



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARIA DE SALUD

Benemérito Hospital General con Especialidades

“Juan María De Salvatierra”

RELACIÓN ENTRE EL VALOR PREDICTIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LA FASE AGUDA E ÍNDICE NEUTRÓFILO-LINFOCITO EN PACIENTES INFECTADOS Y LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE INFECCIOSO USANDO MARCADORES MOLECULARES GENÓMICOS (16S Y 18S/eEF1) Y SECUENCIACIÓN SANGER.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DR. VÍCTOR MANUEL FONG FLORES

ASESORES DE TESIS:

ASESOR EXPERTO: DR. LUIS ALBERTO CONTRERAS OJEDA

ASESOR METODOLÓGICO: DRA. MARÍA ANDREA MURILLO GALLO

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR

MAYO-2022



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.

**BENEMÉRITO HOSPITAL GENERAL CON ESPECIALIDADES
JUAN MARÍA DE SALVATIERRA**

TESIS DE POSGRADO

**RELACIÓN ENTRE EL VALOR PREDICTIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LA
FASE AGUDA E ÍNDICE NEUTRÓFILO-LINFOCITO EN PACIENTES
INFECTADOS Y LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE INFECCIOSO USANDO
MARCADORES MOLECULARES GENÓMICOS (16S Y 18S/eEF1) Y
SECUENCIACIÓN SANGER.**

PRESENTA

DR. VÍCTOR MANUEL FONG FLORES
RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE MEDICINA INTERNA

DR. LUIS ALBERTO CONTRERAS OJEDA
ASESOR EXPERTO Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA INTERNA

DRA. MARÍA ANDREA MURILLO GALLO
ASESOR METODOLÓGICO

DR. DANIEL ORLANDO SOLÍS GARIBAY
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN,
CALIDAD Y CAPACITACIÓN

DR. CESAR FIRETH POZO BELTRÁN
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA Y CALIDAD ESTATAL

ÍNDICE

Resumen	6
Marco teórico	8
Antecedentes	18
Planteamiento de problema	22
Justificación	23
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Materiales y métodos	26
Descripción general del estudio	28
Procesamiento de datos y análisis estadístico	33
Resultados	35
Discusión	45
Conclusiones	52
Bibliografía	54
Anexos	60

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
qPCR	Reacción de la cadena de polimerasa cuantitativa
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
VSG	Velocidad de sedimentación globular
INL	Índice neutrófilo-linfocito
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NGS	Next sequencing generation

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

- Figura 1** Flujo de trabajo resumido de PCR. Toma de muestra, extracción de ADN y realización de PCR. Pág. 11
- Figura 2** Gen 16s Pág. 13
- Figura 3** Gen 18s/eEF1 Pág. 14
- Figura 4** Tamizaje de pacientes con sospecha de infección, realización de medición de reactantes de fase aguda y toma de muestra para qPCR genes 16S y 18s/eEF1. Pág. 15
- Figura 5** Flujo de trabajo para la identificación de patógenos por PCR y secuenciación Sanger. Pág. 17
- Figura 6** Flujo de trabajo. Pág. 29
- Figura 7** Identificación de microorganismos por Sanger. Pág. 30
- Figura 8** Frecuencia por grupo de enfermedades. Pág. 37
- Figura 9** Nivel de los reactantes de la fase aguda de los pacientes. Pág. 43

TABLAS

- Tabla 1** Costos y financiamiento por muestreo unitario para cada paciente. Pág. 33
- Tabla 2** Datos demográficos. Pág. 36
- Tabla 3** Descripción de los casos de pacientes críticamente enfermos con estados de inmunosupresión con sospecha de infección y resultado de Sanger vs. Cultivo microbiológico. Pág. 39
- Tabla 4** Valores de calidad de secuencia y resultado por secuenciación Sanger. Pág. 41

RESUMEN

Antecedentes: En México, la mortalidad asociada con el choque séptico supera el 60% y el promedio mundial es de aproximadamente el 37%. El diagnóstico temprano de sepsis y de su agente causal es esencial para reducir la alta tasa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.

Planteamiento del problema: En este estudio se plantea determinar la relación entre reactantes de fase aguda en los pacientes infectados y la positividad a los marcadores moleculares genómicos 16s y 18s/eEF1 (para bacterias y hongos, respectivamente) determinados por qPCR.

Justificación: Debido a que en el hospital no cuenta con los resultados de cultivos microbiológicos inmediatos en pacientes con infecciones severas, se propone este estudio para determinar la relación entre reactantes de fase aguda y su tamizaje con los marcadores genómicos 16s y 18s/eEF1 e identificación el agente infeccioso por secuenciación Sanger.

Objetivos: Determinar la relación entre el valor predictivo de las proteínas de la fase aguda e índice neutrófilo-linfocito en pacientes infectados y la identificación del agente infeccioso usando marcadores moleculares genómicos (16S y 18s/eEF1) y secuenciación Sanger.

Material y métodos: Se incluyeron en el estudio 30 pacientes y se estableció la relación entre la elevación de proteínas de fase aguda y la positividad para marcadores genómicos 16s y 18s/eEF1 y la identificación del agente etiológico (bacteria u hongo) a través de secuenciación Sanger.

Resultados: La elevación de biomarcadores no representa valor estadístico, debido a que la mayor proporción de nuestros pacientes positivos para 16S y 18s/eEF1, no presentaban elevación de estos en relación a la positividad y resultado por Sanger.

Conclusión: En nuestro estudio, se asoció la positividad de los marcadores genómicos 16S y 18S/eEF1 con un valor de INL por encima del corte habitual considerado para estados inflamatorios (**Zhang, 2021**). Tanto para el INL como para los otros reactantes de la fase aguda estudiados en este trabajo, se encontró mucha variabilidad entre pacientes y agentes causales de infección; por lo que se propone

el tamizaje de los marcadores genómicos para la detección temprana de infecciones y la instauración de tratamientos oportunos, limitando la mortalidad, días de estancia intrahospitalaria y costos para la salud pública.

Palabras clave: *Sepsis, cultivos microbiológicos, qPCR, secuenciación Sanger, marcadores genómicos, 16s, 18s/eEF1.*

MARCO TEÓRICO

El diagnóstico temprano de sepsis es esencial para reducir la alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes severamente infectados. Sin embargo, la sepsis a menudo se diagnostica tardíamente debido a los signos, síntomas inespecíficos y a biomarcadores empleados para estimar la severidad de los cuadros clínicos.

Dentro del abordaje de pacientes infectados, de acuerdo a las guías de Surviving sepsis (**Evans, 2021**), se debe de realizar cultivos en medios microbiológicos para bacterias, debido a que éstas representan el gran porcentaje de las infecciones en pacientes críticamente enfermos. Sin embargo, hay parámetros los cuales sirven como índices predictores de pronóstico de enfermedad encontrándose validados, pero pueden infraestimar la severidad de la infección o no orientar al diagnóstico etiológico, como es el caso de otros microorganismos etiológicos.

En pacientes críticamente enfermos por sepsis se han reportado algunos marcadores serológicos, tales como la proteína C reactiva y VSG, los cuales no son específicos en infecciones por bacterias y en el caso de infección por hongos aún no se ha identificado algún biomarcador que sea útil (**Bozlu, 2018**). Por lo cual, determinar el agente etiológico causante de infección en pacientes con sepsis en el menor tiempo posible, es de gran utilidad en poblaciones con factores de riesgo para infecciones por bacterias y hongos.

Biomarcadores en la fase aguda

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva se caracteriza por una configuración discoide de cinco subunidades unidas no covalentemente idénticas, cada una de 206 aminoácidos de longitud con una masa molecular de aproximadamente 23 kDa. (**Huang, 2020**) La proteína pentamérica se sintetiza principalmente en los hepatocitos, pero también se ha informado que se sintetiza en otros tipos de células como las células del

músculo liso, los macrófagos, las células endoteliales, los linfocitos y los adipocitos. **(Huang, 2020)** La estimulación de la síntesis de PCR se produce principalmente en respuesta a citocinas proinflamatorias, principalmente IL-6 y en menor grado IL-1 y necrosis tumoral alfa (TNF- α). **(Bryan, 2016)**

La proteína C reactiva se sintetiza en el hígado en detrimento de otras como la albúmina. En conjunto cambia la proporción entre albúmina y globulinas y se alteran las propiedades físico-químicas del plasma, lo que se evidencia en la mayor velocidad de sedimentación eritrocitaria, buen representante analítico del fenómeno de reacción de fase aguda. **(Bryan, 2016)**

La concentración de estas proteínas aumenta o disminuye hasta un 25% durante estados inflamatorios o infecciosos. Su determinación es utilizada como herramienta para definir la presencia o el grado del proceso inflamatorio-infeccioso que condiciona actitudes diagnósticas y terapéuticas; además, estos reactantes de fase aguda son capaces de predecir el riesgo de complicación y muerte en algunos grupos de pacientes, incluso después de haber ajustado la mortalidad a otros factores. **(Escadafal, 2020)**

Velocidad de sedimentación globular (VSG)

Otro de los parámetros para medir la actividad de una enfermedad sistémica es la velocidad de sedimentación globular (VSG), que constituye una medida indirecta del grado de inflamación presente en el organismo. La prueba mide la velocidad de caída de los eritrocitos en un tubo de ensayo largo y estrecho. Los resultados se expresan como milímetros de plasma transparente que quedan en la parte superior del tubo después de que haya transcurrido una hora. En el paciente inmunocomprometido este determinante consigue detectar fácilmente una inflamación, pero es poco específico, o sea, no es capaz de indicar cuál es el tipo, en qué sitio o cuál es la gravedad de la inflamación o infección que ocurre en el

organismo, sin embargo predice la gravedad del cuadro clínico, con base a la respuesta inflamatoria sistémica.

Índice neutrófilo-linfocito

La inflamación desempeña un papel protagonista en la fisiopatología de enfermedades consideradas no inflamatorias, como el cáncer o la aterosclerosis. La determinación de leucocitos circulantes de sangre periférica es un método barato y sencillo, de disponibilidad generalizada, que permite evaluar la presencia de inflamación. Entre los diversos parámetros leucocitarios, el cociente entre el número absoluto de neutrófilos y el número absoluto de linfocitos (índice neutrófilo-linfocito [INL]) se asocia de forma significativa a los niveles de citocinas proinflamatorias y estados severos de infección. **(Forget, 2017)**

Técnicas moleculares en la identificación de patógenos infecciosos

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (o en tiempo real) (q-PCR, por sus siglas en inglés) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado los beneficios de la biología molecular al punto de alcanzar gran versatilidad como técnica diagnóstica. La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la q-PCR se encuentra directamente influenciada por los diferentes componentes que la integran como la mezcla de reacción, régimen de ciclaje y la ADN polimerasa. **(Bolívar, 2012)**

La técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conocer las secuencias que lo flanquean, obtener una secuencia de ADN concreta sin recurrir a la clonación en un organismo huésped. Sus aplicaciones son variables e ilimitadas; ejemplo de ello, es la posibilidad de realizar estudios de expresión genética, secuenciación directa de secuencias amplificadas, detección de mutaciones, seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades, diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas. **(Gobernado, 2003)**

Una de las aplicaciones del qPCR en diagnóstico es la identificación de un patógeno causante de infección gracias a la alta sensibilidad y especificidad de la técnica. El uso de cebadores (oligonucleótidos o primers) permite la identificación de un gen en una mezcla homogénea por ejemplo, si se busca identificar una especie de bacteria específica en una muestra respiratoria.

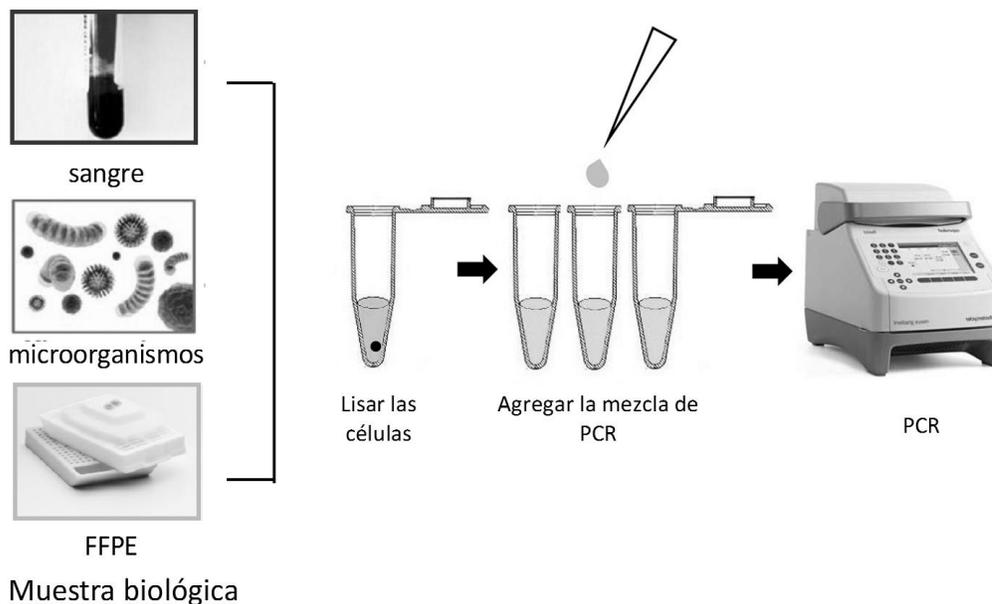


Figura 1. Flujo de trabajo resumido de PCR. Toma de muestra, extracción de ADN y realización de PCR.

