

**Universidad Católica de Santa María**

**Escuela de Postgrado**

**Doctorado en Ciencias de la Salud**



**Dinámica de la microbiota pulmonar y la validez de la next generation sequencing en la detección de patógenos en pacientes con ventilación mecánica - EsSalud - Arequipa 2021**

Tesis presentada por el Maestro:

**Quispe Medina, Katherine Milagros**

**ORCID: 0000-0001-9331-791X**

para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

Asesor:

**Dr. Villanueva Salas, José Antonio**

**ORCID:0000-0001-6050-0101**

**Arequipa - Perú**

**2024**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS**

Arequipa, 18 de Junio del 2024

**Dictamen: 011370-C-EPG-2024**

Visto el borrador del expediente 011370, presentado por:

**2019000122 - QUISPE MEDINA KATHERINE MILAGROS**

Titulado:

**DINÁMICA DE LA MICROBIOTA PULMONAR Y LA VALIDEZ DE LA NEXT GENERATION  
SEQUENCING EN LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN PACIENTES CON VENTILACIÓN  
MECÁNICA - ESSALUD - AREQUIPA 2021**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**29229000 - CHOCANO ROSAS DE VIZCARRA TERESA JESUS  
DICTAMINADOR**



**29203672 - ESCOBEDO VARGAS JANNET MARIA  
DICTAMINADOR**



**30401320 - FARFAN DELGADO MIGUEL FERNANDO  
DICTAMINADOR**



**16423061 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO  
DICTAMINADOR**



**29266386 - AZALGARA LAZO PATRICIO GONZALO  
DICTAMINADOR**



# Dinámica de la microbiota pulmonar y la validez de la next generation sequencing en la detección de patógenos en pacientes con ventilación mecánica - EsSalud - Arequipa 2021

## INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://tesis.ucsm.edu.pe">tesis.ucsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	3%
2	<a href="https://repositorio.unsa.edu.pe">repositorio.unsa.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	1%
4	<a href="https://dlib.bc.edu">dlib.bc.edu</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://issuu.com">issuu.com</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="https://renati.sunedu.gob.pe">renati.sunedu.gob.pe</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="https://nveo.org">nveo.org</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="https://aprenderly.com">aprenderly.com</a> Fuente de Internet	1%

### *DEDICATORIA*

A Dios que me ha dado salud y me ha permitido concluir este camino.

A mis padres, sin ellos no lo había logrado, su bendición y su apoyo me protege a lo largo de la vida, y me lleva por el camino del bien.

A las personas que me han acompañado en este proceso: Dr. Angel Mamani por la dedicada tutoría, por su participación activa durante el proyecto, y su apoyo constante; Lic. Yasmin Silvestre por su apoyo y empuje a pesar de las dificultades encontradas en el camino.

## *AGRADECIMIENTOS*

A la Universidad Católica de Santa María, por la oportunidad y confianza brindada al permitirme ser accesitaria a la beca de estudios otorgada en Resolución N° 26603 – R – 2019; por los conocimientos que me ha otorgado, para que finalmente obtenga el grado académico de doctor, sus aportes han sido muy valiosos.

Al proyecto CONCYTEC – Banco Mundial “Mejoramiento y ampliación de los servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia, proyecto “Doctorado en Ciencias de la Salud”, con código 09-2018-FONDECYT-BM en convenio con la Universidad Católica de Santa María como unidad ejecutora, que ha hecho posible la realización de mi tesis.

A mis maestros en esta etapa: Dra. Jani Pacheco, Dr. Jose Villanueva, Dr. Julio Bernabé, por tenerme la paciencia necesaria y haber destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, porque con sus consejos y apoyo se me ha permitido llegar al termino de esta tesis y obtener este grado académico.

Al Departamento de Emergencia y Cuidados Críticos del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo - EsSalud, donde me brindaron las facilidades para la realización del presente estudio en especial a la jefatura en la persona del Dr. Felipe Apaza, por su apoyo a pesar de las limitaciones dadas por la coyuntura de la pandemia.

## RESUMEN

La investigación se titula: “Dinámica de la microbiota pulmonar y la validez de la next generation sequencing en la detección de patógenos en pacientes con ventilación mecánica - EsSalud - Arequipa 2021”, presenta como objetivo general el establecer los cambios en la microbiota pulmonar durante la ventilación mecánica y la validez de la next generation sequencing (NGS) frente al diagnóstico de neumonía asociada a ventilador (NAV). Es un estudio observacional, descriptivo, de campo, de tipo longitudinal y no probabilístico por conveniencia, las técnicas utilizadas fueron la observación laboratorial y la observación documental. Se trabajó con 9 pacientes y 27 muestras recolectadas en tres puntos de tiempo, de pacientes de la unidad de cuidados intensivos de emergencia (UCIE) de EsSalud. Obteniéndose como principales conclusiones que los filos predominantes fueron: Proteobacterias, Firmicutes y Bacteroidota, y a nivel de género: *Acinetobacter* (17%), *Prevotella* (15%), *Streptococcus* (12%) y *Enterobacter* (9%); mientras que según el análisis de la diversidad beta entre grupos de tiempo no hubo una diferencia estadísticamente significativa, pero en el transcurso de los días se observa un incremento de la abundancia relativa de *Acinetobacter* y *Enterobacter*, una disminución de *Streptococcus* y un mantenimiento de la abundancia relativa de *Prevotella*, caracterizándose en todo momento la fuerte presencia de gérmenes nosocomiales, incluso dentro de las primeras 24 horas de ventilación mecánica; respecto a la sensibilidad de la prueba de NGS frente al diagnóstico de neumonía asociada a ventilador, esta fue del 25% y su especificidad fue del 93.3%.

**Palabras clave:** Microbiota pulmonar, Ventilación mecánica, Sensibilidad y especificidad, Next generation sequencing.

## ABSTRACT

The research is titled: “Dynamics of the lung microbiota and the validity of next generation sequencing in the detection of pathogens in patients with mechanical ventilation - EsSalud - Arequipa 2021”, presents as a general objective to establish the changes in the lung microbiota during mechanical ventilation and the validity of next generation sequencing (NGS) against the diagnosis of ventilator-associated pneumonia (VAP). It is an observational, descriptive, field study, longitudinal and non-probabilistic for convenience, the techniques used were laboratory observation and documentary observation. We worked with 9 patients and 27 samples collected at three time points, from patients in the emergency intensive care unit (ICU) of EsSalud. The main conclusions were obtained that the predominant phyla were: Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidota, and at the genus level: Acinetobacter (17%), Prevotella (15%), Streptococcus (12%) and Enterobacter (9%); while according to the analysis of beta diversity between time groups there was no statistically significant difference, but over the course of the days an increase in the relative abundance of Acinetobacter and Enterobacter, a decrease in Streptococcus and a maintenance of abundance was observed. relative of Prevotella, characterizing at all times the strong presence of nosocomial germs, even within the first 24 hours of mechanical ventilation; Regarding the sensitivity of the NGS test against the diagnosis of ventilator-associated pneumonia, it was 25% and its specificity was 93.3%.

**Keywords:** Lung microbiota, Mechanical ventilation, Sensitivity and specificity, Next generation sequencing.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO .....	4
1. MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Microbiota: definiciones básicas .....	5
1.2. Microbiota pulmonar .....	5
1.3. Microbiota pulmonar en la ventilación mecánica.....	8
1.4. Análisis de la diversidad de la microbiota.....	9
1.4.1. Diversidad alfa:.....	9
1.4.2. Diversidad beta .....	10
1.5. Técnicas para el estudio de la microbiota pulmonar: next generation sequencing	10
1.6. Muestreo del microbioma pulmonar .....	12
1.7. Neumonía asociada a ventilador.....	13
1.8. Validez de prueba diagnóstica.....	14
2. Antecedentes investigativos .....	15
CAPÍTULO II METODOLOGÍA .....	18
1. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL .....	19
1.1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación .....	19
1.2. Campo de Verificación .....	20
1.2.1. Ubicación espacial .....	20
1.2.2. Ubicación temporal.....	20
1.2.3. Unidades de estudio .....	20

