamos con bibliografía para comparar nuestros resultados puesto que no se encontró en la literatura estudios realizados que comparen la especificidad y sensibilidad de la secuenciación de ADN con el Gold estándar (cultivo microbiológico), consideramos que en el futuro se deberán realizar estudios con mayor muestra de población para determinar la efectividad de los resultados aquí reportados.

CONCLUSIONES.

La neumonía es la principal causa mundial de sepsis y se ha asociado con una alta morbilidad y altas tasas de mortalidad a corto y largo plazo. Como puede ser causado por un amplio espectro de microorganismos, el diagnóstico microbiano es un desafío y la elección de la terapia adecuada sigue siendo un problema importante. Esta revisión se centra en estudios publicados recientemente sobre pruebas de diagnóstico microbiológico y evaluaciones clínicas para la neumonía, incluida la neumonía adquirida en la comunidad, la neumonía adquirida en el hospital y la neumonía asociada a la ventilación. Se considera que NAV es responsable de un costo adicional de aproximadamente 40 000 por episodio en los estados unidos y alrededor de 9000 en el reino unido. La literatura existente informa que la incidencia de NAV varía ampliamente entre 4.0 % y 28.8% de la población de riesgo.

En los últimos años, el constante desarrollo y la continua mejora de los métodos de secuenciación del ADN ha permitido que la obtención de la secuencia del genoma completo sea accesible en la rutina de los servicios de Microbiología clínica, introduciendo así un nuevo paradigma en el diagnóstico microbiológico este nuevo paradigma implica el manejo de una gran cantidad de información, cuya gestión y análisis demanda inexorablemente el uso de herramientas bioinformáticas lo cual no debería ser un obstáculo para su implementación en los servicios de microbiología clínica ya que en los últimos años se han desarrollado aplicaciones web y/o interfaces que permiten una fácil utilización de muchas de estas herramientas sin la necesidad de requerir grandes conocimientos en lenguajes de programación.

La identificación del microorganismo o microorganismos que pueden estar causando una infección es clave para el manejo adecuado del paciente y su ulterior recuperación. En este sentido, los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico, directos e indirectos, pueden presentar limitaciones, pudiendo en ocasiones ser demasiado lentos o incluso resultar insuficientes para establecer el diagnóstico etiológico definitivo. Para solventar estas limitaciones. Los servicios de Microbiología Clínica han ido paulatinamente incorporando técnicas diagnósticas basadas en la PCR, aunque, al igual que los métodos tradicionales, estos métodos moleculares presentan la desventaja de requerir de una sospecha etiológica que las diferencias de las técnicas de secuenciación masiva. La secuenciación dirigida ha sido clásicamente utilizada en Microbiología para la identificación de bacterias y hongos mediante amplificación de regiones universalmente presentes en sus genomas. Así para la identificación de bacterias se utilizan regiones del gen que codifica la subunidad 16S del ribosoma mientras que para la identificación de hongos se utilizan regiones de ADN espaciador de los genes que codifica las dos subunidades del ribosoma o bien regiones del gen que codifica la subunidad 18S del ribosoma.³² Como se adelantó, la secuenciación Sanger presenta una baja tasa de error y, por ello, ha sido y es ampliamente utilizada para fines taxonómicos y para el diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas.

No se cuenta con bibliografía para comparar los resultados encontrados en nuestro estudio por lo cual se propone realizar nuevos estudios con muestras más grandes para determinar la efectividad de los resultados encontrados y determinar la utilidad de los mismos.

REFERENCIAS.