Gen 16s

La identificación rápida y precisa de aislamientos bacterianos es una tarea fundamental en microbiología clínica y proporciona información sobre las etiologías de las enfermedades infecciosas y el tratamiento antibiótico adecuado. Aunque los métodos de identificación convencionales son relativamente económicos y permiten la identificación de las bacterias que se encuentran más comúnmente, ciertos

grupos de bacterias son difíciles de identificar y pueden requerirse equipo y experiencia especiales. Estos métodos también fallan en casos de bacterias raras o bacterias con perfiles ambiguos. Además, los métodos fenotípicos se basan en la disponibilidad de cultivo puro y dependen de las características de crecimiento posteriores y del perfil bioquímico. (**Church, 2020**)

Por lo tanto, se requiere un tiempo considerable para identificar las bacterias de crecimiento lento. La secuenciación del rDNA 16S representa una tecnología universal que, teóricamente, proporciona soluciones a estos problemas, produciendo datos inequívocos, incluso para aislamientos inusuales y de crecimiento lento, a menudo dentro de las 48 horas del inicio de estudio del paciente. (**Chen, 2014**) Proporcionando identificación de género en más 90% de los casos e identificación de 65-83% de estas a nivel de especie. (**Chen, 2014**).

El método tradicional de identificación de las bacterias se basa en características fenotípicas (pruebas bioquímicas, producción de pigmento, fisiología, y morfología de las colonias), cuya determinación requiere un tiempo considerable, como consecuencia del crecimiento lento de bacterias en medios de cultivo convencionales.

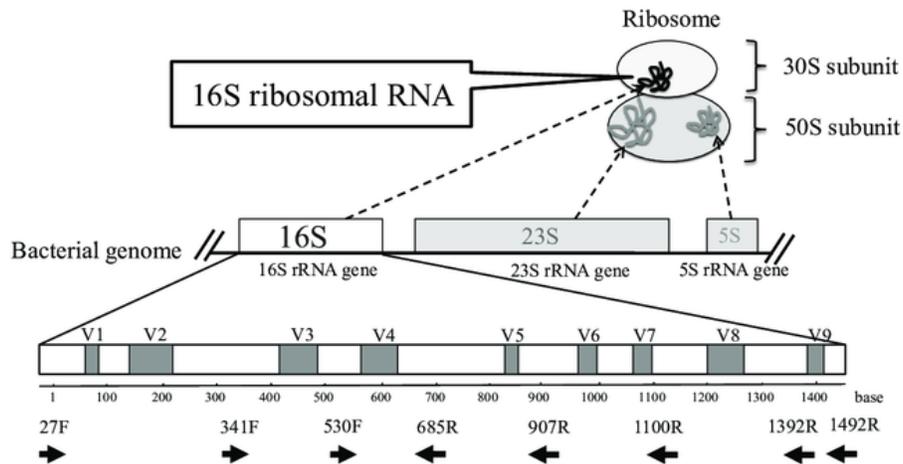


Figura 2. Gen 16S ubicado en el cromosoma de todas las bacterias. Se muestran las 9 regiones variables (V1 a V9) usadas para identificar bacterias. Tomado de Fukuda et al. 2019

Gen 18s/eEF1

Existen diferentes herramientas para la detección, diferenciación e identificación de hongos, entre las que se encuentran métodos fenotípicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares. A pesar de que el método de caracterización fenotípica es el estándar para la identificación de la mayoría de los microorganismos, los métodos moleculares también son una herramienta indispensable en la mayoría de estudios que surgen como consecuencia de los tediosos procesos de identificación bioquímica y fenotípica. (**Jenkins, 2012**)

La identificación molecular de hongos se caracteriza por el uso de varios marcadores genómicos, entre ellos el 18S (gen 18S rDNA), 28S D1/D2 (dominios variables D1/D2 del gen 28S rDNA), ITS (regiones internas transcritas [ITS1-5.8S-ITS2]), eEF1 (subunidad alfa del factor de elongación de la traducción eucariótico), RPB1y RPB2 (subunidad I y II de la ARN polimerasa, respectivamente), CHS (quitina sintasa) y la Chi18-5 (quitinasa 18-5) (**Kidd, 2016; Balajee,2007**).

Se conoce que el trabajo de identificación a nivel molecular de hongos, constituye una de las tareas más complejas debido a la composición de estos, haciendo de la extracción de ADN uno de los procesos más importantes de los métodos moleculares, en los que se ve involucrada directamente la composición de la membrana celular, constituida por un 10% en proteínas y glicoproteínas; seguida de un 8% de lípidos y iones inorgánicos, tales como calcio, fosforo y magnesio, micro elementos fundamentales en la clasificación taxonómica. (**Jenkins, 2012**)

Actualmente, no se ha encontrado una única opción de marcador genómico lo bastante robusto en la discriminación de taxones a nivel de especie para hongos, debido a esto, para lograr una identificación más precisa, se utilizan varios marcadores genómicos de manera simultánea para lograr una combinación de segmentos conservados entre especies. Además de la amplificación de fragmentos específicos de estos marcadores genómicos por PCR, es recomendable el uso de otra técnica molecular en conjunto, como es la secuenciación Sanger.

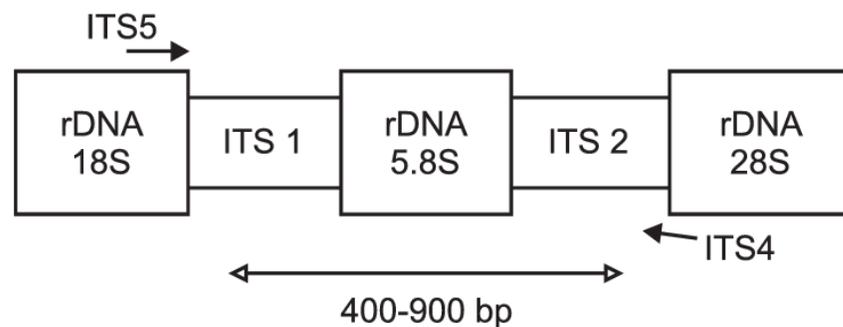


Figura 3. Diagrama esquemático del grupo de genes de rDNA fúngico. Los genes que codifican las subunidades de RNA ribosómico 18S, 5.8S y 28S están separados por las secuencias transcritas internas 1 (ITS1) y 2 (ITS2) que se empalman después de la transcripción. Tomado de Ramos Valente et al. 2017

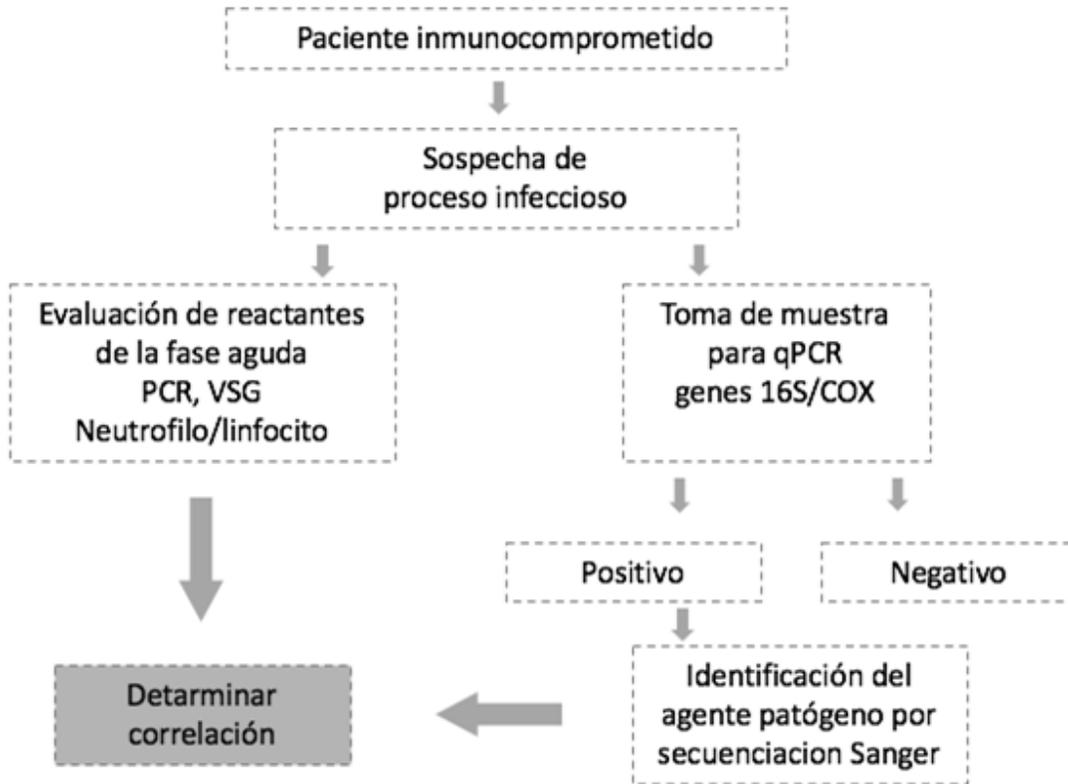


Figura 4. Tamizaje de pacientes con sospecha de infección, realización de medición de reactantes de fase aguda y toma de muestra para qPCR genes 16S y 18s/eEF1.

Secuenciación por técnica Sanger

El método por secuenciación de Sanger, creado por el bioquímico británico Frederick Sanger en 1977. La técnica de secuenciación se utiliza para conocer el orden exacto de los nucleótidos dentro de los genes. Los cromosomas humanos tienen aproximadamente 50,000- 300,000 pares de bases. El fundamento de esta técnica es que al conocer la identidad de una de las bases del par se puede conocer la de la cadena de ADN complementaria. Además, la secuenciación determina cuáles regiones de los cromosomas contienen genes y cuáles son las áreas no codificantes, cuya función es regular la transcripción y traducción del material genético. (Sidra, 2017)

La secuenciación Sanger se usa ampliamente para la identificación, no solo de patógenos, sino de mutaciones clínicamente relevantes de la línea germinal y la confirmación de las variantes genómicas identificadas por otros métodos en pacientes con diversos padecimientos de origen genético (**Crossley, 2020**).

Es una herramienta valiosa en el entorno clínico, debido a su bajo costo y rápido tiempo de respuesta respecto a la secuenciación NGS. Además, los datos de secuenciación son más fáciles y rápidos de interpretar que los datos generados por NGS. Esto hace que se tenga una identificación más rápida de un patógeno y pueda contribuir de manera sustancial al diagnóstico (**Petti, 2005; Janda, 2007**).

La identificación molecular puede completarse 1 o 2 días después de la toma de muestra, sin embargo, requiere personal y equipamiento altamente capacitado en diagnóstico por biología molecular. Por ello, la secuenciación del ADNr 16S y gen 18s/eEF1 se propone como método rápido y preciso para la identificación tanto de microorganismos previamente reconocidos como de nuevas especies.

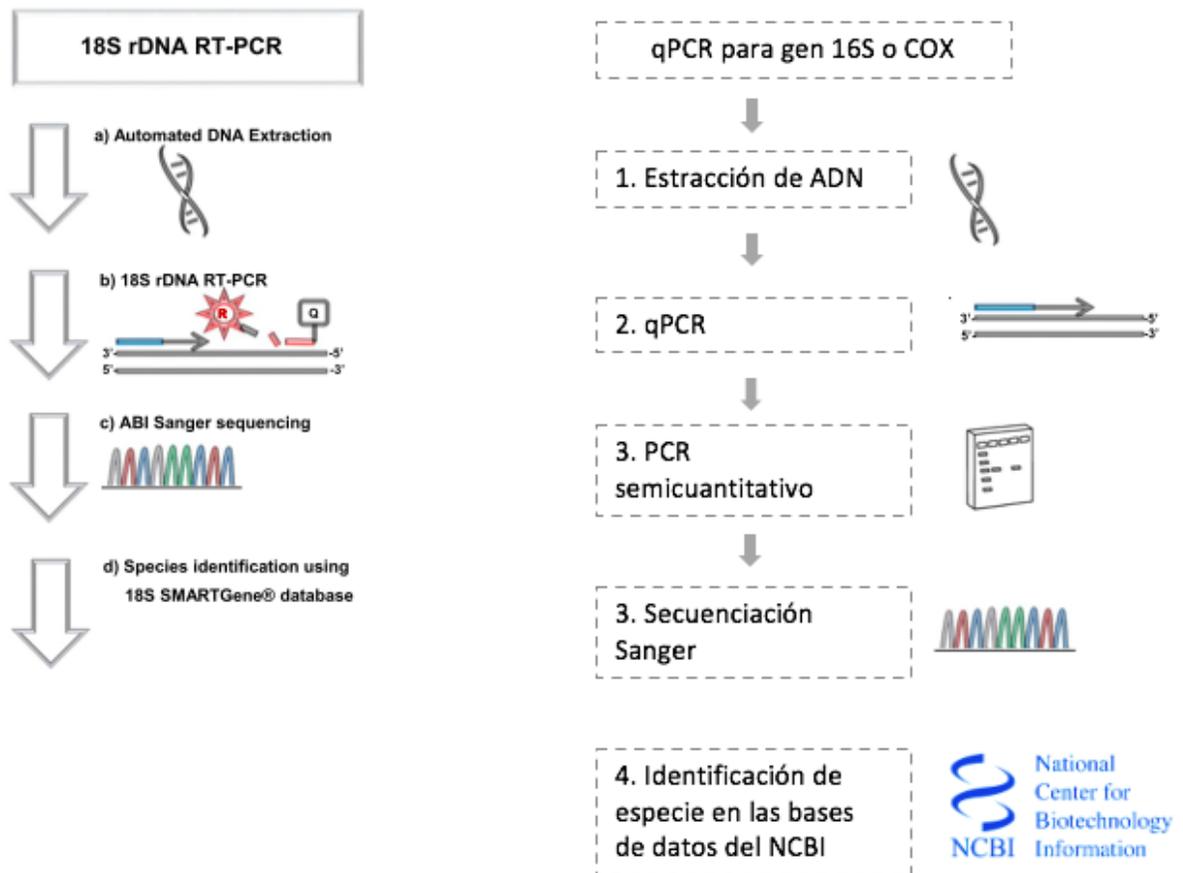


Figura 5. Flujo de trabajo para la identificación de patógenos por PCR y secuenciación Sanger.