1.3.	Estrategia de recolección de datos .....	22
1.3.1.	Extracción y amplificación de ADN .....	23
1.3.2.	Secuenciación por next generation sequencing .....	24
1.3.3.	Construcción, control de calidad y secuenciación de bibliotecas.....	24
1.3.4.	Procedimiento de análisis de datos .....	25
1.3.5.	Procesamiento de datos de secuenciación .....	25
1.3.6.	Clúster OTU y anotación taxonómica .....	26
1.4.	Análisis bioinformático .....	26
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		29
1.	RESULTADOS .....	30
1.1.	Datos del estudio .....	30
1.2.	Características clínicas de los pacientes .....	30
1.3.	PCR para amplificación del gen 16S rRNA .....	32
1.4.	Procesamiento de los datos para secuenciación .....	32
1.5.	Curvas de rarefacción .....	34
1.6.	Composición taxonómica de las muestras.....	34
1.7.	Composición taxonómica por puntos de tiempo .....	37
1.8.	Diversidad alfa en las muestras .....	42
1.9.	Diversidad beta.....	45
1.10.	Sensibilidad y especificidad de la NGS frente al diagnóstico de NAV.....	46
2.	DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....		54
RECOMENDACIONES .....		55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		56
ANEXOS.....		66
ANEXO 1 FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS		

ANEXO 2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

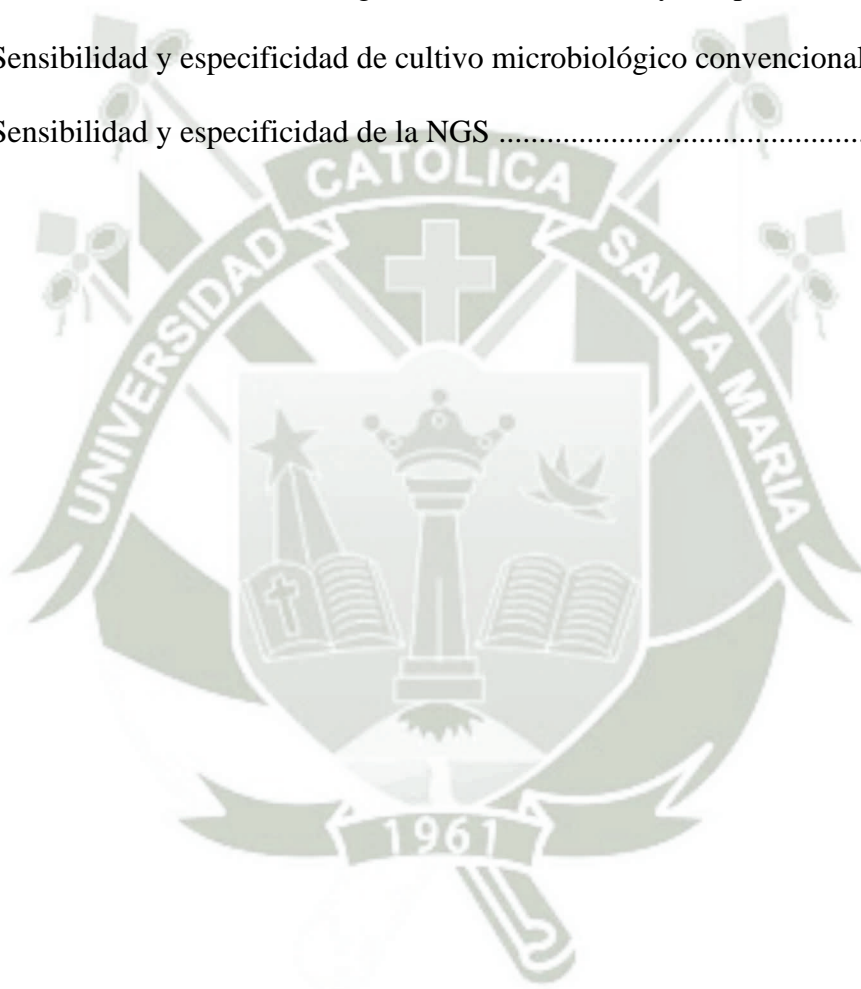
ANEXO 3 CUADRO DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE NEUMONIA  
ASOCIADA A VENTILADOS SEGÚN PUNTOS DE TIEMPO Y RESULTADOS DE  
CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y NEXT GENERATION SEQUENCING

ANEXO 4 REPORTE DE NEXT GENERATION SEQUENCING



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes en ventilación mecánica en la UCIE	31
Tabla 2. Estadísticas de control de calidad.....	33
Tabla 3. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de filo por puntos de tiempo	37
Tabla 4. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género por puntos de tiempo .....	38
Tabla 5. Medida de diversidad alfa según índice de Shannon y Simpson a nivel de OTU	43
Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de cultivo microbiológico convencional.....	46
Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de la NGS .....	47



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amplificación del gen 16S rRNA de 9 muestras de ADN bacteriano de secreción bronquial.....	32
Figura 3. Curvas de rarefacción de las OTU identificadas y por puntos de tiempo.....	34
Figura 4. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de filo.....	35
Figura 5. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género.....	36
Figura 6. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género en el primer punto de tiempo.....	39
Figura 7. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género en el segundo punto de tiempo.....	40
Figura 8. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género en el tercer punto de tiempo.....	41
Figura 9. Diversidad alfa de las muestras por el índice de Shannon.....	44
Figura 10. Diversidad alfa de las muestras por el índice de Simpson.....	44
Figura 11. Gráfico de NMDS de la medida de diversidad beta según puntos de tiempo.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

**NGS:** Next generation sequencing

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**BAL:** Lavado bronqueoalveolar

**NAV:** Neumonía asociada a ventilador

**UCIE:** Unidad de cuidados intensivos de emergencia

**HNCASE:** Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo

**OTU:** Unidad taxonómica operativa

**mNGS:** Metagenómica de siguiente generación

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**SDRA:** Síndrome de distrés respiratorio del adulto

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

## INTRODUCCIÓN

El estudio de la microbiota del cuerpo humano, se tornó muy complicado durante bastante tiempo por las limitaciones de la microbiología convencional; hace aproximadamente una década, se dio inicio al Proyecto de Microbioma Humano, que pretendió identificar y caracterizar los microorganismos que se encuentran asociados a los humanos (tanto en la salud como en la enfermedad). Todo ello fue posible gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento como la secuenciación del gen 16S rRNA (1).

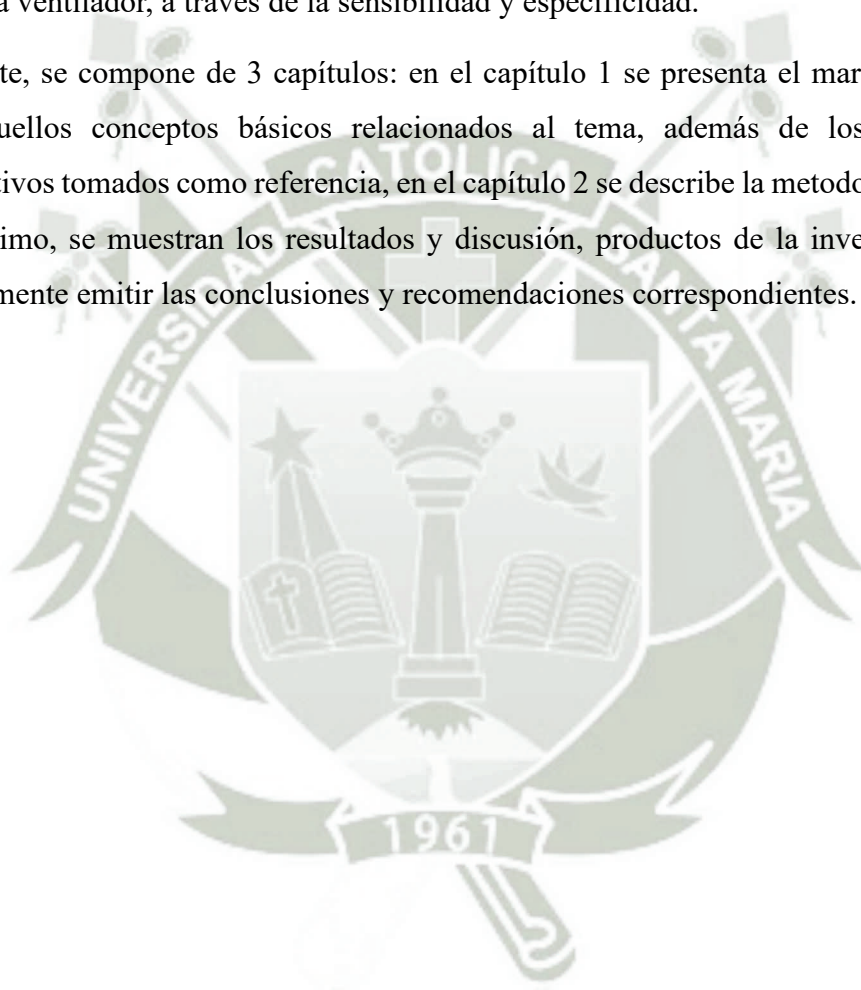
Por otra parte, los consensos recomiendan que, en las unidades de terapia intensiva, la prescripción de antibióticos se ajuste sobre la base de cultivos respiratorios, sin embargo, los cultivos convencionales suelen tener una baja sensibilidad y un tiempo de respuesta prolongado, por lo que se espera que la secuenciación de ADN microbiano de próxima generación supere las limitaciones del diagnóstico basado en cultivos (2). De otro lado, la neumonía nosocomial es una de las causas más importantes de infección hospitalaria, su diagnóstico pronto y correcto es esencial para la instauración de un tratamiento adecuado, ya que un tratamiento incorrecto en las primeras horas conllevaría a un peor pronóstico, así mismo el uso indiscriminado de antibióticos se acompaña de mayor morbilidad y mortalidad (3). Dentro de este tipo de infecciones, se encuentra la NAV, cuyos datos reportados según el Ministerio de Salud del Perú para el 2012 fue de 10,6 casos  $\times$  1000 días de uso de ventilador mecánico, llegando a su punto más bajo en el 2018 con 7,56 casos  $\times$  1000 días de uso de ventilador mecánico, sin embargo estas cifras cambiaron drásticamente para el 2021, la incidencia acumulada subió a 11,66 casos  $\times$  1000 días de uso ventilador mecánico (probablemente como consecuencia de la pandemia de la COVID-19) (4).