1. Asensio M, Hernández M, Yus S, Minvielle A. Infecciones en el paciente crítico. *El Sevier*. 2018;(12): 3085-96.
2. Soto L, El paciente crítico crónico. *REV. MED. CLIN. CONDES*. 2019; 30(2):160-170.
3. Zaragoza R, Ramírez P, López M.J. infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos. *Elsevier*. 2014; 32(5):320-327.
4. Deignan JL. Clinical Implementation of Next-Generation Sequencing (NGS) Assays. *Genomic Applications in Pathology*. Springer. 2019; 23: 113-118.
5. Rubio S, Pacheco O, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ. Med.*, 2020; 1(2): 1-15.
6. Jauk F. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. *Congreso Argentino de Hematología*. 2019; (23): 21-38.
7. Richards S, Aziz N, Bale S y col. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. *Genet Med*. 2015; (17): 405-424.
8. Sánchez C, Ramos L, Carpena I, Reyes M, López I, Paredes H, Cantillo G, Martínez S. Evolución clínica, aislamiento microbiológico y costo antimicrobiano de la neumonía complicada adquirida en la comunidad. *Scielo*. 2017; (89): 14-29.
9. Sanjeev K, Anil B, Shyam K, Mishral D. Ventilator associated pneumonia among ICU patients in WHO Southeast Asian region: A systematic review. *PLoS ONE*. 2020;16(3): 1-13.
10. Scott T, Micek K, Kollef A, Richard M, Reichley N, R, Marin H. Health Care-Associated Pneumonia and Community Acquired Pneumonia: a Single-Center Experience. *American Society for Microbiology*, 2007;51(10): 3568–3573
11. Valderrama M, Ortigosa F, Cañas R, Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. 2020;173 (XIII):19-25.
12. Sanger F. y Coulson A. Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Mol Biol*. 1975; 94: 441-446.
13. López C, Causapé F, González M, Carmona A, Oliver P. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. *Seimc*. 2021; (71): 5-29.
14. Sanger F., Air G.M., Barrell BG, Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M. y Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977;(265): 687-695.
15. Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, Min W, Molemans F, Raeymaekers A, Vanden A, Volckaert G y Ysebaert M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*. 1976; (260): 500–507.
16. Liapikou A, Cillóniz C, Torres A. Emerging strategies for the noninvasive diagnosis of nosocomial pneumonia. *Exp Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(7): 523-533.

17. Cilloniz C, Liapikou A, Torres A. Advances in molecular diagnostic test for neumonía. *Curr Opin Pulm Med*. 2020 May; 26 (3):241-248.
18. Menéndez R, Torres A, Aspa J, et al., Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. La Neumonía adquirida en la comunidad. Nuevas directrices de la Sociedad Española de Enfermedades Torácicas y Cirugía Torácica (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2010; 46: 543–558.
19. Carvalho M, da GS, Tondella ML, et al. Evaluación y mejora de los ensayos de PCR en tiempo real dirigidos a los genes *lytA*, *ply* y *psaA* para la detección de ADN neumocócico. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2460–2466.
20. Tavares DA, Handem S, Carvalho RJ, et al. Identificación de *Streptococcus pneumoniae* mediante un ensayo de PCR en tiempo real dirigido a SP2020. *J Clin Microbiol*. 2017; 56: 1231-17.
21. Wu X, Wang Q, Wang M, et al. Incidencia de infecciones virales respiratorias detectadas por PCR y PCR en tiempo real en pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad: un metanálisis. *Nature*. 2015; 89: 343–352.
22. Marquez V, Laura M., Serrato D, Alejandra, Cerritos F, Rene. Secuenciación de fragmentos de ADN, *Rev. Unam*: 231-249
23. Cano R.J., Poinar H, Pieniazek N, Acra A y Talbott D. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*. 1993; 363:536-538.
24. Sebaert Y. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*. 1976; 8:500-507
25. Vogel T.M. y Nalin R. Sequencing the metagenome. *ASM News*. 2003; 69(3):107.
26. Watson J.D. y F.H.C. Crick. A structure for DNA. *Nature*. 1953; 171: 737-738
27. Didelot X, Bowden R, Wilson D, Peto T, Crook D. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*. 2012 Aug 7;13(9):601–12
28. Leischmann R, Adams M, White O, Clayton R, Kirkness E, Kerlavage A, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* New York, NY. 1995;269(5223):496–512
29. Loman N, Pallen M. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*. 2015 Nov 9;13(12):787–94.
30. Edwards M. Dynamics of rod-like macromolecules in concentrated solution. Part 1. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*. 1978;74:560
31. Church D, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020;33(4).
32. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977 Dec 1;74(12):5463–7
33. Iwen P, Hinrichs S, Rupp M. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*. 2002 Jan;40(1):87–109