Se realiza la extracción de ADN de una muestra clínica previamente preservada o transportada en vial, posteriormente se realiza qPCR para la determinación de los genes 16S y 18S/eEF1, con realización de PCR semicuantitativo, y electroforesis del ADN. Se purifica el ADN de los productos de PCR y se envía para realización de secuenciación Sanger con obtención de fluorograma e interpretación de datos para posterior identificación de microorganismo con análisis a través de base de datos de NCBI. **Realizado con base al artículo Wagner et al., 2018.**

ANTECEDENTES

La sepsis es la presencia de una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del cuerpo a la infección (**Evans, 2020**). Cuando esta afección se agrava con el tiempo conduce a un shock séptico, que se caracteriza por anomalías circulatorias y metabólicas graves, que en conjunto son suficientes para causar la muerte.

Esta entidad nosológica es una de las principales causas de hospitalización y mortalidad en las unidades de cuidados intensivos de adultos (UCI). En todo el mundo, se estima que 19,4 millones de pacientes desarrollan sepsis por año, de los cuales 14,1 millones sobreviven a la hospitalización (**Evans, 2020**). En México, la mortalidad asociada con el choque séptico supera el 60% y el promedio mundial es de aproximadamente el 37% (**Vázquez, 2021**).

El diagnóstico temprano de sepsis y de su agente causal es esencial para reducir la alta tasa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Sin embargo, la sepsis a menudo se diagnostica tarde debido a que los signos y síntomas utilizados, como cambios en el recuento de leucocitos, fiebre, taquicardia y taquipnea, son inespecíficos y no siempre están presentes. Debido a esto, se utilizan frecuentemente los reactantes de fase aguda, como procalcitonina, velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR), como parámetros para determinar el grado y severidad del proceso infeccioso. Una de las limitantes de estos parámetros radica en que pueden reflejar alteraciones en estado de inflamación aguda e infección por bacterias (**Evans, 2020**). Hasta ahora no se ha propuesto plantear un marcador serológico específico para la infección por hongos, siendo el aislamiento y la determinación de crecimiento de estos organismos en medios de cultivo la técnica frecuentemente usada para su identificación.

En los pacientes que presentan un cuadro de sepsis, las infecciones por hongos tanto agudas como crónicas no son consideradas habitualmente como los agentes

causales primarios; según las guías Surviving Sepsis 2021 de la IDSA (**Evans, 2020**), los agentes micóticos representan hasta el 17% de los microorganismos relacionados a sepsis. Sin embargo, los factores de riesgo para fungemia pueden ser inespecíficos y con esto excluir a pacientes potencialmente infectados por hongos. Las infecciones micóticas siempre han sido consideradas como oportunistas obligadas y presentes en la población inmunodeficiente. Por lo tanto, existe la posibilidad de infecciones micóticas latentes, que ante una disminución de la capacidad del sistema inmunológico represente, a su vez, la activación de la infección por medio de diversos mecanismos de invasión que aprovechan cualquier falla del sistema inmunológico, lo que se traduce en infecciones más agresivas que las observadas en infecciones bacterianas (**Rammaert, 2021**).

En pacientes hospitalizados por cuadros infecciosos, se ha determinado que los agentes etiológicos pueden cursar con cuadros clínicos tanto agudos como crónicos, que tienden a ser más agresivos ante estados de inmunosupresión. Por ende, la identificación rápida y precisa de organismos bacterianos es una tarea fundamental en microbiología clínica, ya que proporciona información sobre las etiologías de las enfermedades infecciosas y el tratamiento antibiótico adecuado.

Aunque los métodos fenotípicos convencionales son relativamente económicos y permiten la identificación de las bacterias cultivables que se encuentran más comúnmente en pacientes con cuadros de infección, ciertos grupos de bacterias son difíciles de identificar y puede requerirse equipo especial y experiencia avanzada en microbiología. Estos métodos también fallan en casos de bacterias poco comunes, intracelulares, no cultivables o bacterias con perfiles ambiguos (**Gu, 2020**). Además, los métodos fenotípicos se basan en la disponibilidad de cultivo puro y dependen de las características de crecimiento posteriores y del perfil bioquímico (**Gobernado, 2003**). Por lo tanto, se requiere un tiempo considerable, que pueden ser incluso siete o más días, para identificar las bacterias de crecimiento lento.

Por otro lado, en el estudio clínico de hongos, a pesar de que existen diferentes herramientas para la detección, diferenciación e identificación, entre las que se encuentran métodos fenotípicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares; cada técnica presenta algunas dificultades. Tradicionalmente, el diagnóstico de la infección por hongos se ha basado en el examen microscópico directo de muestras clínicas, histopatología y cultivo. (**Raja, 2017**)

Sin embargo, el rendimiento diagnóstico del examen microscópico y el cultivo dependen en gran medida de la calidad de las muestras clínicas y de la experiencia del personal de laboratorio. Además, estos métodos han mostrado previamente una menor sensibilidad en la detección de hongos en comparación con los métodos moleculares (**Raja, 2017**). A pesar de que el método de caracterización fenotípica es el estándar para la identificación de la mayoría de los microorganismos, los métodos moleculares también son una herramienta indispensable en la mayoría de estudios que surgen como consecuencia de los procesos parsimoniosos de identificación bioquímica y fenotípica (**Aslama, 2017**).

Entre las técnicas moleculares, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite una detección rápida, sensible y precisa tanto de bacterias como de hongos (**Drancourt, 2000**). La detección del gen 16S (gen 16S rDNA) ha sido ampliamente utilizada para identificar bacterias por PCR y la posterior secuenciación del fragmento amplificado, tanto por Sanger como por secuenciación de siguiente generación (NGS). La secuenciación del gen 16S ha demostrado ser particularmente útil en la identificación de bacterias inusuales, que son difíciles de cultivar por métodos convencionales, proporcionando así la identificación a nivel de género en más del 90% de los casos y la identificación de estos organismos a nivel de especie entre el 65-83% (**Drancourt, 2000**).

En diversos estudios sobre el estudio molecular de paciente infectados por bacterias, por ejemplo, en la cohorte de Jenkins et al., se encontró que la realización de ensayos de PCR 16S rRNA tiene el potencial de hacer una contribución

importante al manejo de pacientes mediante la detección de la presencia de patógenos bacterianos en muestras clínicas con cultivo negativo. Los resultados respaldan la sugerencia de que la sensibilidad del ensayo se ve afectada por el tamaño del fragmento del gen 16S rRNA amplificado. (**Jenkins, 2012**)

Para el estudio y diagnóstico temprano de micosis a través de técnicas moleculares, incluida la identificación precisa del hongo causante y, cuando sea posible, de la resistencia anti fúngica, es fundamental para el manejo adecuado del paciente y la mejora de los resultados, como es determinado en la cohorte de estudio de **Kidd et al.** De acuerdo a diversos estudios, los cultivos y la microscopía siguen siendo el estándar de oro para el diagnóstico de micosis, la sensibilidad y la especificidad de dichos métodos son limitadas; los cultivos son lentos (hasta 4 semanas) y dependen de que la muestra contenga elementos fúngicos viables. (**Kidd, 2020**)

Se ha reportado el surgimiento de Están surgiendo hongos con resistencia anti fúngica adquirida clínica y ambientalmente, y es posible que se pasen por alto especies crípticas con resistencias intrínsecas. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas de diagnóstico más sensibles y específicos para micosis, no solo para detectar directamente especies fúngicas en muestras clínicas, sino también para una detección más rápida de la resistencia a los medicamentos. (**Kidd, 2020**)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Benemérito Hospital Juan María de Salvatierra la cantidad de pacientes que se reciben por mes en el servicio de medicina interna con procesos infecciosos, se estima en un promedio de 5-6 pacientes por mes. Los cuales presentan datos de alarma previo a desarrollar severidad en las presentaciones clínicas, lo que representa desenlaces pocos favorables para la salud.

Como parte del abordaje de pacientes infectados se realiza de manera rutinaria medición de parámetros como velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva y procalcitonina. Sin embargo, se ha visto que estos biomarcadores sólo presentan positividad en caso de infección por bacterias. Respecto a las infecciones micóticas, se ha reportado que hasta el 17% de los pacientes presentan estados de sepsis asociados a micosis (**Evans, 2021**), los cuales no condicionan la respuesta inflamatoria habitual y por lo tanto no aumentan las proteínas de fase aguda. Por lo tanto, no son considerados como los principales microorganismos relacionados a infecciones severas.

En el abordaje inicial de pacientes infectados, la determinación del estado inmunológico se basa en la medición de laboratoriales como biometría hemática y reactantes de fase aguda, además de ciertos biomarcadores que pueden indicar infección más no asegurar la presencia de estos escenarios clínicos, algo que en nuestro medio es difícil de interpretar debido a que no contamos con métodos confiables para identificación de microorganismos.

Sin embargo, en nuestro hospital éstos parámetros pueden verse desfasados con el estado real del paciente al momento de su ingreso, como es en los estados de anergia inmunológica y respuesta desregulada por la inflamación del huésped.

Una de las problemáticas observadas en el diagnóstico microbiológico y etiológico de pacientes infectados en nuestra unidad, es el tiempo de espera para la obtención del microorganismo productor de la enfermedad, el cual es diverso para los diferentes microorganismos. Por ejemplo, en bacterias el tiempo promedio para el resultado del cultivo es de 7 días, mientras que para hongos el tiempo es variable desde 14 hasta 21 días.

Aparentemente, esta problemática es semejante en todas las unidades médicas, por lo que se considera este estudio un parteaguas para el abordaje de pacientes infectados y las nuevas técnicas diagnósticas que se podrían establecer. Por lo que propone, el uso de marcadores genómicos para la detección de microorganismos en el abordaje inicial de pacientes infectados, así como tamizaje rápido para la identificación posterior con la técnica de secuenciación Sanger.

JUSTIFICACIÓN

El abordaje inicial del paciente con estados severos de infección conlleva a diagnósticos diferenciales que deben ser descartados, de forma prioritaria sobre todo en etiologías no habituales o micóticas. Debido a que en nuestra unidad no se cuenta con resultados de cultivos microbiológicos inmediatos para los pacientes que ingresan al hospital por enfermedades infecciosas severas, en este estudio se propuso medir los reactantes de fase aguda y determinar la relación que existe entre éstos con la positividad de marcadores genómicos versus los diagnósticos microbiológicos a través de cultivos.

La medición de estos parámetros, se puede realizar de forma habitual y rutinaria en pacientes con infecciones, como determinante para valorar el grado de inmunocompromiso y reactividad ante procesos inflamatorios e infecciosos.

Dentro de los protocolos de abordaje de pacientes con infecciones, se proponen modelos clásicos como la medición de SOFA, así como, la determinación de proteínas séricas, las cuáles se encuentran positivas en procesos infecciosos agudos y crónicos. Sin embargo, éstas proteínas pueden estar negativas aun teniendo un proceso infeccioso de base. Por lo que se ha determinado que algunas infecciones no van a presentar elevación de estos reactantes.

Además, dentro de los mismos protocolos preestablecidos para el manejo y abordaje de pacientes infectados se propone la toma de cultivos durante las primeras horas de abordaje del paciente, así como, previo al inicio de antibioticoterapia. Sin embargo, los cultivos son actualmente métodos que, aunque valiosos, son obsoletos para la valoración y la determinación del agente etiológico.

En nuestro medio, la identificación de patógenos a través de medios de cultivos convencionales es la única opción viable para el diagnóstico. La identificación microbiológica se dificulta debido a varias razones, primero, el uso de medios de cultivos universales que no logran identificar microorganismos particulares, que habitualmente infectan a pacientes con inmunocompromiso, segundo, gran porcentaje de las bacterias son de crecimiento lento, entre 5 a 7 días y tercero, existen bacterias que no son cultivables por los métodos habituales. Además, en el caso de hongos también hay dificultades en cuanto a su identificación microbiológica por el tiempo de incubación, la metodología de la siembra y además que su identificación depende de personal altamente capacitado para la detección de los mismos, por lo que recomiendan la utilización de herramientas moleculares en el abordaje de pacientes infectados.

De acuerdo a los registros de pacientes en el BHGEJMST, se calcula en promedio 5 - 6 pacientes con procesos infecciosos por mes, los cuáles presentan datos de alarma previos a desarrollar enfermedades infecciosas que representan un desenlace poco favorable para su salud. Por esta razón, en este estudio se propone medir los reactantes de fase aguda y determinar la relación que existe entre éstos

con la positividad de marcadores genómicos versus los diagnósticos microbiológicos a través de cultivos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el valor predictivo de las proteínas de la fase aguda e índice neutrófilo-linfocito en pacientes infectados y la identificación del agente infeccioso usando marcadores moleculares genómicos (16S y 18s/eEF1) y secuenciación Sanger.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Medir los reactantes de fase aguda e índice neutrófilo/linfocito en manifestaciones tempranas de pacientes con foco infeccioso identificado.
- Relacionar el grado de severidad de la infección según el índice neutrófilo/linfocito y proteínas de fase aguda.
- Evaluar la concordancia entre los valores de proteínas de fase aguda y su relación con la positividad para los genes 16s o 18s/eEF1 como indicador de diagnóstico etiológico temprano.
- Identificar el agente infeccioso por secuenciación Sanger.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nivel, tipo y método

El presente estudio es de nivel relacional y de tipo prospectivo, transversal, analítico y observacional. Las variables que se analizaron fueron el resultado de la medición de proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular y procalcitonina), índice neutrófilo/linfocito y su relación con el diagnóstico microbiológico a través de secuenciación Sanger y marcadores genómicos 16s o 18s/eEF1, en pacientes críticamente infectados del Hospital Juan María de Salvatierra.