De otro lado, en la región Arequipa, no se cuenta con estudios de índole similar en este grupo de pacientes, por lo que resultaría de mucha importancia, conocer y dilucidar cada vez más los cambios de la microbiota del paciente ventilado (utilizando técnicas de secuenciación molecular), y reconocer la utilidad clínica de la identificación bacteriana en las enfermedades pulmonares o condiciones como la ventilación mecánica, para que esa nueva información pueda ayudarnos a crear estrategias o herramientas de tratamiento frente a patologías pulmonares mediante el control de la microbiota pulmonar.

La presente investigación se titula: Dinámica de la microbiota pulmonar y la validez de la next generation sequencing en la detección de patógenos en pacientes con ventilación mecánica - EsSalud - Arequipa 2021, pertenece al área de las ciencias de la salud, y es un

estudio de tipo observacional, longitudinal y de nivel analítico y explicativo, cuenta con dos variables, la primera corresponde a la dinámica de la microbiota pulmonar que utilizó como técnica la observación laboratorial, mientras que la segunda es la validez de la next generation sequencing en la detección de patógenos frente al diagnóstico de NAV que utilizó la observación documental; además de ello, la investigación tiene como objetivo, identificar los cambios en la microbiota pulmonar que pudiesen surgir con el transcurso de los días en los pacientes bajo ventilación mecánica de una unidad de cuidados intensivos, y además, observar la validez de la NGS frente al diagnóstico hecho por el clínico de neumonía asociada a ventilador, a través de la sensibilidad y especificidad.

El presente, se compone de 3 capítulos: en el capítulo 1 se presenta el marco teórico con todos aquellos conceptos básicos relacionados al tema, además de los antecedentes investigativos tomados como referencia, en el capítulo 2 se describe la metodología utilizada y, por último, se muestran los resultados y discusión, productos de la investigación para posteriormente emitir las conclusiones y recomendaciones correspondientes.



## HIPÓTESIS

Dado que, la microbiota pulmonar se ve alterada en determinadas enfermedades o condiciones, y debido a las nuevas técnicas de secuenciación que han permitido la identificación de gérmenes a nivel molecular; y dado que el uso de estas técnicas en nuestro medio es reciente y muy limitado.

Es probable que, durante el transcurso de los días de ventilación mecánica dicha microbiota se vea alterada; así mismo, es probable que, conocer la validez clínica de una técnica de secuenciación como la next generation sequencing, contribuya a considerar y recomendar su uso en determinados contextos.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Establecer los cambios en la microbiota pulmonar durante la ventilación mecánica y la validez de la next generation sequencing frente al diagnóstico de neumonía asociada a ventilador.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar la microbiota pulmonar en el paciente con ventilación mecánica.
2. Analizar la dinámica de la diversidad de OTUs que predominan en los pacientes ventilados según el tiempo de ventilación mecánica.
3. Reconocer la validez diagnóstica de la secuenciación por next generation sequencing, frente al diagnóstico de neumonía asociada a ventilador.



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Microbiota: definiciones básicas

Durante el estudio de la medicina como disciplina, se ha sostenido tradicionalmente que los seres humanos y los microorganismos patógenos son esencialmente antagonistas, librando una constante batalla en la que nuestra principal defensa es la creación y el perfeccionamiento de antibióticos más avanzados. No obstante, en las últimas décadas, ha surgido una comprensión más sofisticada y matizada de esta interacción. Se ha reconocido que la relación entre los seres humanos y las comunidades de microorganismos que residen en nuestros cuerpos es mucho más compleja de lo que se pensaba anteriormente. Estas comunidades microbianas no sólo incluyen patógenos, sino también una amplia variedad de microorganismos que desempeñan roles cruciales en la salud y el funcionamiento del cuerpo humano, como la digestión, la protección contra otros patógenos y la modulación del sistema inmunológico. Por lo tanto, la interacción entre humanos y microbios no puede ser reducida simplemente a una confrontación, sino que debe ser entendida como un ecosistema dinámico y complejo, donde el equilibrio y la colaboración juegan roles fundamentales en la salud humana (1).

- **Microbiota:**

Comunidad de microorganismos que ocupa un hábitat específico.

- **Microbioma:**

Microbiota y su función en dicho entorno (1).

Aunque a menudo se utilizan de manera intercambiable, los términos microbiota y microbioma tienen significados distintos. La microbiota se refiere específicamente al conjunto de microorganismos como bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos que habitan en nuestro cuerpo. En contraste, el microbioma abarca un concepto más amplio que incluye no solo estas comunidades microbianas, sino también sus genes, metabolitos y las condiciones ambientales presentes en cada una de sus localizaciones (2).

### 1.2. Microbiota pulmonar

Tradicionalmente, los pulmones humanos sanos se han considerado estériles o libres de bacterias durante mucho tiempo (7,8), sin embargo, dado que los pulmones tienen

contacto constante con el medio ambiente, están continuamente expuestos a los microbios. Además, las vías respiratorias inferiores son superficies cálidas y húmedas situadas muy cerca de las cavidades bucal y nasal, que son entornos con alta presencia de bacterias, y está bien documentado que la microaspiración del contenido faríngeo ocurre en sujetos sanos o asintomáticos (9).

Cuantiosos estudios que han hecho uso de técnicas moleculares (independientes del cultivo) han puesto de manifiesto que una comunidad bacteriana diversa está presente en las vías respiratorias inferiores en condiciones saludables y han identificado los géneros principales como *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus* (8,10,11,12).

En el modelo del microbioma pulmonar el equilibrio de tres factores determina y da forma al microbioma pulmonar (13), la inmigración microbiana a las vías respiratorias, la eliminación de microbios de las vías respiratorias y las tasas de reproducción relativas de los microbios que se encuentran en las vías respiratorias. Los cambios en las comunidades microbianas en una persona o en una condición o enfermedad se debería a un cambio en uno de esos tres factores, mientras que la evidencia apunta firmemente a la microaspiración subclínica como la fuente principal de inmigración microbiana. Otros factores que contribuyen pueden incluir la inhalación de bacterias del aire y la migración directa a lo largo de las superficies mucosas de las vías respiratorias. La eliminación microbiana se logra mediante una combinación de: eliminación mucociliar, tos y defensas inmunes del huésped (tanto innatas como adaptativas) (14).

Finalmente, la interacción de estos tres factores hace que en la mayoría de individuos sanos, el microbioma de los pulmones humanos durante la salud se parece más al de la orofaringe que al aire inhalado, la nasofaringe o el tracto gastrointestinal inferior (15,16). El microbioma nasal contribuye poco a las comunidades pulmonares durante la salud en la mayoría de las personas, pero no en todas (17).

Por lo tanto, la naturaleza y la dinámica del microbioma pulmonar difieren de las de los nichos ecológicos con comunidades microbianas robustas y autosostenibles. Se han demostrado poblaciones aberrantes (disbiosis) en muchas enfermedades pulmonares que tradicionalmente no se consideran de origen microbiano, y están surgiendo posibles vías de comunicación entre microbio y huésped (18).