34. Salipante S, Sengupta D, Rosenthal C, Costa G, Spangler J, Sims E, et al. Rapid 16S rRNA Next-Generation Sequencing of Polymicrobial Clinical Samples for Diagnosis of Complex Bacterial Infections. Hold GL, editor. PLoS ONE. 2013 May 29;8(5):65226
35. Miller S, Naccache SN, Samayoa E, Messacar K, Arevalo S, Federman S, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid. Genome Research. 2019 Apr 16;29(5):831–42
36. Tomas I, Cancino I, Mariner ,Llicer C, Goig G, Ruiz P, Francés C, et al. Uso de las tecnologías de secuenciación masiva para el diagnóstico y epidemiología de enfermedades infecciosas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2020 Jan;38:32–8

ANEXOS.

Hoja de entrega y recepción de muestras en genómica.



**SERVICIO DE TERAPIA MEDICA INTENSIVA UNIDAD 310 E TORRE QUIRURGICA
SOLICITUD DE ESTUDIO DE SECUENCIACION GENOMICA DE MUESTRA BRONQUIAL**

PACIENTE: _____

FEHA: _____

ECU: _____

SERVICIO: _____

FECHA DE NACIMIENTO: _____

SOLICITADO POR:

NOMBRE: _____

CARGO: _____

ENTREGA	ENTREGA	RECIBE

UNIDAD: _____ AREA: _____

OBSERVACIONES:

Hoja de recolección de datos.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB														
1	HOSPITAL GENERAL DE MEXICO														Observaciones:																											
2	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN: <i>COMPARACION ENTRE DETERMINACION GENOMICA Y</i>																																									
3	<i>CULTIVO MICROBIOLOGICO PARA DIAGNOSTICO TEMPRANO DE NEUMONIA ASOCIADO</i>																																									
4	Nombre:				Edad:				Genero:		M	F																														
5	ECU:		Fecha Ingreso al Hospital		Servicio de Origen:		Peso:																																			
6	Cmo:		Fecha de Ingreso a la UCI		Fecha de Egreso de UCI		Talla:																																			
7	Diagnósticos de Ingreso:																																									
8	Muestra Genomica				Muestra Bacteriología				Muestra Bacteriología				Muestra Bacteriología																													
9	Fecha de entrega de muestra				Fecha de entrega de muestra				fecha de entrega de muestra				fecha de entrega de muestra																													
10	Origen				Origen				Origen				Origen																													
11	Organismo				Organismo				Organismo				Organismo																													
12	Colonias				Colonias				Colonias				Colonias																													
13	Fecha de resultados				Fecha de resultados				fecha de resultados				fecha de resultados																													
14	Antibiotico: Si/No			Dosis	Días			Antibiotico: Si/No			Dosis	Días			Antibiotico: Si/No			Dosis	Días			Antibiotico: Si/No			Dosis	Días																
15	Amikacina							Amikacina							Amikacina							Amikacina																				
16	Amp/Subactam							Amp/Subactam							Amp/Subactam							Amp/Subactam																				
17	Ampicilina							Ampicilina							Ampicilina							Ampicilina																				
18	Cefalotina							Cefalotina							Cefalotina							Cefalotina																				
19	Cefepime							Cefepime							Cefepime							Cefepime																				
20	Cefotaxima							Cefotaxima							Cefotaxima							Cefotaxima																				
21	Ceftazidima							Ceftazidima							Ceftazidima							Ceftazidima																				
22	Cefoxitina							Cefoxitina							Cefoxitina							Cefoxitina																				
23	Ceftriaxona							Ceftriaxona							Ceftriaxona							Ceftriaxona																				
24	Cefuroxima							Cefuroxima							Cefuroxima							Cefuroxima																				
25	Ciprofloxacino							Ciprofloxacino							Ciprofloxacino							Ciprofloxacino																				
26	Doripenem							Doripenem							Doripenem							Doripenem																				
27	Ertapenem							Ertapenem							Ertapenem							Ertapenem																				
28																																										