Área de estudio

El estudio se realizó en el Hospital Juan María de Salvatierra, hospital de segundo nivel de atención que recibe a paciente derechohabientes de Secretaria de Salud en Baja California Sur.

Universo, población y muestra

Universo: Todos los pacientes ingresados al servicio de Medicina Interna, los cuales se encontraban hospitalizados bajo sospecha diagnóstica de infección. Se contó con un promedio mensual estimado de ingresos críticamente infectados de 5-6 pacientes por mes.

Población: Pacientes hospitalizados en el Hospital Juan María de Salvatierra, diagnosticados con procesos infecciosos que ingresaron al servicio de Medicina Interna durante el período 2020-2021 del hospital general Juan María de Salvatierra.

Muestra: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia para seleccionar los pacientes con infecciones críticas.

Criterios de inclusión

- Ser portador de proceso infeccioso identificado sin agente etiológico diagnosticado.
- Género indistinto.
- Rango de edad de 20 a 59 años de edad.
- Contar con medición de reactantes de fase aguda (PCR, VSG, procalcitonina) y biometría hemática (índice neutrófilo-linfocito).
- Presentar respuesta inflamatoria aguda.
- Estar hospitalizado en el servicio de Medicina Interna.

Criterios de exclusión

- Paciente con comorbilidades como neoplasias, hepatopatías, cardiopatías, nefropatía terminal previamente diagnosticadas.
- Edad menor de 20 años y mayor de 60 años.
- Con tratamiento antimicrobiano 7 días previos al inicio de protocolo de estudio.
- Paciente con complicaciones ventilatorias y neurológicas severas.

Criterios de eliminación.

- No contar con medición de PCR, VSG, procalcitonina y biometría hemática.
- Mediciones fuera de los días establecidos para la medición de reactantes.
- Pacientes con alta mortalidad temprana a su ingreso.
- Pacientes que cuenten con cultivos microbiológicos previos positivos.
- Pacientes que cuenten con inicio de antibioticoterapia de más de 7 días de evolución.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Previa autorización del comité de Investigación Clínica y el comité de Ética en Investigación del Benemérito Hospital General con especialidades Juan María de Salvatierra, se realizó un estudio de nivel relacional de tipo prospectivo, transversal, analítico, observacional, en el cual se evaluó a pacientes con diagnóstico de procesos infecciosos, que acudieron a valoración y que se encontraban ingresados en el servicio de Medicina Interna.

Una vez tamizado el paciente previamente al motivo de su ingreso, elaboración de historia clínica, toma de reactantes de fase aguda, se procedió a tomar muestra clínica la cual iba a ser analizada con los marcadores genómicos previa firma de hoja de consentimiento informado.

Se tomó muestra de sangre para determinar los reactantes de la fase aguda (velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, procalcitonina e INL). Adicionalmente, de la muestra clínica tomada en cada paciente según el sitio de infección (LCR, sangre, aspirado bronquial, orina, etc.) se realizó la extracción de ADN para realizar el PCR para 16S, 18S/eEF1 y posterior identificación del patógenos por secuenciación Sanger (ver a continuación).

Se realizó estudio bajo el siguiente protocolo, a través de las siguientes especificaciones:

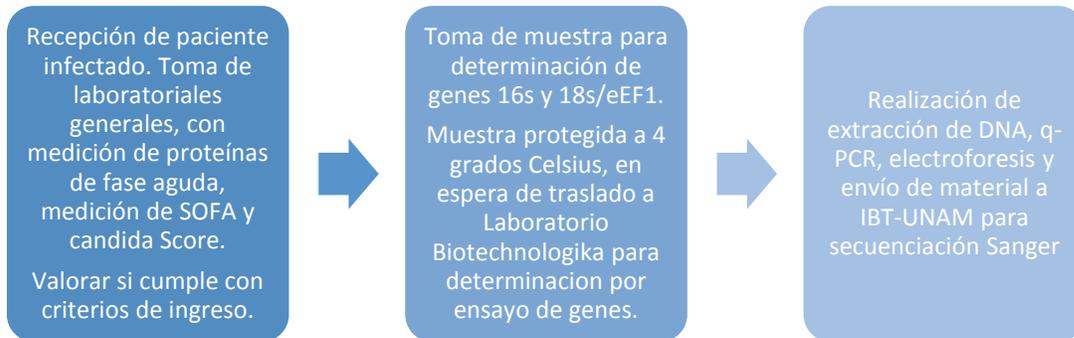


Figura 6. Flujo de trabajo.

Velocidad de sedimentación globular

La medición de VSG se realizó en el laboratorio clínico del Hospital Juan María de Salvatierra. Se tomó 1 ml de sangre venosa anti-coagulada con EDTA. La sangre se colocó en el tubo de Wintrobe (tubo de vidrio con un diámetro de 3 mm y graduado en mm en una escala de 0 a 10 cm) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora en un soporte para mantener la posición vertical; al término, se cuantificó la sedimentación en milímetros desde el borde superior del plasma hasta la base de las células.

Proteína C reactiva

Se realizó la toma de sangre periférica, previa asepsia tomando 1 ml, se colocó posteriormente en un tubo de EDTA, llevándose la muestra a análisis en el laboratorio del hospital. La muestra se centrifugó para obtener plasma y

posteriormente se analizó en equipo analizador Microsemi CRP a través de quimioluminiscencia.

q-PCR para genes 16s y 18s/eEF1



Figura 7. Identificación de microorganismos por Sanger. **Tomado de:** *Rodicio, M et al.* Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology.

Para la detección de bacterias y hongos en las muestras clínicas se utilizaron oligonucleótidos específicos a los genes 16S rDNA (región V3-V4) (forward: CCGTCAATTCCTTTGAGTT reverse: CAGCAGCCGCGCTAATAC), eEF1

(forward: GAYTTCATCAAGAACATGA reverse: GACGTTGAADCCRACRTTG) y 18S rDNA (forward: GATCACACCGCCCGTC reverse: TGATCCTTCTGCAGGTTCA). Para la detección de estos genes, 1 ml de ADN y 2 ml de primers (10 pmol) se agregaron a 47 ml de la mezcla de reacción de PCR GoTaq® Green Master Mix (M712) (Promega, Madison, WI, USA). La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial durante 5 min a 95 ° C, seguida de 25 ciclos de 5 s 95 ° C, 15 s 60 ° C y 15 s 72 ° C. Los productos de PCR esperados (16S, 400 pb; 18S, 150 pb y eEF1, 600 pb) se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, se purificó el ADN de las bandas usando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, Irvine, CA, USA).

Los amplicones se secuenciaron utilizando el kit de secuenciación Big Dye-terminator technique (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en el equipo 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Los electroferogramas se visualizaron y se evaluaron las calidades con la paquetería bioinformática de Geneious Prime v2019.2.3, con base a la regularidad de la separación entre bases, la altura de los picos y presencia de picos secundarios. Para los análisis de calidad se tuvo en cuenta la calidad de cada nucleótido (quality score o valor de phred). Las secuencias obtenidas se analizaron tomando como referencia la base de datos nt/nr del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se seleccionó la identidad más alta, cobertura de secuencia y valor de expectancia, como parámetros para la identificación de género o especie.

Secuenciación Sanger

Para los pacientes positivos para los genes 16s o 18s/eEF1, se realizó un segundo PCR semicuantitativo, se corrió el producto de PCR por medio de electroforesis en

gel de agarosa al 2% y se visualizó la banda con tinción de bromuro de etidio. Se cortó la banda, se purificó el ADN y se envió a la Unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM).

Una vez recibido el resultado, la secuencia reportada se comparó con la base de datos del NCBI por medio de la herramienta BLAST-n. Con base al porcentaje de identidad y al e-value se determinó la secuencia con el alineamiento significativo más alto y así la especie a la cual pertenece.

Cultivo microbiológico

Los cultivos se realizaron en el laboratorio clínico y microbiológico del Benemérito Hospital General de Especialidades “Juan María de Salvatierra” (BHGEJMS). Las muestras se cultivaron en placas de agar (agar sangre, chocolate y Maconkeys) y caldo BHI. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se evaluó visualmente el crecimiento a las 24 h y en caso de no haber crecimiento se hizo subcultivo del caldo BHI por 5 días.

Para hongos se realizó cultivo en medio Sabouraud-dextrosa, con incubación térmica a 37 °C, durante siete días, con posterior identificación microscópica con azul de lactofenol e hidróxido de potasio al 10%.

FINANCIAMIENTO

Se realizó el estudio con financiamiento del laboratorio de biología molecular Biotechnologika A2, con toma de muestra, realización de PCR para posterior envío al Instituto de Biotechnologika UNAM para secuenciación Sanger.

Tabla 1. Costos y financiamiento por muestra unitario para cada paciente.

No.	Descripción	Financiado por	Costo unitario	Cantidad	Costo total
1	Recipientes toma de muestra +buffer conservante	Laboratorio Biotechnologika A2	\$35.00	25	\$875.00
2	Extracción de DNA	Laboratorio Biotechnologika A2	\$180.00	25	\$4,500.00
3	qPCR (16S, 18S,eEF1)	Laboratorio Biotechnologika A2	\$450.00	25 (por 3 genes)	\$33,750.00
4	Envío por paquetería a Instituto de Biotecnología UNAM	Laboratorio Biotechnologika A2	\$400.00	25	\$10,000.00
5	Realización de identificación de microorganismo por técnica Sanger	Laboratorio Biotechnologika A2	\$350.00	25	\$8,750.00
TOTAL					\$57,875.00

PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de variables numéricas y de razón se realizará un análisis descriptivo con medidas de tendencia central (media, moda, mediana) y dispersión (rango, desviación estándar). Para las variables cualitativas (dicotómicas y categóricas) se utilizarán frecuencias (%), con cálculo de intervalos de confianza al 95% (IC95%).

Se evaluarán las diferencias entre las variables cualitativas ordinales mediante la prueba U de Mann-Whitney y para las variables cualitativas nominales mediante la prueba de Chi cuadrado. Las variables cuantitativas se analizarán mediante análisis de diferencias entre medias por la prueba de t-Student.

Una vez recolectados los datos se procederá a codificar las respuestas para efectuar el procesamiento de los datos y el análisis estadístico pertinente, usando el paquete Excel 2010 y SPSS 22. Se obtendrán los datos más significativos para expresar los resultados, discusión y conclusión.

Las características de las muestras clínicas fueron reportadas como media o frecuencias y porcentajes. La diferencia correspondiente a días de estancia hospitalaria, las diferencias entre la positividad entre cultivos microbiológicos y secuenciación Sanger, así como la eficiencia de resultados entre secuenciación Sanger y utilización de medios de cultivo se analizaron estadísticamente mediante la prueba de X^2 . Las diferencias estadísticas entre reactantes de la fase aguda entre los grupos de pacientes con patógeno identificado de bacterias, hongos y bacterias/hongos y las diferencias entre los valores de calidad (Q) de las lecturas de las secuencias para los marcadores genómicos 16S, 18S y eEF1 se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis.

Aspectos Éticos

Este estudio se realizó bajo la supervisión y aprobación del comité de ética e investigación del Benemérito Hospital Juan María de Salvatierra, con número de registro: **083-083-2021**.

RESULTADOS

Datos demográficos, asociación de grupos y comorbilidades

Se incluyeron a 30 pacientes, de los cuales el 63.3% correspondían al género masculino y el 36.7% al género femenino (Tabla 2). La media de edad fue de 43.67 años (DE \pm 13.57 años) y se agruparon a los pacientes estudiados en rangos de edad donde se observó que los porcentajes mayoritarios fueron de 26.7% y 23.3% correspondieron a los rangos de edad de 20 a 30 años y de 51-60 años (Tabla 2), respectivamente.

La estancia intrahospitalaria promedio fue de 14.7 días (DE \pm 10.2 días). La mayor estancia intrahospitalaria correspondió al rango de 11 a 20 días (Tabla 2). A pesar de que no se determinaron diferencias estadísticas entre los días de estancia intrahospitalaria entre los pacientes que tuvieron infección por bacterias e infección por hongos ($P = 0.06$), cabe destacar que si hubo mayor cantidad de pacientes con infección por hongos que registraron una estancia intrahospitalaria mayor a siete días.

Tabla 2. Datos demográficos

	Número (n)	Porcentaje (%)
Sexo		
Masculino	19	63.3
Femenino	11	36.7
Edad		
20-30	8	26.7
31-40	5	16.7
41-50	6	20.0
51-60	7	23.3
61-70	4	13.3
Días de estancia intrahospitalaria		
0-10	8	26.6
11-20	10	33.3
21-30	9	30
31-40	1	3.3
41-50	1	3.3
Más de 50	1	3.3
Comorbilidades		
Hipertensión arterial	9	30
Diabetes mellitus	4	13.3
Infección por VIH	3	10
Postrasplante	3	10
Obesidad	2	6.6
Enfermedad renal crónica	2	6.6
Hipertiroidismo	1	3.33
TB pulmonar	1	3.33
Comunicación interventricular	1	3.33
Infección por Hepatitis C	1	3.3
Ninguna	4	13.3

Las 30 muestras clínicas se distribuyeron de la siguiente manera: Aspirado bronquial (17%), Biopsia (10 %), LCR (17%), Líquido peritoneal (6%), Líquido pleural (27%) y Sangre periférica (23%). Del total de muestras el 46.6% fueron positivas para hongos, el 23.3% para bacterias, el 23.3% para bacterias y hongos, y el 6.7% para ningún patógeno. Además, se registraron las comorbilidades

presentes en los pacientes en esta cohorte de estudio. La comorbilidad más prevalente fue hipertensión arterial en un 30%, seguido de diabetes mellitus en 13.3%, el resto de comorbilidades se presentaron en un rango del 10% al 3.33 % (Tabla 2). Sólo el 13.3% de los pacientes estudiados no presentaba ninguna comorbilidad al momento del estudio.