Entonces, por lo expuesto ya no sorprende que el pulmón no sea estéril, dada su contigüidad con el tracto respiratorio superior. Sin embargo, el pulmón sano posee una biomasa microbiana extremadamente baja, y la naturaleza del microbioma pulmonar difiere notablemente en cantidad y dinámica, de la de los hábitats corporales con microbiomas robustos, como el intestino, la piel, la boca y la vagina. Por otra parte, la densidad de bacterias es menor que en el tracto respiratorio superior, y su composición se asemeja mucho a esta, particularmente en la región periglótica (19). Firmicutes y Bacteroidetes son los filos más comunes, mientras que *Prevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella* son los géneros más comunes (20).

Por lo tanto, el microbioma pulmonar es en gran medida transitorio y está compuesto por inmigrantes derivados del tracto respiratorio superior que se eliminan a través de mecanismos inmunes innatos y mucociliares (21). Algunas de estas bacterias son viables y transcripcional y metabólicamente activas (22).

No está claro si existen verdaderos residentes bacterianos autosostenibles a largo plazo. Por lo tanto, la naturaleza y la dinámica del microbioma pulmonar sano difieren de las de sitios como el intestino, la piel y las cavidades vaginal y oral, que tienen comunidades microbianas robustas y autosostenidas. Es importante destacar que las investigaciones realizadas en estos aspectos, se basan en pocos sujetos sanos y su ejecución en limitados centros en el orbe (23).

Recientemente se ha propuesto la existencia del eje intestino-pulmón, debido a los eventos interrelacionados entre sus respectivas microbiotas y su impacto en las enfermedades respiratorias. Se ha observado que la microbiota intestinal interviene en la homeostasis y medía la inmunidad, influenciando así la salud respiratoria. Este concepto subraya la interacción entre el huésped y los microbios, así como entre los propios microbios, tanto a nivel local (en el pulmón) como a distancia (conectando el intestino y el pulmón). Además, el microbioma pulmonar fisiológico, compuesto por comunidades de microorganismos comensales, se está evaluando actualmente como un elemento crucial en la fisiopatología de diversas enfermedades respiratorias (24,25).

### 1.3. Microbiota pulmonar en la ventilación mecánica

Como ya se mencionó el tracto pulmonar está habitado por bacterias, tanto en condiciones normales como en condiciones de enfermedad, aunque es posible que los cultivos de método tradicional no identifiquen el total de bacterias.

La reciente aparición de perfiles de microbioma ha hecho notar perturbaciones y disbiosis del tracto pulmonar en especial en lo que respecta a enfermedades como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Dichas perturbaciones, finalmente puede conducir al desarrollo de neumonía en determinadas poblaciones (26). De especial interés son los pacientes quirúrgicos ventilados mecánicamente, que pueden ser particularmente susceptibles al desarrollo de neumonía. Sin embargo, llegar a este diagnóstico de neumonía en esta población es complicado puesto que muchos de los parámetros clínicos utilizados para el diagnóstico ya están elevados debido a las lesiones y otras fuentes de inflamación no relacionada con la infección (27,28). Además, la microbiota de los pacientes en la unidad de cuidados intensivos fluctúa considerablemente debido a estados patológicos agudos asociados con enfermedades críticas e intervenciones comunes como ventilación mecánica, antimicrobianos, supresión del ácido gástrico y nutrición enteral (29,30).

Un análisis de aspirados endotraqueales de pacientes con ventilación mecánica demostró un aumento de la disbiosis y una reducción de la diversidad del microbioma bacteriano durante el período de intubación. Además, el microbioma endotraqueal de los pacientes que desarrollaron neumonía adquirida por ventilador tenía una mayor disbiosis en relación con los individuos que no desarrollaron neumonía cuando se analizó durante los primeros días de la intubación (31).

Los métodos moleculares para cuantificar la carga bacteriana en el líquido de lavado broncoalveolar (BAL) y el aliento exhalado mediante la amplificación del gen 16S rRNA mediante (PCR) cuantitativa en tiempo real han identificado con éxito a pacientes con neumonía asociada al ventilador confirmada microbiológicamente frente a pacientes con menor carga bacteriana. Esto permitió una cuantificación más rápida de la carga bacteriana en relación con los métodos tradicionales de cultivo semicuantitativos (32).

Aproximadamente el 15% de los pacientes intubados reciben antibióticos por neumonía asociada a ventilación o traqueobronquitis clínicamente diagnosticadas,

dichos pacientes con neumonía asociada a ventilador tienen una mayor duración de la estancia hospitalaria y pueden tener una mortalidad hasta dos veces mayor que los pacientes intubados sin infección del tracto respiratorio inferior (33).

#### 1.4. Análisis de la diversidad de la microbiota

##### 1.4.1. Diversidad alfa:

Los componentes más conocidos son la diversidad alfa y la diversidad beta. La diversidad alfa, que es uno de los índices fundamentales de diversidad, se define como la variedad en un punto específico o en una muestra particular. Sirve como una medida resumida para una única población. En el contexto del estudio del microbioma, la diversidad alfa se refiere a la variedad de microorganismos presentes dentro de una sola muestra o comunidad (34).

Medidas de la diversidad alfa

- El índice de diversidad de Shannon-Wiener es una de las métricas más reconocidas para evaluar la diversidad de especies. Este índice toma en cuenta tanto la proporción como la abundancia de cada especie dentro de una comunidad. El valor del índice Shannon-Wiener, denotado como  $H'$ , aumenta a medida que crece el número de especies presentes en la comunidad, y en teoría, puede alcanzar valores extremadamente elevados. Este índice es esencial para comprender la estructura de la biodiversidad y evaluar la riqueza y la equitatividad de las especies en un ecosistema (35).
- El índice de diversidad de Simpson, propuesto por Simpson en 1949, introduce un concepto de diversidad que combina dos aspectos cruciales: la riqueza de especies y la uniformidad. Esta medida no paramétrica de la diversidad sugiere que la diversidad es inversamente proporcional a la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie. En esencia, este índice mide la heterogeneidad de las especies, aunque comúnmente se refiera a él como un sinónimo de diversidad en la literatura ecológica. El valor del índice de Simpson varía de 0, indicando baja diversidad, hasta valores cercanos a 1, que indican alta diversidad (36).

- El índice de Chao es un estimador del número total de especies en una comunidad, basado en la cantidad de especies raras presentes en la muestra. Este índice considera específicamente aquellas especies que están representadas por un único individuo en la muestra (singletons) y las que están representadas por exactamente dos individuos (doubletons). Al utilizar la información sobre estas especies raras, el índice de Chao proporciona una estimación más precisa de la verdadera diversidad de especies en la comunidad, compensando así la probabilidad de que algunas especies no hayan sido observadas en la muestra (37).

#### **1.4.2. Diversidad beta**

Las cuestiones de clasificación comunitaria nos conducen a medir la similitud entre dos muestras comunitarias, lo cual se conoce como beta-diversidad. Este concepto fue definido originalmente por Whittaker como una medida del cambio en la diversidad a través de gradientes ambientales. En otras palabras, la beta-diversidad representa la tasa de cambio en la composición de especies de una comunidad a otra a lo largo de estos gradientes. También se le conoce como "recambio de especies". En términos generales, la beta-diversidad evalúa las diferencias entre dos o más ensamblajes locales, o entre ensamblajes locales y regionales, permitiéndonos así determinar cuánta diversidad es exclusiva de un conjunto local o describir cuántos taxones se comparten entre las comunidades (38).

#### **1.5. Técnicas para el estudio de la microbiota pulmonar: next generation sequencing**

Es precisamente con la llegada de nuevas tecnologías que evalúan el microbioma en la muestra, como el secuenciador de próxima generación, que se observa un aumento del interés en comprender el microbioma pulmonar y su rol en las enfermedades pulmonares. El recopilar datos sobre la flora bacteriana en pulmón y sus cambios durante la enfermedad, ha permitido ver que hay dentro de la patogénesis y cómo funciona durante la progresión de la enfermedad, en especial con pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y/o infecciosas (39).

Utilizando la secuencia del gen bacteriano del ARN ribosómico 16S, NGS se puede estimar rápidamente una gran cantidad de secuencias bacterianas en los niveles de filo y género, y en algunos casos en niveles de especie en un período de tiempo corto.

Existen, otras técnicas que utilizan básicamente el método de Sanger en combinación con la construcción de una biblioteca de clones también pueden ser útiles para identificar especies de bacterias patógenas con su proporción en las muestras respiratorias.

A finales de 2007 se lanzó el Consorcio Internacional del Microbioma Humano con Japón, Estados Unidos, Europa y China, y en 2007 se inició el Proyecto de Microbioma Humano de los Institutos Nacionales de Salud para descubrir el microbioma en el cuerpo humano. Sin embargo, el pulmón no era objetivo en el proyecto porque se consideraba al tracto respiratorio inferior como estéril. Para identificar los miembros del microbioma, el gen 16S rRNA se usa comúnmente como gen conservado específico de bacterias, y las regiones V1-V5 en nueve regiones variables (V1-V9) del gen 16S rRNA se amplifican comúnmente (40).

La NGS es un grupo de tecnologías diseñadas para secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base (41,42), se puede analizar una gran cantidad de fragmentos de ADN a la vez y, por lo tanto, es un buen candidato para analizar muestras con una gran diversidad bacteriana y también analizar la tendencia de la diversidad floral bacteriana en cada muestra. Por el contrario, la mayoría de los NGS ampliamente utilizados no tienen la capacidad suficiente para detectar con precisión la longitud adecuada de las secuencias de ADN para decidir el nivel de "especie" en cada ADN, aunque generalmente es importante una longitud suficiente de la secuencia de ADN con una secuenciación precisa para detectar especies bacterianas en cada muestra de ADN. Otro enfoque es la secuenciación metagenómica de escopeta, en la que se secuencian todo el ADN de una muestra. Aunque la alta proporción de ADN derivado del huésped presente en las muestras de pulmón es un desafío, la secuenciación directa se utiliza cada vez más en estudios de pulmón (39).

La metagenómica de escopeta proporciona la composición taxonómica y el contenido de genes del microbioma, que enumera el potencial funcional de la comunidad. Puede anotar cepas bacterianas e incluye información sobre el transporte de genes de virulencia o resistencia a los antibióticos. La metagenómica de escopeta identifica simultáneamente componentes bacterianos y fúngicos, y también virus, que no comparten ninguna etiqueta de secuencia comparable a las bacterias y los hongos. Tanto la secuenciación del gen 16S rRNA como la secuenciación de escopeta están asociadas con lecturas que no se alinean con las bases de datos de referencia. Finalmente, los métodos basados en secuencias son complementarios al cultivo, que tiene una alta sensibilidad para los organismos objetivo. Por lo tanto, los enfoques moleculares no son intrínsecamente mejores que el cultivo, y la combinación de enfoques de cultivo y secuenciación puede proporcionar una resolución comunitaria óptima en especímenes dominados por ADN humano y/o taxones de baja abundancia y a su vez brindar una oportunidad para estudiar organismos específicos (43).

Los estudios basados en secuencias generalmente informan los taxones en términos de abundancia relativa, es decir, proporcionalidad dentro de una comunidad que totaliza el 100%. Sin embargo, es esencial considerar el enriquecimiento relativo de taxones específicos en el contexto de la carga microbiana total, particularmente en el pulmón, donde la carga microbiana varía en muchos órdenes de magnitud. Todo ello debido a que la carga bacteriana puede ser tan importante como la composición, como se describe en estudios en los que la carga bacteriana total en el líquido de lavado broncoalveolar predijo la disfunción crónica del aloinjerto de pulmón o la muerte después del trasplante de pulmón o permitió evaluar la progresión de la fibrosis pulmonar intersticial y resultados durante enfermedades críticas (18).

#### **1.6. Muestreo del microbioma pulmonar.**

El esputo y lavado bronqueoalveolar son enfoques comunes para el muestreo del microbioma pulmonar y se encuentran relacionados con la posibilidad de sesgo. El esputo no es invasivo y pudiera recolectarse en serie, pero representa la combinación del tracto respiratorio inferior y superior. Esta mezcla resulta difícil en estados en los que la carga microbiana pulmonar es baja, sin embargo, en patologías como la fibrosis quística, la carga microbiana en el tracto respiratorio superior es alta, una muestra de esputo pudiese reflejar mejor el pulmón (44).

El consenso sobre que tanto se relacionan las comunidades microbianas en el esputo espontáneo e inducido es aún discutible. Por otro lado, si bien el paso del broncoscopio a través del tracto respiratorio superior significa que el líquido del BAL puede contener restos (en especial de zona periglótica) se encuentra menos influenciado por la contaminación que el esputo, pero implica la realización de un procedimiento invasivo. A pesar de ello, es necesario un análisis cuidadoso para distinguir el pulmón de otras fuentes. Otras opciones de muestreo con ventajas y limitaciones incluyen los aspirados endotraqueales, utilizados ampliamente en pacientes intubados (45), biopsias bronquiales; el aliento exhalado se condensa; y tejido de pulmones explantados (46).

La baja biomasa microbiana de las muestras de pulmón, excepto en condiciones altamente colonizadas o purulentas, hace que las muestras de pulmón sean extremadamente susceptibles a la contaminación del tracto respiratorio superior durante la recolección, y también de secuencias de fondo propias de los equipos, kits y reactivos, que son estériles, pero no necesariamente libres de ADN (47). Las secuencias artefactos también pueden resultar del propio proceso de secuenciación (48).

Muchas muestras de líquido bronqueoalveolar de personas sanas tienen un contenido bacteriano muy bajo y una abundancia relativa alta de taxones característicos de los controles de fondo (p. ej., lavado del canal del equipo antes del procedimiento), lo que indica una escasez de microbiota pulmonar auténtica (49).

### **1.7. Neumonía asociada a ventilador**

La neumonía asociada al ventilador se refiere a un subgrupo específico de neumonías intrahospitalarias que se desarrollan en pacientes con una vía aérea artificial. Este tipo de neumonía constituye más del 80% de las neumonías adquiridas en las unidades de cuidados intensivos. Su relevancia clínica es considerable, no solo debido a su alta morbimortalidad, especialmente en casos causados por gérmenes multirresistentes, sino también por su impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, el aumento en los costos y el significativo consumo de recursos sanitarios (50).

Se proponen los siguientes criterios para la sospecha clínica de neumonía asociada al ventilador (NAV): la presencia de dos de los tres criterios mayores (fiebre,

secreciones purulentas, infiltrado pulmonar) y uno de los criterios menores (leucocitosis, leucopenia, hipoxemia, leucocitos inmaduros, aumento de las necesidades de oxígeno, inestabilidad hemodinámica). La relevancia y novedad de esta propuesta radican en aceptar la sospecha de NAV y comenzar la metodología necesaria para alcanzar un diagnóstico etiológico certero, incluso en pacientes sin evidencia de infiltrados radiológicos (grado de evidencia III; acuerdo entre los expertos) (51).

### **1.8. Validez de prueba diagnóstica**

Es la capacidad de la prueba para medir lo que pretende medir, es decir el grado de coincidencia entre los resultados de la prueba y los exámenes diagnósticos más complejos y rigurosos subsiguientes que se constituyen como patrón de referencia o estándar, aunque éstos no siempre son perfectos o están disponibles. Las medidas de la validez son la sensibilidad y la especificidad, ambas inherentes a la prueba:

- **Sensibilidad:** Probabilidad de que un enfermo sea identificado correctamente por la prueba, es decir, que tenga una prueba positiva. Son los enfermos con prueba positiva de entre todos los enfermos.
- **Especificidad:** Probabilidad de que un individuo sin la enfermedad sea identificado correctamente por la prueba, es decir, que tenga una prueba negativa. Son los sanos con prueba negativa de entre todos los sanos (52).

## 2. Antecedentes investigativos

Luna Paredes en 2021, en Arequipa - Perú, buscó identificar el microbioma presente en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis. Se recolectaron 28 muestras de esputo con diagnóstico clínico de tuberculosis: 20 sin tratamiento, 6 con tratamiento, 2 multidrogo-resistentes y 8 muestras de pacientes sin tuberculosis (control). La identificación se realizó mediante secuenciación Illumina MiSeq. Los filos identificados fueron: en pacientes sin tuberculosis (control) Firmicutes, Proteobacterias, Fusobacterias y Actinobacterias; en pacientes con diagnóstico de tuberculosis sin tratamiento: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria; en pacientes con diagnóstico de tuberculosis que recibieron tratamiento: Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes; y en pacientes con diagnóstico de tuberculosis multidrogo-resistentes: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. El estudio encontró una marcada variación en el microbioma presente en muestras de esputo asociado a tuberculosis (53).