Los cuadros clínicos de infección de todos los pacientes de la cohorte de estudio se registraron. El diagnóstico de SIRA corresponde al 15.63 %, meningitis 9.38 % y coagulopatía 6.25 % (Tabla 3), los diagnósticos restantes presentaron una prevalencia menor al 5%. La mortalidad global del estudio fue del 36.6% asociada a la severidad de los cuadros clínicos y la presentación de los mismos, determinado por la escala SOFA (Sepsis related Organ Failure Assessment).

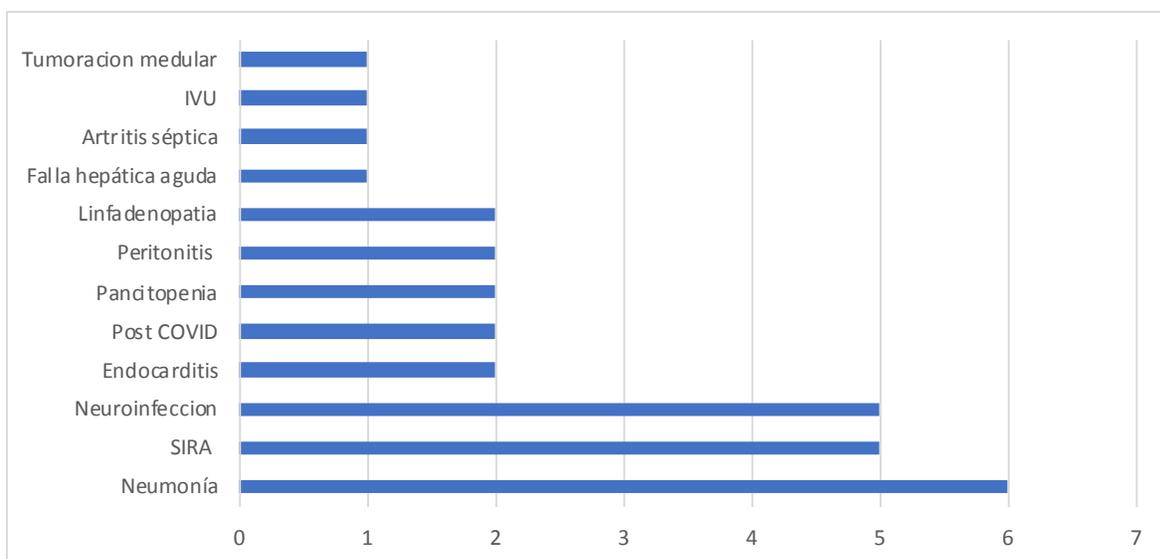


Figura 8. Frecuencia por grupo de enfermedades.

Presentación clínica

Dentro del espectro de presentaciones clínicas descritas en este estudio, encontramos que la neumonía es la más prevalente, la cual estaba asociada en mayor cantidad con agentes causales de naturaleza micótica. Como se muestra en la tabla 2, la presentación clínica de esta cohorte fue diversa y en la mayoría de los casos ésta tuvo relación directa con el agente aislado e identificado por secuenciación Sanger.

La evaluación de los marcadores genómicos (16S, 18S/eEF1) de los agentes causales de infección y el cuadro clínico fue de gran utilidad debido a que en la mayoría de los casos se presentó como un cuadro inespecífico de meningoencefalitis que, de acuerdo al análisis de líquido cefalorraquídeo, la orientación a agentes micóticos no se hubiese tomado en cuenta y el diagnóstico no hubiese sido oportuno con progresión de la enfermedad a secuelas severas o incluso fatales.

Tabla 3. Descripción de los casos de pacientes críticamente enfermos con estados de inmunosupresión con sospecha de infección y el resultado de la identificación de patógeno por cultivos clásicos y por PCR para los genes 16S, 18S/eEF1 y posterior secuenciación Sanger.

No.	Diagnóstico	Gen 16s	Gen 18s	Resultado por cultivo microbiológico	Resultado por secuenciación Sanger
1	Endocarditis	+	-	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus
2	Falla hepática	+	-	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus
3	Neuroinfección	+	-	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus
4	Neuroinfección	+	-	Negativo	Pseudomona putrida
5	Peritonitis	+	-	Negativo	Salmonella enterica
6	Neumonía	+	-	Candida spp.	Candida krusei
7	Neuroinfección	+	-	Criptococos spp.	Pseudomonas putida
8	Neumonía	-	+	Microbiota mixta	Aspergillus fumigatus
9	Neumonía	-	+	Negativo	Candida krusei
10	Post COVID	-	+	E. Coli BLEE	Aspergillus niger
11	Post COVID	-	+	Negativo	Cryptococcus neoformans
12	Neumonía	-	+	Pseudomona aeureginosa	Rhizopus oryzae
13	Neuroinfección	-	+	Negativo	Aspergillus flavus
14	Neumonía	-	+	Acinetobacter spp./SARM	Candida krusei
15	Pancitopenia	-	+	Negativo	Candida krusei
16	Neumonía	-	+	S. pneumoniae	Candida krusei
17	Neumonía	-	+	Negativo	Cryptococcus neoformans
18	Neuroinfección	-	+	Negativo	Aspergillus flavus
19	SIRA	-	+	Negativo	Aspergillus flavus
20	SIRA	-	+	Negativo	Leptotrichia shahii, Lichteimia spp.
21	Neumonía	+	+	Rhizosporum	Aspergillus flavus, Klebsiella pneumoniae
22	Micosis ganglionar	+	+	Negativo	Talaromyces pinophilus, Klebsiella pneumoniae
23	Artritis séptica	+	+	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus, Aspergillus flavus
24	IVU	+	+	Candida glabrata	Staphylococcus aureus, Aspergillus flavus
25	Linfadenopatía	+	+	Neg, microbiota mixta	Phyllobacterium myrsinacearum, uncultured fungus sp. 5OPS3-3AITS1
26	Endocarditis	+	+	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus, Aspergillus flavus
27	SIRA	+	+	Candida spp.	Delftia sp., Aspergillus flavus
28	SIRA	-	-	Candida spp.	Negativo
29	Pancitopenia	-	-	Shigella spp	Negativo
30	SIRA	-	-	Negativo	Negativo

PCR para 16S, 18S, eEF1 y Secuenciación Sanger

Con el fin de identificar la presencia de bacterias u hongos en las 30 muestras clínicas que conforman la cohorte de estudio, se procedió a realizar PCR semicuantitativo para los marcadores genómicos 16S y 18S/eEF1, respectivamente. Tras la electroforesis en gel de agarosa, en todos los casos se obtuvo una banda del tamaño esperado para los tres genes evaluados (16S, 400 pb; 18S, 150 pb y eEF1, 600 pb).

Los productos de amplificación de los marcadores genómicos (16S, 18S y eEF1) se sometieron a la técnica de secuenciación Sanger. Los electroferogramas resultantes de cada una de las secuencias obtenidas se evaluaron de acuerdo a los criterios de regularidad de separación de las bases, distribución de las alturas de los picos y aparición de picos secundarios, así como la calidad de las secuencias. Las secuencias generadas en conjunto presentaron un valor de calidad promedio (Q) de 36.12.

Las secuencias a su vez fueron analizadas en BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el filtro de “bacteria” u “hongo”, según fuera el caso y con los criterios de corte de cobertura >90%, valor de expectancia (E-value) < 0.001 y un porcentaje de identidad > 85%. Todas las secuencias provenientes de las 30 muestras clínicas estuvieron dentro de los parámetros de corte establecidos (Tabla 5).

Tabla 4. Valores de calidad de secuencia y resultado por secuenciación Sanger.

		E value	Query cover	% identidad	Especie	Especie	E value	Query cover	% identidad
Bacteria Y Hongo	17	0.00E+00	96%	99.26%	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	5.00E-61	94%	99.24%
	18	0.00E+00	98%	98.92%	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	4.00E-62	96%	99.25%
	19	6.00E-179	52%	99.15%	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	<i>Uncultured fungus sp. 5OPS3-3AITS1</i>	0.00E+00	79%	98.48%
	20	0.00E+00	99%	98.92%	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	6.00E-47	97%	93.28%
	28	4.00E-140	98%	88.04%	<i>Delftia sp.</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	6.00E-22	10%	79.17%
	29	4.00E-61	97%	69.13%	<i>Leptotrichia shahii</i>	<i>Lichteimia spp.</i>	4.00E-71	98%	68.17%
	5	7.00E-65	93%	99.29%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i>	1.00E-02	1%	96.97%
Bacteria	6	2.00E-170	94%	97.45%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
	4	1.00E+128	93%	89.60%	<i>Pseudomona putrida</i>				
	23	4.00E-109	93%	85.28%	<i>Pseudomona putrida</i>				
	16	3.00E-160	86%	97.87%	<i>Salmonella enterica</i>				
	1	0.00E+00	99%	96.43%	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	2	3.00E-22	37%	77.51%	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	3	0.00E+00	85%	90.64%	<i>Staphylococcus aureus</i>				
Hongo	7	2.00E-08	39%	87.27%	<i>Aspergillus fumigatus</i>				
	9	2.00E-03	4%	80.65%	<i>Aspergillus niger</i>				
	12	4.00E-62	93%	99.28%	<i>Aspergillus flavus</i>				
	26	4.00E-62	97%	99.25%	<i>Aspergillus flavus</i>				
	30	6.00E-60	97%	98.51%	<i>Aspergillus flavus</i>				
	8	5.00E-26	81%	74.37%	<i>Candida krusei</i>				
	13	1.00E-62	92%	98.57%	<i>Candida krusei</i>				
	15	1.00E-104	96%	82.73%	<i>Candida krusei</i>				
	22	3.00E-24	45%	74.11%	<i>Candida krusei</i>				
	25	1.00E-26	65%	74.62%	<i>Candida krusei</i>				
	10	3.00E-08	3%	90.38%	<i>Cryptococcus neoformans</i>				
	24	3.00E-08	3%	90.38%	<i>Criptococcus neoformans</i>				
	11	1.00E-53	84%	95.15%	<i>Rhizopus oryzae</i>				
Negativo	27				Negativo				
	14				Negativo				
	21				Negativo				

Asociación de reactantes de fase aguda con la secuenciación Sanger

Se realizó la medición de reactantes de fase aguda a todos los pacientes reclutados al estudio; estos parámetros son habitualmente tomados en cuenta para valorar la presencia de agentes infecciosos, severidad y evolución de las enfermedades infecciosas.

Al ingreso hospitalario se procedió inmediatamente a la medición de reactantes de fase aguda e INL y se agruparon de acuerdo al resultado del patógeno identificado por PCR semicuantitativo y secuenciación Sanger en tres grupos: positivos sólo al gen 16S o infección por bacteria, positivos sólo al gen 18S/eEF1 o infección por hongo y positivos a los genes 16S/18S/eEF1 o infección mixta (Figura 9). Se analizaron los marcadores séricos de infección (PCR, VSG, INL y PCT) que habitualmente son usados en pacientes críticamente enfermos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (**Figura 9**).

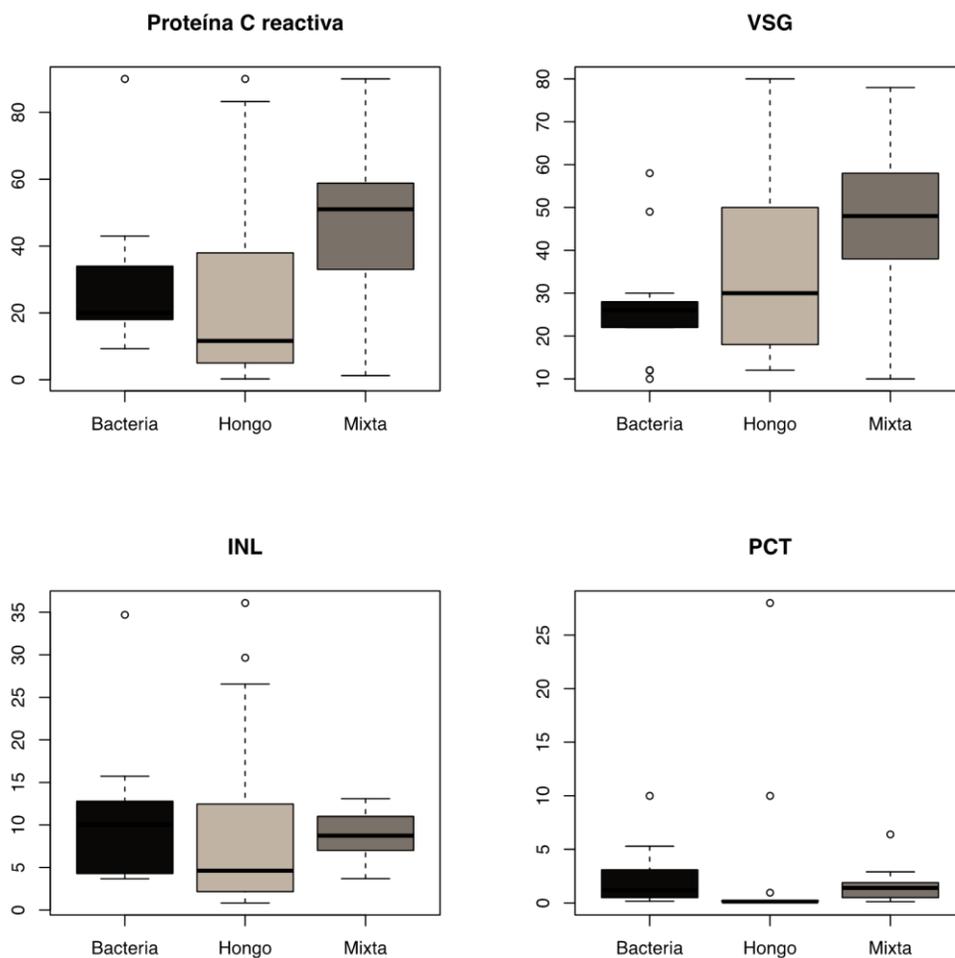


Figura 9. Nivel de los reactantes de la fase aguda de los pacientes. Gráficos de caja y bigotes que muestran la distribución de 4 biomarcadores a) Proteína C reactiva (PCR), b) Velocidad de sedimentación globular (VSG), c) índice neutrófilo-linocitico (INL) y d) Procalcitonina (PCT) para los grupos de patógeno identificado en las muestras clínicas.