En 2016, Brendan J. y su equipo llevaron a cabo un estudio en Estados Unidos con una cohorte de 15 pacientes con insuficiencia respiratoria que necesitaban intubación y ventilación mecánica en la UCI de un centro médico académico. Se recolectaron muestras de secreciones orofaríngeas y endotraqueales profundas dentro de las primeras 24 horas de la intubación y cada 48-72 horas después, así como muestras del tracto respiratorio inferior de sujetos sanos mediante broncoscopia. Los resultados mostraron que, a diferencia de la diversidad de la microbiota en el tracto respiratorio superior e inferior de los controles sanos, los pacientes críticamente enfermos tenían una diversidad inicial más baja en ambos sitios, la cual disminuía aún más con el tiempo en el ventilador. Los taxones dominantes coincidieron con los cultivos bacterianos clínicos positivos. Se concluyó que el análisis longitudinal de la microbiota del tracto respiratorio en pacientes críticos ofrece información valiosa sobre la patogenia y el diagnóstico del tracto respiratorio inferior (45).

Zakharkina T., et al., en 2017, realizaron un estudio en España con el objetivo de analizar la dinámica del microbioma pulmonar durante la ventilación mecánica en la UCI y su relación con la aparición de neumonía. Se obtuvieron aspirados traqueales tres veces a la semana, y la composición del microbioma respiratorio se midió mediante secuenciación del gen 16S rRNA utilizando la plataforma Roche 454. Se recolectaron un total de 111 aspirados traqueales de 35 pacientes; 11 de ellos desarrollaron neumonía

asociada al ventilador (NAV), mientras que 18 no la presentaron. Además, seis pacientes desarrollaron neumonía en las primeras 48 horas después de la intubación. El estudio concluyó que la ventilación mecánica, y no la administración de antibióticos, se asoció con cambios en el microbioma respiratorio. La disbiosis de las comunidades microbianas en el tracto respiratorio fue más pronunciada en los pacientes que desarrollaron NAV (31).

Zhang J., et. al. 2022 en el Hospital de Nanjing en China, tuvieron como objetivo, evaluar el valor clínico de la secuenciación metagenómica de próxima generación (mNGS) de Illumina y Nanopore para la detección de patógenos en el líquido de lavado broncoalveolar en pacientes con sospecha de neumonía adquirida en la comunidad. Las muestras obtenidas fueron 66 pacientes con sospecha de NAC dentro de las 48 horas posteriores a la hospitalización y se dividieron en dos partes: una para cultivo convencional y la otra para mNGS mediante las plataformas de Illumina y de Nanopore). Se evaluó el valor clínico basado en el diagnóstico de infección, el rendimiento del diagnóstico de los principales patógenos y la orientación del tratamiento, encontraron que la infección patógena se estableció o excluyó en 53 de 66 pacientes. Hubo poca diferencia en la tasa de coincidencia entre Illumina y Nanopore con el diagnóstico clínico, pero ambos fueron superiores al cultivo (57,81 %, 59,38 %, 25 %, respectivamente), y concluyeron que tanto Illumina como Nanopore tienen sus propias ventajas en el diagnóstico patógeno y desempeñan funciones similares en el diagnóstico de infecciones y en la orientación del tratamiento clínico (54).

Lamarche D., et al., en 2018, en Canadá, describieron la composición de las comunidades microbianas en una cohorte de pacientes críticamente enfermos que estaban siendo ventilados mecánicamente, con una alta incidencia de neumonía en dos unidades de cuidados intensivos. Se recolectaron 65 muestras de 34 pacientes de UCI inscritos en el ensayo, incluyendo 29 aspirados endotraqueales, 26 aspirados gástricos y 10 muestras de heces. Las muestras se obtuvieron con una mediana de tiempo de 3 días (para el tracto respiratorio inferior y aspirados gástricos) y 6 días (para las deposiciones) después del ingreso en la UCI. El estudio concluyó que la composición de las comunidades microbianas asociadas con el huésped se ve gravemente perturbada durante una enfermedad crítica. La reducción de la diversidad microbiana refleja una alta gravedad de la enfermedad y se asocia con la mortalidad. Por lo tanto, la diversidad microbiana

puede ser un biomarcador de valor pronóstico en pacientes con ventilación mecánica (55).

Huebinger, et al., en 2018, en Estados Unidos, estudiaron el microbioma pulmonar común identificado en pacientes quirúrgicos con ventilación mecánica. Se recogieron muestras clínicas de lavado broncoalveolar (BAL) de 15 pacientes ventilados mecánicamente en la UCI quirúrgica del Hospital Parkland Memorial. Concluyeron que, aunque la población de pacientes en este estudio no era intrínsecamente sana, la necesidad de ventilación en esta cohorte se atribuyó principalmente a lesiones traumáticas, lo que sugiere que el microbioma común identificado podría ser similar al de un individuo sano. Sin embargo, debido al tamaño de la muestra y la diversidad de muestras en el estudio, no pudieron llegar a una conclusión definitiva sobre los efectos de los antibióticos en el perfil del microbioma pulmonar (14).





## 1. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

### 1.1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación

El presente estudio es observacional, descriptivo, de campo, de tipo longitudinal, y el muestreo fue no probabilístico por conveniencia. Las muestras de secreción bronquial se recolectaron de pacientes bajo ventilación mecánica en la unidad de cuidados intensivos de emergencia del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo - EsSalud, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión especificados en la sección correspondiente.

**Cuadro 1**  
**Cuadro de coherencias**

Variable	Indicadores	Técnicas	Instrumento	Items
Dinámica de la Microbiota pulmonar: Cambios en el conjunto de los microorganismos que ocupan un hábitat determinado (pulmón).	Diversidad alfa  Diversidad beta	Observación laboratorial (NGS)	- Ficha de observación - Informe de NGS	OTUS identificadas en el 1° punto de tiempo OTUS identificadas en el 2° punto de tiempo. OTUS identificadas en el 3° punto de tiempo.
Validez en la detección de patógenos: La validez de una prueba diagnóstica se refiere a la capacidad de un test de identificar correctamente como enfermo al paciente que es enfermo y como sano al que es sano. Se cuantifica mediante la sensibilidad y especificidad.	Especificidad Sensibilidad	Observación documental (historia clínica)	Ficha de observación	Diagnóstico positivo o negativo de neumonía asociada a ventilador en los diferentes puntos de tiempo hecho por el clínico. Resultado de las OTUS identificadas por NGS en los diferentes puntos de tiempo. Resultado de cultivo microbiológico convencional en los diferentes puntos de tiempo.

## **1.2. Campo de Verificación**

### **1.2.1. Ubicación espacial**

Las muestras obtenidas fueron en la UCI de Emergencia – Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo – Red Asistencial Arequipa.

La extracción de ADN bacteriano inicial y la PCR se llevó a cabo en el laboratorio de la EPG de la Universidad Católica de Santa María.

El análisis de NGS fue realizado por Novogene y el análisis de datos por Biosequence.

### **1.2.2. Ubicación temporal**

La toma de muestras se realizó en diferentes momentos de tiempo, por la pandemia, lo que limitó grandemente su obtención y manejo.

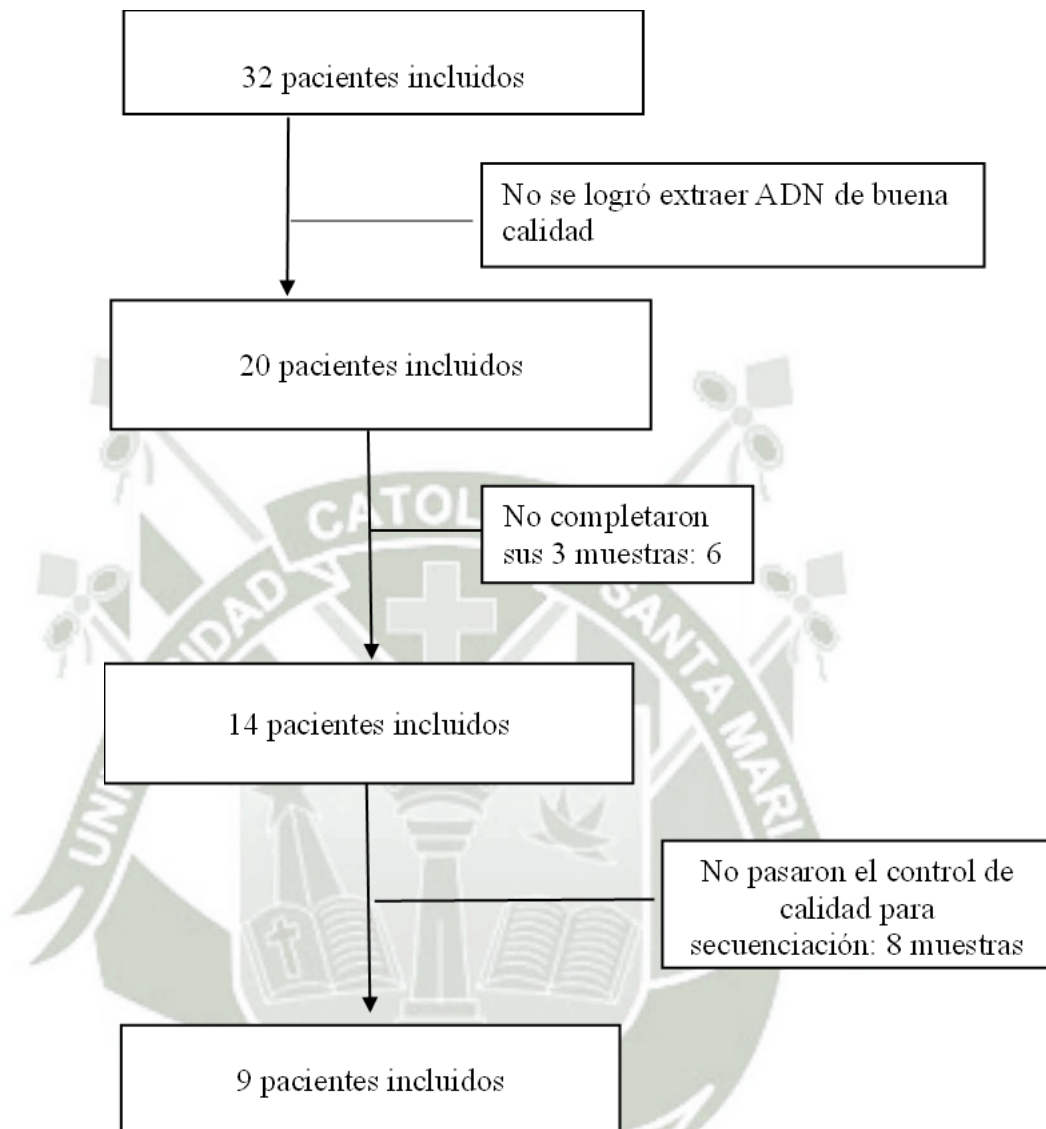
El primer momento para la obtención de muestras fue de enero a febrero 2020, sin embargo, estas fueron descartadas ya que la recolección y el trabajo en laboratorio fue retomado muchos meses después, el segundo momento de recolección de muestras viables fue entre setiembre y diciembre del 2021, conservándolas de allí para su posterior envío y ser procesadas por la técnica planteada.

### **1.2.3. Unidades de estudio**

Las muestras de secreción bronquial fueron recolectadas de pacientes bajo ventilación mecánica de la UCIE del HNCASE – EsSalud mediante el colector de secreción bronquial Busse 40 cc; la información clínica de los pacientes así como el diagnóstico de NAV fueron recabados de la historia clínica, (según si esta se encontraba completa, de lo contrario no se tomó en cuenta para el estudio).

Para mejor comprensión del flujo de pacientes y muestras, se puede observar la Diagrama 1; en total se involucraron 32 pacientes, de los primeros 12 no se logró extraer ADN de óptima calidad en alguna de las tres muestras o/y no se completaron las 3 muestras previstas, quedando 20 participantes que se inscribieron en el estudio, se excluyeron 6 pacientes que no completaron sus 3 muestras, quedando 14 pacientes a los cuales se les asignó una letra, de estos, 8

muestras no pasaron el control de calidad de extracción y secuenciación de ADN en Novogene, la muestra final fue de 9 pacientes y 27 muestras.



**Diagrama 1: Diagrama de flujo de pacientes y muestras utilizadas**

#### 1.2.3.1. Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años ingresados a la UCIE con 24 horas de inicio de ventilación mecánica por insuficiencia respiratoria secundaria a estado crítico, que sea de causa no pulmonar.

### 1.2.3.2. Criterios de exclusión

- Pacientes reingresados a la UCIE.
- Pacientes ingresados a la UCIE referidos de otros centros en ventilación mecánica, por permanecer más de 24 horas ventilados y por desconocer historial clínico de lugar de referencia.
- Pacientes inmunocomprometidos.
- Paciente con enfermedad de COVID-19 o que la haya tenido recientemente de forma moderada a grave (por el tiempo de recuperación que esta demanda).
- Pacientes con antecedente de enfermedad respiratoria que sea la causa de la ventilación mecánica.
- Pacientes sin consentimiento informado para el estudio.
- Pacientes con historia clínica incompletas.
- Pacientes que no cuenten con las 3 muestras requeridas o cuya muestra resulte insuficiente para los análisis.

### 1.3. Estrategia de recolección de datos

La ejecución del proyecto se llevó a cabo con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Red Asistencial Arequipa – EsSalud, de acuerdo a la Directiva N° 03 – IETSI – ESSALUD 2019 “Directiva que regula el desarrollo de la Investigación en salud – EsSalud”, y con carta N° 32-UCID-GRRAR-ESSALUD-2020.

El consentimiento informado utilizado, obedece al diseño inicial del proyecto de la línea de estudio de microbioma del Doctorado en Ciencias de la Salud, que contemplaba tomar muestras de pacientes sanos, sin embargo, al presentarse pandemia esto ya no fue posible, por lo que se realizó la modificación en el consentimiento informado.

Una vez que se extrajo la muestra, se colocaron al menos 5 ml de la secreción bronquial en un frasco estéril de polipropileno, el cual se mantuvo en un cooler para su transporte. Esta muestra se dirigió al laboratorio F-403 de la Universidad Católica de Santa María, donde cada muestra recibió un código de identificación y se

almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El líquido restante se envió al Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo – EsSalud para el cultivo de secreciones del tracto respiratorio inferior, siguiendo el procedimiento establecido en el Manual de Procedimientos del laboratorio de microbiología de dicho hospital, versión 02 del año 2021 (Código MPM 007) (56).

### 1.3.1. Extracción y amplificación de ADN

El ADN se extrajo utilizando la técnica de fenol - cloroformo - Alcohol Isoamílico. Las muestras se retiraron del almacenamiento y se pasó 1 ml. a un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 2 ml. Eppendorf™. Se le agregó 100  $\mu\text{l}$ . de perlas y 100 de  $\mu\text{l}$ . de microperlas de vidrio, así como 700  $\mu\text{l}$ . de buffer de lisis de células (10mM Tris – HCL, 10mM EDTA, 50 mM NaCl, 5% SDS, pH 7.5) y 10  $\mu\text{l}$ . de proteinasa K, se vortexeó durante 5 minutos para fomentar la lisis de bacterias y se llevó a incubación por 30 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$  en el equipo de baño maría. Se agregó 25  $\mu\text{l}$ . de RNAsa y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos en el thermoBlock Wealtec HB-1, transcurrido el tiempo se trasladó el sobrenadante a otro tubo eppendorf™, para agregarle 500 $\mu\text{L}$ . de Fenol: Cloroformo: Alcohol – Isoamílico (25:24:1), y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga por 12 tubos D2012. Luego se transfirió la fase acuosa a un nuevo eppendorf™ (aprox. 300 - 400 $\mu\text{l}$ . de muestra) sin tocar la interfase (por dos veces), después se agregó isopropanol en una cantidad de 1 a 2.5 volúmenes de la fase acuosa recuperada (lo ideal es tener 1 ml. de mezcla de isopropanol + fase acuosa), y se centrifugó 12000 rpm por 10 minutos, se eliminó el isopropanol en un papel toalla una sola vez y nos quedamos con el pellet. Se resuspendió el pellet de ADN con 500  $\mu\text{l}$ . de etanol al 70% y se procedió a centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante en papel y se dejó secar 30 segundos, para luego cerrar la tapa del eppendorf™. Se resuspendió el pellet de ADN con agua de grado molecular de 50  $\mu\text{l}$ . y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se verificó la pureza de ADN, se procedió a su lectura en gel de agarosa al 1.5%, y finalmente se visualizaron en el transiluminador para electroforesis (56).