Comparación con los resultados de cultivos

La relación entre los cultivos microbiológicos y la secuenciación Sanger fue baja, debido a que en la mayoría de los cultivos no se encontró crecimiento o éste no concordaba con los resultados de la secuenciación y aún más importante, en varios casos, no tenía concordancia con la clínica del paciente estudiado. A diferencia del

resultado reportado por cultivos, los resultados de patógenos identificados por secuenciación Sanger presentaron concordancia directa a la clínica de los pacientes. Por ejemplo, los pacientes en los que se realizó estudio del derrame pleural, al ser líquidos generalmente estériles, la positividad determinada por técnicas moleculares (PCR y secuenciación Sanger) en cualquiera de los marcadores genómicos indicaba infección, lo que coincidía con el cuadro clínico y la respuesta al tratamiento dirigido.

En cuanto a la eficiencia de resultados entre la secuenciación Sanger y los cultivos; se encontró que mediante la secuenciación Sanger en 28 de 30 (93.33%) se pudo determinar la presencia del agente causal de la infección, mientras que en los cultivos se determinó en 18 de 30 (60%), esta diferencia en la positividad o determinación del agente causal de infección fue estadísticamente significativa ($P = 9.47 \times 10^{-8}$).

Es de resaltar que solamente hubo coincidencia de resultados para la identificación del agente causal de la infección mediante secuenciación Sanger con el cultivo en 5 muestras (16.66%); este resultado con ambas técnicas determinó la identificación de la bacteria *Staphylococcus aureus* en las muestras clínicas analizadas.

Además, es de resaltar que en las muestras que se identificó la presencia de *S. aureus* también se determinó la presencia de *Aspergillus* spp. lo que sugiere una co-infección y la posibilidad de sugerir relaciones bióticas entre ambas especies en pacientes infectados, como ha sido reportado (**Ramírez, 2015**). Dentro de los patógenos identificados por secuenciación Sanger en este estudio, los más prevalentes pertenecían en género *Aspergillus* sp., seguidos de *Candida krusei* y *Cryptococcus neoformans*, en cuanto a las bacterias, las más prevalentes fueron *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas putrida*. Se observó la asociación en 4 pacientes de infección por bacterias y hongos, siendo los microorganismos más asociados *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus* sp., relacionándose directamente con el cuadro clínico.

DISCUSIÓN

El advenimiento de las diversas técnicas de diagnóstico molecular en la era post pandemia, nos hace reflexionar sobre el uso potencial de la secuenciación y el uso de marcadores genómicos para el diagnóstico temprano de infecciones y la personalización de la medicina. En este trabajo describimos el uso de la detección molecular por medio de PCR y secuenciación Sanger de los marcadores genómicos 16S y 18S/eEF1 para bacterias u hongos, respectivamente, para la identificación del microorganismo patógeno en pacientes hospitalizados por sospecha de infecciones severas. El uso de los marcadores genómicos 16S y 18S/eEF1 ha sido ampliamente usado en estudios de análisis de comunidades microbianas y mediante la secuenciación NGS. En este estudio quisimos aplicar la detección de patógenos en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infecciones con el fin de tener un diagnóstico más rápido y exacto respecto a la técnica convencional de cultivos microbiológicos.

Para todos los pacientes que integraron la cohorte de estudio, el tiempo de entrega del resultado de la detección de bacteria u hongo por PCR fue de 1 día comparado con al menos siete días (en promedio) y 14 días (en promedio) de cultivo e identificación morfológica para bacterias y hongos, respectivamente. De acuerdo con los tiempos de entrega de resultados para determinar la presencia de bacteria u hongo, el uso de PCR permite optimizar el tiempo para la toma de decisiones clínicas de manera más eficiente e iniciar el tratamiento dirigido de forma oportuna. A partir de los resultados positivos para los genes 16S y 18S/eEF1 se continuó con el flujo de trabajo hacia la secuenciación Sanger.

Este tipo de secuenciación ha sido ampliamente utilizada para detectar mutaciones, secuenciar genes completos o regiones de interés, corroborar secuencia de plásmidos y confirmar resultados de NGS (**Crossley, 2020**). Además, la secuenciación Sanger ha sido empleada para la identificación de patógenos a nivel de género o especie en gran variedad de muestras (**Church, 2020**). Los parámetros

seleccionados de análisis de las secuencias tuvieron como finalidad asegurar una identificación confiable del patógeno de la muestra clínica tomada.

A pesar de las diferencias y la diversidad entre el tipo de muestras clínicas, se obtuvo la identificación del patógeno presente en el 93.3% de las muestras sin diferencias estadísticas en los valores de calidad (Q) entre las secuencias para el gen 16S, 18S y eEF1 ($P = 0.648$) (FS1). Entre las ventajas de la secuenciación Sanger se ha descrito el bajo costo por muestra, un flujo de trabajo rápido y sencillo y su alta confiabilidad, ya que tiene valores de calidad de $Q > 30$. Por otro lado, la secuenciación NGS permite la secuenciación en volumen; mientras que la secuenciación Sanger produce información sólo para un fragmento de ADN a la vez, la secuenciación NGS permite la secuenciación masiva en paralelo, secuenciando millones de fragmentos simultáneamente por ejecución. En el caso de muestras clínicas, cuando se requiere la identificación del patógeno causante de infección en un paciente críticamente enfermo, la secuenciación Sanger permite la secuenciación en un tiempo menor al requerido para realizar un cultivo microbiológico y con mayor sensibilidad y especificidad.

En este estudio el tiempo promedio de obtención de resultado por secuenciación Sanger fue de cinco días, tiempo que permitió establecer un diagnóstico oportuno para el posterior inicio del tratamiento con adecuados desenlaces terapéuticos y respuesta clínica favorable. Con un costo total por PCR y secuenciación de 3000 pesos mexicanos, esta estrategia molecular constituye un enfoque viable para los hospitales mexicanos, debido a que los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico aunque están estandarizados en el protocolo de atención de pacientes infectados (**Gorordo,2020**), hasta el día de hoy no han representado superioridad ante métodos moleculares de diagnóstico, los cuales reducen los días de estancia intrahospitalaria, mortalidad y costos en la atención médica.

Además, El PCR y secuenciación Sanger ofrecen la ventaja de poder generar un resultado rápido y conciso en el caso de bacterias no cultivables o intracelulares

obligadas; además, en el caso de hongos, estas técnicas moleculares superan las dificultades intrínsecas del cultivo e identificación morfológica de estos microorganismos.

Los cultivos microbiológicos, además de presentar la desventaja de necesitar al menos siete días (para bacterias) o incluso 14 días (para hongos), también mostraron menos precisión en la identificación del agente causal; ya que, en solo 18 de las 30 muestras fue posible la identificación del agente causal de infección y en solo 6 muestras el resultado tuvo concordancia con el resultado de la secuenciación. Estas discrepancias podrían explicarse por la contaminación de los cultivos, así como del tiempo de incubación de los microorganismos y del tiempo empleado que regularmente se requiere para la identificación microbiológica.

De los 28 patógenos identificados por secuenciación Sanger la concordancia fue directa con la clínica de los pacientes estudiados y esto se comprobó con la respuesta al tratamiento de forma temprana, con desenlaces primarios con mejoría clínica y respuesta sintomática al inicio del tratamiento. En contraste, debido a la severidad de las infecciones y aunadas a las comorbilidades de los participantes, 8 de pacientes fallecieron durante el estudio.

La relación entre varios microorganismos en infecciones generalmente, no es pensada en zonas de muestras estériles, sin embargo, la presencia de infecciones polimicrobianas nos hablan de la naturaleza de la muestra o el grado de severidad en la infección. Sin embargo, se observó la asociación en 4 pacientes de infección por bacterias y hongos, siendo los microorganismos más asociados *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus spp.*, relacionándose directamente con el cuadro clínico y no con contaminación en la toma o procesamiento de la muestra.

La interacción intrínseca entre hongos y bacterias ha permitido su coevolución, posibilitando asociaciones polimicrobianas de sinergismo, antagonismo, mutualismo, entre otras. Un ejemplo de sinergismo *in vitro* se describe en la

interacción *Candida albicans-Staphylococcus aureus*, en la que las imágenes obtenidas mediante microscopía láser de barrido confocal sugieren que la levadura puede proporcionar una estrategia de invasión a los estafilococos, debido al arrastre por las hifas de *Candida* durante su penetración a través del epitelio. (**Ramírez Granillo, 2015**). El contacto físico entre ambos microorganismos contribuye sinérgicamente al desarrollo de biopelículas de especies mixtas de estafilococos con *C. albicans* y *A. fumigatus*. Asimismo, ciertas moléculas efectoras secretadas por estafilococos, como la coagulasa, la Efb y los superantígenos, pueden modular de forma cooperativa el proceso de infección de *C. albicans* y *A. fumigatus* a través de efectos sobre la respuesta inmunitaria. (**Kumari, 2019**). Las bacterias y los hongos coexisten en varios sitios del cuerpo humano y es probable que interactúen entre sí, lo que tiene como resultado impactos significativos tanto en la salud humana como en su desarrollo evolutivo.

Es de destacar que la mayoría de los pacientes del estudio presentaron un resultado positivo para el marcador genómico 18S/eEF1, por lo que la asociación positiva al desarrollo de estas enfermedades se podría deber a estados de inmunosupresión, por infección previa con VIH e incluso por los efectos del cambio climático que ha proporcionado un ecosistema que se calienta y favorece el crecimiento de moho, los cuales han proporcionado huéspedes humanos más susceptibles (**Wagner, 2018**).

Los factores de riesgo significativos para el desarrollo de micosis se pueden estratificar en exposiciones ambientales, ocupacionales y relacionadas con la naturaleza. Los principales factores de riesgo relacionados con el medio ambiente para el desarrollo de estas enfermedades incluyen la residencia o los viajes a regiones endémicas, la alteración de la materia vegetal o del suelo y la exposición por inhalación en entornos de alto riesgo (**Porafzka, 2013**). Siendo estos factores condiciones establecidas en el desarrollo de micosis sistémicas, las cuales se encuentran presentes en la localidad estudiada.

Características demográficas de los pacientes y factores de riesgo

En el grupo de pacientes incluidos en este estudio predominaron los hombres con un 63.3% y el grupo de edad más predominante fue de 20 a 30 años. La comorbilidad más frecuente fue hipertensión arterial y diabetes mellitus, entidades nosológicas clásicamente asociadas a infecciones severas. La diabetes mellitus está relacionada a alteraciones en la inmunidad y esto está reflejado a la disfunción polimorfonuclear. Por lo tanto, las infecciones son más comunes en este grupo de pacientes (**Porafzka,2013**). La reducción de la quimiotaxis de los polimorfonucleares (PMN), la alteración de la transmigración a través del endotelio vascular y la reducción de la producción de superóxido son los tres componentes principales de la disfunción de los PMN en pacientes con diabetes mellitus. Por lo tanto, en caso de micosis sistémicas debemos de tener alto índice de sospecha debido a que estos microorganismos cuentan con otros mecanismos de invasión (**Porafzka,2013**)

Relación de la presentación clínica y los resultados por secuenciación

Sanger

En cuanto a la presentación clínica de este grupo de pacientes, las más prevalentes fueron las neumonías, las cuales, sin un diagnóstico temprano y oportuno pueden representar altos índices de letalidad y mortalidad. Por lo que, el empleo del diagnóstico molecular es de vital importancia, aún más en neumonías asociadas a micosis sistémicas. En segundo lugar, se encontraron las neuroinfecciones, cuya presentación clínica se asoció principalmente a cefalea, sin datos de meningismo y fiebre, en este caso la identificación de la presencia del marcador genómico ayudó a la detección temprana de micosis sistémicas en el sistema nervioso central (SNC) y al tratamiento oportuno.

La presentación clínica de pacientes con infecciones por bacterias presentó la respuesta inflamatoria clásica con fiebre y bacteremia asociada probablemente a la

respuesta inmunológica inducida por estos microorganismos. Por otro lado, en pacientes con infecciones por hongos al no contar con estructuras que condicionen antigenicidad, la respuesta inflamatoria no se manifiesta de la forma habitual por lo que no son considerados como posibles patógenos causantes de infección (**Wagner, 2018**). Debido a esto, la necesidad imperativa del desarrollo de algún marcador sérico para el tamizaje de micosis sistémicas de forma rápida ha llevado al uso de herramientas genómicas para la detección temprana como es el caso en este estudio del tamizaje a través de los genes 18S/eEF1.

De acuerdo con las guías “Surviving sepsis 2021” (**Evans, 2021**), las infecciones micóticas se relacionan a diabetes mellitus, inmunosupresión, neutropenia y uso de antibioticoterapia de amplio espectro. Estas infecciones se sospechan a través de biomarcadores como beta-D-glucano y antígenos específicos para micosis sistémicas. Sin embargo, existen microorganismos que no producen la respuesta inmunológica habitual, por lo que no se cuenta con marcadores séricos específicos para la determinación de micosis sistémica, además del bajo rendimiento diagnóstico de estos marcadores en contraste a el diagnóstico molecular por secuenciación Sanger (**Wickes, 2018**).

Asociación de reactantes de fase aguda con la secuenciación Sanger.

En infecciones está establecido la toma de reactantes de fase aguda y biomarcadores que nos hablen de la posibilidad de este grupo de enfermedades en pacientes con respuesta inflamatoria. Sin embargo, hasta el día de hoy no existe un biomarcador que discrimine con alto rendimiento diagnóstico las infecciones por hongos o bacterias. En este estudio comparamos los biomarcadores habituales, los cuales pueden llegar a ser poco sensibles e incluso presentar falsos positivos, contrastando notablemente respecto a la precisión de los resultados que se obtienen mediante PCR y secuenciación Sanger.

En reportes previos, la sospecha de infecciones en pacientes se identificó en solo alrededor del 30% de los pacientes con sepsis, y esto depende si hubo algún tratamiento previo con antibióticos (**Hotchkiss, 2016**). Además, los signos clínicos tempranos de sepsis, como fiebre, taquicardia y leucocitosis, son inespecíficos y se superponen con signos de inflamación sistémica. Otros signos como la hipotensión arterial, la trombocitopenia o el aumento de las concentraciones de lactato sugieren estados de infección avanzados. Sin embargo, su incremento puede determinarse demasiado tarde para un tratamiento que salve la vida y la progresión a la disfunción orgánica. Por lo tanto, la demora en el diagnóstico y tratamiento de la sepsis aumenta la mortalidad, prolonga la estancia hospitalaria y aumenta los costos, lo que destaca la necesidad de biomarcadores de diagnóstico temprano y confiables.

Los biomarcadores como PCT, proteína C reactiva y VSG dependen de varios sistemas celulares y humorales que se activan durante la sepsis, con la posterior liberación de varias moléculas que median la respuesta del huésped a la infección. Se han investigado varios biomarcadores potenciales que se encuentran en el torrente sanguíneo por su capacidad para diagnosticar sepsis, estimar su gravedad y proporcionar un pronóstico (**Huang, 2020**). Un ejemplo de esto es, la PCT, un péptido de 116 aminoácidos para la identificación de infecciones bacterianas debido a que tiene varias ventajas sobre otros biomarcadores potenciales, es decir, un amplio rango biológico, corto tiempo de inducción después del estímulo bacteriano y larga vida media (**Samsudin, 2017**).

Sin embargo, en nuestro estudio la elevación de este marcador no representa valor estadístico, debido a que la mayor proporción de nuestros pacientes contaba con micosis sistémicas, además que en el grupo de pacientes positivos para 16S, la positividad de este biomarcador no se asoció directamente con la severidad del cuadro clínico.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a través de este estudio, nos sugieren que la utilización de marcadores genómicos son más útiles que la realización de cultivos microbiológicos, debido a que en gran parte los pacientes con enfermedades infecciosas, por la severidad de los cuadros clínicos, no se tiene cuenta con los días necesarios que requiere un estudio de microbiología, para la determinación del agente etiológico. Se demostró que la realización de ésta metodología para identificación de microorganismos es más viable, en términos de tiempo y resultados clínicos en pacientes con sepsis.

En este estudio, se midió la relación entre reactantes de fase aguda e INL en pacientes infectados, donde se encontraron diferencias entre los valores para la determinación y estratificación de los estados infecciosos, encontrándose que la elevación de la procalcitonina está positiva en la mayoría de las infecciones por bacterias, como es bien sabido. Sin embargo, entre otros marcadores, encontramos que el INL se encontró por encima del corte habitual descrito para estados infecciosos, comparado con la cohorte reportada más amplia a nivel mundial. Siendo estos parámetros, medidas cuantitativas que usualmente son tomadas en cuenta en el abordaje de pacientes infectados, que en pacientes con infecciones por microorganismos con perfiles ambiguos pueden estar o no positivos.

En cuanto a la eficiencia de resultados entre la secuenciación Sanger y los cultivos; se encontró que mediante la secuenciación Sanger en 28 de 30 (93.33%) se pudo determinar la presencia del agente causal de la infección, mientras que en los cultivos se determinó en 18 de 30 (60%), esta diferencia en la positividad o determinación del agente causal de infección fue estadísticamente significativa.

En varios de los pacientes de este estudio, las infecciones micóticas no fueron consideradas en primera instancia, ya que por lo general se tenía la tendencia a no tomarlos en cuenta como los microorganismos principales en infecciones severas.

No obstante, debido a las comorbilidades y lo registrado en los hospitales del estado, se ha encontrado una frecuencia alta de micosis sistémica en la población; por esto en este estudio se determinó la relación entre la sospecha clínica y el resultado de los marcadores genómicos y la secuenciación Sanger para organismos de naturaleza micótica.

De acuerdo a lo anterior, este estudio se encontró que el tamizaje de pacientes infectados en etapas tempranas de infecciones, a través de la toma de marcadores genómicos (16s y 18s/eEF1) para la detección del agente etiológico por secuenciación Sanger es de gran utilidad debido a que a través de este algoritmo, se puede guiar e instaurar tratamientos de manera oportuna, limitando la mortalidad, complicaciones, días de estancia intrahospitalaria y costos para la salud pública, presentado mejores desenlaces primarios en la atención del paciente, siendo una herramienta útil y valiosa en pacientes con sepsis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, Machado FR, Mcintyre L, Ostermann M, Prescott HC, Schorr C, Simpson S, Wiersinga WJ, Alshamsi F, Angus DC, Arabi Y, Azevedo L, Beale R, Beilman G, Belley-Cote E, Burry L, Cecconi M, Centofanti J, Coz Yataco A, De Waele J, Dellinger RP, Doi K, Du B, Estenssoro E, Ferrer R, Gomersall C, Hodgson C, Møller MH, Iwashyna T, Jacob S, Kleinpell R, Klompas M, Koh Y, Kumar A, Kwizera A, Lobo S, Masur H, McGloughlin S, Mehta S, Mehta Y, Mer M, Nunnally M, Oczkowski S, Osborn T, Papathanassoglou E, Perner A, Puskarich M, Roberts J, Schweickert W, Seckel M, Sevransky J, Sprung CL, Welte T, Zimmerman J, Levy M. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 2021 Nov;47(11):1181-1247. doi: 10.1007/s00134-021-06506-y.
2. Bozlu G, Tanriverdi H, Aslan G, et al. El valor de las proteínas de la fase aguda y la prueba LightCycler® SeptiFast en el diagnóstico de las infecciones bacterianas y virales en los pacientes pediátricos *Arch Argent Pediatr* 2018;116(1):35-41.
3. Huang I, Pranata R, Lim MA, Oehadian A, Alisjahbana B. C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: a meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis.* 2020 Jan-Dec;14:1753466620937175. doi: 10.1177/1753466620937175.
4. Bryan Lau, Richey. C-Reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *JAMA*, 2016.
5. Escadafal C, Incardona S, Fernandez-Carballo BL, Dittrich S. The good and the bad: using C reactive protein to distinguish bacterial from non-bacterial

infection among febrile patients in low-resource settings. *BMJ Glob Health*. 2020;5(5):e002396. doi: 10.1136/bmjgh-2020-002396.

6. Forget P, Khalifa C, Defour JP, Latinne D, Van Pel MC, De Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res Notes*. 2017 Jan 3;10(1):12. doi: 10.1186/s13104-016-2335-5.
7. Gobernado, M, López-Hontangas, J. L. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc Microbiol Clin* 2003;21(Supl. 2):54-60
8. Chen L, Cai Y, Zhou G, Shi X, Su J, Chen G, Lin K. Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens. *PLoS One*. 2014; 14;9(2):e88886. doi: 10.1371/journal.pone.0088886.
9. Jenkins C, Ling CL, Ciesielczuk HL, Lockwood J, Hopkins S, McHugh TD, Gillespie SH, Kibbler CC. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 4):483-488. doi: 10.1099/jmm.0.030387-0.
10. Sarah kidd, catriona halliday, helen alexiou and david ellis. Descriptions of medical fungi. Third edition (revised November 2016). Printed in adelaide by Newstyle Printing. 41 Manchester Street Mile End, South australia 5031
11. S.A. Balajee, J. Houbraken, P.E. Verweij, S.B. Hong, T. Yaguchi, J. Varga, R.A. Samson. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud. Mycol.*, 59 (2007), pp. 39-46, 10.3114/sim.2007.59.05

12. Sidra Aslama, Aisha Tahirb, Muhammad Farhan Aslamc, Muhammad Waqar Alamd, Arshad Ali Shedayie and Sehrish Sadiaa. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of plant interactions*, 2017, VOL. 12, NO. 1, 493–504
13. Beate M. Crossley, Jianfa Bai, Amy Glaser, Roger Maes, Elizabeth Porter, Mary Lea Killian, Travis Clement, Kathy Toohey-Kurth. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2020, Vol. 32(6) 767–775
14. Petti, C. A., Polage, C. R. & Schreckenberger, P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6123–6125 (2005).
15. Janda, J. M. & Abbott, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761–2764 (2007).
16. Vázquez AC, Arriaga-Pizano L, Ferat-Osorio E. Cellular Markers of Immunosuppression in Sepsis. *Arch Med Res.* 2021 Nov;52(8):828-835. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.10.001.
17. Rammaert B, Lanternier F, Poirée S, Kania R, Lortholary O. Diabetes and mucormycosis: a complex interplay. *Diabetes Metab.* 2012 Jun;38(3):193-204. doi: 10.1016/j.diabet.2012.01.002.
18. Gu W, Deng X, Lee M, Sucu YD, Arevalo S, Stryke D, Federman S, Gopez A, Reyes K, Zorn K, Sample H, Yu G, Ishpuniani G, Briggs B, Chow ED, Berger A, Wilson MR, Wang C, Hsu E, Miller S, DeRisi JL, Chiu CY. Rapid

pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. *Nat Med.* 2021 Jan;27(1):115-124. doi: 10.1038/s41591-020-1105-z.

19. Huzefa A Raja, Andrew N Miller, Cedric J Pearce, Nicholas H Oberlies. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod.* 2017 Mar 24;80(3):756-770. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085
20. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000;38: 3623–3630.8.
21. Deirdre L Church, Lorenzo Cerutti, Antoine Gürtler, Thomas Griener, Adrian Zelazny, Stefan Emler. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Sep 9;33(4):e00053-19. doi: 10.1128/CMR.00053-19. Print 2020 Sep 16.
22. Kidd SE, Chen SC, Meyer W, Halliday CL. A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? *Front Microbiol.* 2020; 14;10:2903. doi: 10.3389/fmicb.2019.02903.
23. Ramírez Granillo A, Canales MG, Espíndola ME, Martínez Rivera MA, de Lucio VM, Tovar AV. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2015;15:33. doi: 10.1186/s12866-015-0363-2.

24. Gorordo-Delsol LA, Merinos-Sánchez G, Estrada-Escobar RA, Medveczky-Ordoñez NI, Amezcua-Gutiérrez MA, Morales-Segura MA, Uribe-Moya SE. Sepsis and septic shock in emergency departments of Mexico: a multicenter point prevalence study. *Gac Med Mex.* 2020;156(6):486-492. English. doi: 10.24875/GMM.M21000492.
25. Wagner K, Springer B, Pires VP, Keller PM. Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture. *Sci Rep.* 2018 May 3;8(1):6964. doi: 10.1038/s41598-018-25129-w.
26. Poradzka A, Jasik M, Karnafel W, Fiedor P. Clinical aspects of fungal infections in diabetes. *Acta Pol Pharm.* 2013;70(4):587-96.
27. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun.* 2018 Dec 3;9(1):5135. doi: 10.1038/s41467-018-07556-5.
28. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Jun 30;2:16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.
29. Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. *PLoS One.* 2016 3;11(8):e0160278. doi: 10.1371/journal.pone.0160278. PMID: 27486746.
30. Samsudin I, Vasikaran SD. Clinical Utility and Measurement of Procalcitonin. *Clin Biochem Rev.* 2017;38(2):59-68.
31. Zhang K, Li H, Zhang L, Liao W, Cai L, Li X, Pan W, Zhang Q. The Change in the Neutrophil/Lymphocyte Ratio Predicts the Prognosis of Patients with

Cryptococcal Meningitis. *Mycopathologia*. 2021 Dec;186(6):857-862. doi: 10.1007/s11046-021-00553-1.

32. Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. *Crit Care*. 2022;26(1):14. doi: 10.1186/s13054-021-03862-5.
33. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(5):426-35. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70323-7.
34. Afshari A, Harbarth S. Procalcitonin as diagnostic biomarker of sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(5):382-4. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70026-4. Epub 2013 Feb 1.
35. Cohn B. Can procalcitonin differentiate sepsis from systemic inflammatory response syndrome without infection? *Ann Emerg Med*. 2014;63(5):631-2. doi: 10.1016/j.annemergmed.2013.12.014.
36. Rammaert B, Lanternier F, Poirée S, Kania R, Lortholary O. Diabetes and mucormycosis: a complex interplay. *Diabetes Metab*. 2012;38(3):193-204. doi: 10.1016/j.diabet.2012.01.002.

ANEXOS

Título

RELACIÓN ENTRE EL VALOR PREDICTIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LA FASE AGUDA E ÍNDICE NEUTRÓFILO-LINFOCITO EN PACIENTES INFECTADOS Y LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE INFECCIOSO USANDO MARCADORES MOLECULARES GENÓMICOS (16S Y 18S/eEF1) Y SECUENCIACIÓN SANGER.

2. Investigador responsable

Nombre	Dr. Víctor Manuel Fong Flores	Firma
Puesto	Médico residente de Medicina Interna	
Depto. o Servicio	Medicina Interna	
Teléfono	6121697342	Extensión
Correo electrónico	vfong20@outlook.com	Celular 6121697342

3. Investigador suplente

Nombre	Firma
Depto. o Servicio	
Teléfono	Extensión
Correo electrónico	Celular

4. Fuente de financiamiento

Fondos Federales

Fondos externos

5. Tipo de investigación

Básica

Clínica

Epidemiológica

Económica

Otra

6. Programación

Fecha de inicio :	01 enero 2020
Fecha de término:	30 mayo de 2022

7. Productos a entregar (anote la cantidad en los recuadros)

Artículos científicos Libros Capítulos de libro
Tesis de maestría Tesis de doctorado Ponencias o carteles

8. Investigadores Participantes (sin incluir al responsable y suplente)*:

Nombre	Departamento	Otra Institución	Firma

*Agregar más filas a la tabla en caso necesario.



CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Registro de Protocolo: **083-083-2021**

Título del Protocolo: **RELACIÓN ENTRE EL VALOR PREDICTIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LA FASE AGUDA E ÍNDICE NEUTRÓFILO-LINFOCITO EN PACIENTES INFECTADOS Y LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE INFECCIOSO USANDO MARCADORES MOLECULARES GENÓMICOS (16S Y 18S/EEF1) Y SECUENCIACIÓN SANGER.**

Investigador Principal: Dr. Víctor Manuel Fong Flores.

Fecha de sometimiento del proyecto: 01 octubre de 2019.

Fecha de aprobación por las comisiones: 01 de mayo de 2021

Fecha aproximada de término: 30 de mayo de 2022

Instrucciones: Favor de anotar en los encabezados de las columnas los meses y año del bimestre a planificar. En el renglón que corresponda marcar con una X para la actividad correspondiente si aplica en el protocolo.

Fecha de inicio: Enero 2020	BIMESTRE											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ene. Feb 2020	Mar- Abril 2020	May- Jun 2020	Jul- Ago 2020	Sep- Oct 2020	Nov- Dic 2020	Ene. Feb 2021	Mar- Abril 2021	May- Jun 2021	Jul-Ago 2021	Sep- Oct 2021	Nov- Dic 2021
ACTIVIDAD												
Estandarización de técnica	X											
Inclusión de pacientes	X	x	x	x	x	x						
Realización de estudios	x	x	x	x	x	x						
Análisis de los estudios							x	x	x			
Presentación de resultados									x	X		
Elaboración de manuscritos										x	X	
Publicación											x	x
OTRAS ACTIVIDADES (ESPECIFICAR)												

Nombre y firma del investigador principal

Hospital General Juan María de Salvatierra

FORMATO COMITÉ DE BIOSEGURIDAD

FECHA	DIA	MES	AÑO
	01	05	2021

NÚMERO ASIGNADO POR LA DIRECCION DE INVESTIGACIÓN A SU PROYECTO:

083-083-2021

TÍTULO COMPLETO DE SU PROYECTO: RELACIÓN ENTRE EL VALOR PREDICTIVO DE LAS PROTEÍNAS DE LA FASE AGUDA E ÍNDICE NEUTRÓFILO-LINFOCITO EN PACIENTES INFECTADOS Y LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE INFECCIOSO USANDO MARCADORES MOLECULARES GENÓMICOS (16S Y 18S/eEF1) Y SECUENCIACIÓN SANGER.

Evaluación

A. Indique el nivel de Bioseguridad de este estudio.

BSL1, BSL2, BSL3 o BSL4	
No aplica	xxx

B. En el desarrollo de este protocolo trabajarán con muestras biológicas de pacientes, modelos animales, microorganismos, plásmidos, organismos genéticamente modificados y/o utilizará material radioactivo, fuentes radiactivas no encapsuladas o agente(s) corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos o inflamables?

SI xxx	NO aplica
--------	-----------

Si la respuesta es “NO aplica” a las preguntas anteriores lea el siguiente párrafo, firme y entregue únicamente esta hoja.

Como investigador responsable del protocolo de investigación sometido a revisión por el Comité de Bioseguridad CERTIFICO, bajo protesta de decir verdad, que la información proporcionada es verdad.

Víctor Manuel Fong Flores.

Nombre y firma del(los) investigador(es) responsable(s)

En caso de que la respuesta sea “SI” a la pregunta 2 continúe proporcionando toda la información que se solicita a continuación:

1. Durante el desarrollo del protocolo utilizará y/o generará materiales o Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) como son muestras clínicas, tejidos humanos, modelos animales o microorganismos?

SI xxx	NO
--------	----

1a. Anote en cada renglón el nombre del **RPBI**, los lugares específicos en donde se obtendrán y donde se llevará a cabo el análisis de las muestras biológicas.

MATERIAL	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA	LUGAR DE ANÁLISIS DE LA MUESTRA
a)		
b)		
c)		
d)		
e)		
f)		

1b. Describa los procedimientos que utilizará para inactivarlos, manejarlos y desecharlos. Especifique claramente el color de los envases en que los deposita.

MATERIAL	PROCEDIMIENTO	COLOR DE ENVASE
a)		
b)		
c)		
d)		
e)		
f)		

2.- Si en su proyecto utilizarán metodologías que involucren **DNA recombinante (DNAr)**, llene la siguiente tabla. Si es necesario anexe líneas.

ORIGEN DEL DNA	HUÉSPED	VECTOR	GRUPO DE RIESGO	USO EXPERIMENTAL

2a. Mencione las medidas de confinamiento para el manejo de riesgo, que utilizará en las actividades que involucren DNA recombinante.

2b. Describa el procedimiento para el posible tratamiento y medidas para la eliminación de residuos que involucren DNA recombinante o fragmentos de ácidos nucleicos de cualquier origen generados en la realización del proyecto.

2c Si en su protocolo se expondrá a animales vivos a rDNA, células con rDNA o virus recombinantes, describa su procedimiento de emergencia en caso de liberación accidental de algún animal expuesto a rDNA.

3- En su proyecto, ¿utilizará y/o generará materiales o Residuos Químicos Peligrosos (RQP) con características CRETI (corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable)?

SI	NO x
----	------

3a.- Anote en cada fila el nombre de los materiales peligrosos o RQP, su código CRETI, el procedimiento para desecharlos y lineamientos para atender emergencias en caso de ruptura del envase, derrame, ingestión o inhalación accidental

MATERIAL	CODIGO CRETI	PROCEDIMIENTO PARA DESECHARLO	LINEAMIENTOS DE EMERGENCIA
a)			
b)			
c)			
d)			
e)			

4.- ¿En el proyecto se utilizará cualquier fuente de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, partículas alfa, beta, neutrones o cualquier material radiactivo) o fuentes radiactivas no encapsuladas?

SI	No x
----	------

4a. Señale el tipo de radiación que utilizará.

4b. Indique cuanta radiación recibirá el paciente por día y/o experimento, estudio, etc.

4c. Lugar donde se realizará la manipulación del material radiactivo

4d. Describa el procedimiento que usará para el desecho de los residuos radiactivos

4e. Indique el número de licencia de la CNSNS y nombre del encargado de seguridad radiológica autorizado para uso de dichas fuentes y lugar (ej. nombre del laboratorio, dirección, teléfono, etc.) de asignación.

5. Si las muestras (desechos o cualquier producto o sustancia de origen humano, animal o microorganismos) tuvieron que ser transportadas entre las diferentes áreas del hospital, de otra institución al HGEJMS o fuera de nuestra Institución, especifique:

-CÓMO:

-QUIÉN:

-PERIODICIDAD:

- PERMISO OTORGADO POR LA COFEPRIS A LA COMPAÑIA QUE TRANSPORTARÁ LAS MUESTRAS.

6. Describa brevemente la infraestructura y condiciones de trabajo con que cuenta para la realización de su proyecto, en relación con los puntos anteriores.





1. El protocolo corresponde a:
GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LAS CONSIDERACIONES ÉTICAS

a) Investigación sin riesgo ¹

SI NO

¹Técnicas y métodos de investigación documental, no se realiza intervención o modificación relacionada con variables fisiológicas, psicológicas o sociales, es decir, sólo entrevistas, revisión de expedientes clínicos, cuestionarios en los que no se traten aspectos sensitivos de su conducta.

b) Investigación con riesgo mínimo ²

SI NO

2 Estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos para diagnóstico o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: somatometría, pruebas de agudeza auditiva, electrocardiograma, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 40 ml en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean medicamentos de investigación no registrados por la Secretaría de Salud (SS).

c) Investigación con riesgo mayor que el mínimo ³

SI NO

3. Aquel estudio en que las probabilidades de afectar al sujeto son significativas entre las que se consideran: estudios con exposición a radiaciones, ensayos clínicos para estudios farmacológicos en fases II a IV para medicamentos que no son considerados de uso común o con modalidades en sus indicaciones o vías de administración diferentes a los establecidos; ensayos clínicos con nuevos

dispositivos o procedimientos quirúrgicos extracción de sangre mayor del 2 % de volumen circulantes en neonatos, amniocentesis y otras técnicas invasoras o procedimientos mayores, los que empleen métodos aleatorios de asignación a esquemas terapéuticos y los que tengan control con placebos, entre otros.

2. ¿Se incluye formato de consentimiento informado? ⁴

SI NO

4. Deberá incluirse en todos los protocolos que corresponden a riesgo mayor al mínimo y con riesgo mínimo. Tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensarse al investigador la obtención del consentimiento informado por escrito.

3. En el caso de incluir el Formato de Consentimiento Informado, señalar si están integrados los siguientes aspectos:

- | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|
| a) Justificación y objetivos de la investigación | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) Descripción de procedimientos a realizar y su propósito | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| c) Molestias y riesgos esperados | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| d) Beneficios que pudieran obtenerse | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| e) Posibles contribuciones y beneficios para participantes y sociedad | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| f) Procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| g) Garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| h) Menciona la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| i) La seguridad de que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| j) El compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |

- k) La disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendrá derecho, por parte de la institución de atención a la salud, en el caso de daños que la ameriten, directamente causadas por la investigación y, que si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación SI NO
- l) Indica los nombres y direcciones de dos testigos y la relación que éstos tengan con el sujeto de investigación SI NO
- m) Deberá ser firmado por dos testigos y por el sujeto de investigación o su representante legal, en su caso. Si el sujeto de investigación no supiere firmar, imprimirá su huella digital y en su nombre firmará otra persona que él designe SI NO
- n) El nombre y teléfono a la que el sujeto de investigación podrá dirigirse en caso de duda SI NO
- ñ) La seguridad de que el paciente se referiría para atención médica apropiada en caso necesario SI NO

4. Si el proyecto comprende investigación en menores de edad o incapaces

- a) El investigador debe asegurarse previamente de que se han hecho estudios semejantes en personas de mayor edad y en animales inmaduros, excepto cuando se trate de estudiar condiciones que son propias de la etapa neonatal o padecimientos específicos de ciertas edades SI NO
- b) Se obtiene el escrito de consentimiento informado de quienes ejercen la patria potestad o la representación legal del menor o incapaz de que se trate. SI NO
- c) Cuando la incapacidad mental y estado psicológico del menor o incapaz lo permitan, el investigador obtiene además la aceptación del sujeto de investigación, después de explicar lo que se pretende hacer. SI NO

5. Si el proyecto comprende investigación en mujeres de edad fértil, embarazadas, durante el trabajo de parto, puerperio, lactancia y en recién nacidos. **NO PROCEDE**

- a) ¿Se aseguró el investigador que existen investigaciones realizadas en mujeres no embarazadas que demuestren su seguridad, a excepción de estudios específicos que requieran de dicha condición? **SI** **NO**
- b) Si es investigación de riesgo mayor al mínimo, se asegura que existe beneficio terapéutico (las investigaciones sin beneficio terapéutico sobre el embarazo en mujeres embarazadas, no deberán representar un riesgo mayor al mínimo para la mujer, el embrión o el feto) **SI** **NO**
- c) Que las mujeres no están embarazadas, previamente a su aceptación como sujetos de investigación **SI** **NO**
- d) Que se procura disminuir las posibilidades de embarazo durante el desarrollo de la investigación **SI** **NO**
- e) Se planea obtener la carta de consentimiento informado de la mujer y de su cónyuge o concubinario, previa información de los riesgos posibles para el embrión, feto o recién nacido en su caso (el consentimiento del cónyuge o concubinario sólo podrá dispensarse en caso de incapacidad o imposibilidad fehaciente o manifiesta para proporcionarlo, porque el concubinario no se haga cargo de la mujer, o bien cuando exista riesgo inminente para la salud o la vida de la mujer, embrión, feto o recién nacido) **SI** **NO**
- f) La descripción del Proceso para obtener el consentimiento de participación en el estudio **SI** **NO**
- g) Se entrega de una copia del consentimiento a los responsables del cuidado del paciente **SI** **NO**
- h) La descripción de las medidas que se piensan seguir para mantener la confidencialidad de la información **SI** **NO**
- i) La experiencia del investigador principal y co-investigadores en este tipo de investigación **SI** **NO**
- j) Las posibles contribuciones y beneficios de este estudio para los participantes y para la sociedad **SI** **NO**