Posterior a ello, se amplificó en 16s con técnica de PCR punto final con los siguientes primers: Forward 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y Reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), con un tamaño de amplicón de 1500 pb. Las condiciones del termociclador Multigene –Labnet fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 45°C durante 30s, 72°C durante 2 min. y una extensión final de 72°C por 7 minutos. La lectura de los productos de PCR fue evaluada en gel de agarosa al 1.5%. con un marcador de 100bp (57).

### 1.3.2. Secuenciación por next generation sequencing

La preparación de la librería y secuenciación fue realizada por Novogene, utilizando el Kit Nextera XT DNA library, a través de la plataforma IlluminaMiSeq.

En el proceso de secuenciación, se sigue una serie de pasos donde se realizó un control de calidad, para garantizar precisión y fiabilidad de los datos. Los pasos a seguir fueron:

- Extracción de ADN genómico
- Amplificación por PCR
- Cuantificación y mezcla de productos de PCR
- Purificación de productos de PCR
- Preparación de librerías
- Secuenciación (57).

### 1.3.3. Construcción, control de calidad y secuenciación de bibliotecas

La amplificación por PCR de las regiones objetivo se realizó mediante el uso de cebadores específicos conectados con códigos de barras. Los productos de PCR con tamaño adecuado se seleccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La misma cantidad de productos de PCR de cada muestra se agrupó, se reparó en los extremos, se le colocó una cola A y se le ligó con adaptadores Illumina. Las bibliotecas se secuenciaron en una plataforma Illumina de extremo emparejado para generar lecturas sin procesar de extremo emparejado de 250 pb. La biblioteca se comprobó con Qubit y PCR en tiempo real para la cuantificación

y bioanalizador para la detección de la distribución de tamaños. Las bibliotecas cuantificadas se agruparán y secuenciarán en las plataformas Illumina (56).

#### **1.3.4. Procedimiento de análisis de datos**

Inicialmente, existe una cierta proporción de "datos sucios" en los datos brutos obtenidos por secuenciación, estos datos brutos se fusionarían y filtrarían en primer lugar para obtener datos limpios. A continuación, se llevó a cabo la agrupación de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) sobre la base de los datos efectivos. De acuerdo con los resultados de agrupamiento de las OTUs, se realiza una anotación taxonómica para la secuencia representativa de cada OTU para obtener la información de taxones correspondiente y la distribución de abundancia basada en taxones.

El amplicón fue secuenciado utilizando la plataforma de extremos emparejados de Illumina, lo que permitió generar lecturas sin procesar de extremos emparejados de 250 pares de bases (pb). Posteriormente, estas lecturas se fusionaron y pretrataron para obtener etiquetas limpias. En esta etapa, se detectaron y eliminaron las secuencias quiméricas presentes en las etiquetas limpias, resultando en etiquetas efectivas que pueden ser utilizadas para los análisis posteriores (56).

#### **1.3.5. Procesamiento de datos de secuenciación**

Las lecturas de extremos emparejados se asignaron a las muestras en función de sus códigos de barras únicos y se truncaron cortando las secuencias de códigos de barras y cebadores. Las lecturas de extremos emparejados se fusionaron utilizando FLASH (V1.2.7) (58), una herramienta de análisis muy rápida y precisa, hecha para fusionar lecturas de extremos emparejados cuando al menos algunas de las lecturas se superponen a la lectura generada desde el extremo opuesto del mismo fragmento de ADN, y las secuencias de empalme se denominaron etiquetas sin procesar. El filtrado de calidad en las etiquetas crudas se realizó bajo condiciones de filtrado específicas para obtener las etiquetas limpias de alta calidad (59), de acuerdo con el proceso de control de calidad Qiime (V1.7.0) (56).

Las etiquetas se compararon con la base de datos SILVA138, (base de referencia) utilizando el algoritmo UCHIME para detectar secuencias de

quimeras que luego se eliminaron para, finalmente obtener las etiquetas efectivas (60).

### 1.3.6. Clúster OTU y anotación taxonómica

El análisis de las secuencias se realizó mediante el software Uparse utilizando todas las etiquetas efectivas. Las secuencias con  $\geq 97\%$  de similitud se asignaron a las mismas OTU. Se seleccionó la secuencia representativa de cada OTU para realizar más anotaciones (57).

## 1.4. Análisis bioinformático

Posteriormente, para el análisis bioinformático llevado a cabo por Biosequence, se realizó una verificación de la integridad de los datos, asegurando que toda la información necesaria fuera recopilada de manera completa. Seguidamente, se implementó un proceso de filtrado de datos para identificar y eliminar características con baja probabilidad de ser utilizadas en el modelado de datos. Posteriormente, se procedió con la normalización de los datos, ajustando el número de lecturas para que fueran homogéneos, lo cual es esencial para facilitar la comparación entre grupos, específicamente en el análisis de la diversidad beta.

Las herramientas empleadas en el análisis bioinformático incluyeron R y MicrobiomeAnalyst. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando una variedad de métodos comúnmente aplicados en el estudio de microbiomas. Se realizó una exploración visual mediante gráficos de barras apiladas, gráficos circulares y curvas de rarefacción. El perfil de la comunidad se analizó mediante el estudio de la diversidad alfa y beta.

La diversidad alfa se evaluó utilizando la prueba estadística de Mann-Whitney Kruskal-Wallis. Para analizar la diversidad beta, se aplicó el método de ordenación de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y se utilizó el índice de Bray-Curtis para calcular las diferencias en la abundancia de características del microbioma. Además, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) para comparar las variaciones en la abundancia y composición de especies entre los distintos grupos.

Finalmente, para determinar la validez, se estimará la sensibilidad y especificidad de la NGS frente al diagnóstico de NAV, dado por el personal médico en la historia

clínica allí se comparará mediante las fórmulas correspondientes que son las siguientes (61).

**Cuadro 2**  
**Resultados de la prueba y la existencia de la enfermedad**

		Criterios de verdad		
		Enfermos	No enfermos	Total
Prueba diagnostica	Positivos	a	b	a+b
	Negativos	c	d	c+d
Total		a+b	b+d	a+b+c+d

**Nota: Ferry, (61).**

Donde:

a = número de pacientes con la enfermedad diagnosticados como "positivos" por la prueba.

b = número de pacientes sin la enfermedad diagnosticados como "positivos" por la prueba.

c = número de pacientes con la enfermedad diagnosticados como "negativos" por la prueba.

d = número de pacientes sin la enfermedad diagnosticados como "negativos" por la prueba.

Puede apreciarse que cada celda de la tabla refleja una característica que también suele calificarse de la manera siguiente:

a = Verdaderos positivos (VP)

b = Falsos positivos (FP)

c = Falsos negativos (FN)

d = Verdaderos negativos (VN) (61).

Con estos términos, la tabla puede expresarse así:

**Cuadro 3**  
**Resultados de la prueba y la existencia de la enfermedad**

		Criterios de verdad		Total
		Enfermos	No enfermos	
Prueba diagnostica	Positivos	VP	FP	VP+FP
	Negativos	FN	VN	FN+VN
Total		VP+FN	FP+VN	N= (VP+FP+FN+VN)

**Nota: Ferry, (61).**

Donde:

VP: verdaderos positivos

FP: falsos positivos

FN: falsos negativos

VN: verdaderos negativos (61).

Por tanto, los estimadores de las probabilidades descritas son, naturalmente, los siguientes:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Total de enfermos}} = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Total de no enfermos}} = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{d}{b+d}$$

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. RESULTADOS

### 1.1. Datos del estudio

El presente capítulo muestra los resultados de la secuenciación de las muestras de secreción bronquial de los pacientes que se encuentran en ventilación mecánica en la UCIE en un hospital de la Seguridad Social, en el área de emergencia, debido a que los pacientes críticamente enfermos tributarios de ventilación mecánica permanecen en su gran mayoría en esta unidad para posteriormente pasar a la UCI polivalente del hospital, además estando en esta unidad la posibilidad de estar frente a una contaminación intrahospitalaria debería ser menor, puesto que el paciente es recién admitido de su hogar, lo que daría menos probabilidad de sesgo para identificación de la microbiota, además, se propone una serie de criterios de exclusión, por lo que la ventilación mecánica en este grupo se atribuyó principalmente a un motivo quirúrgico, ello con el objetivo de tratar de delimitar los cambios en la microbiota, a la ventilación mecánica y que no se vea influenciada por otras patologías con microbiotas características.

### 1.2. Características clínicas de los pacientes

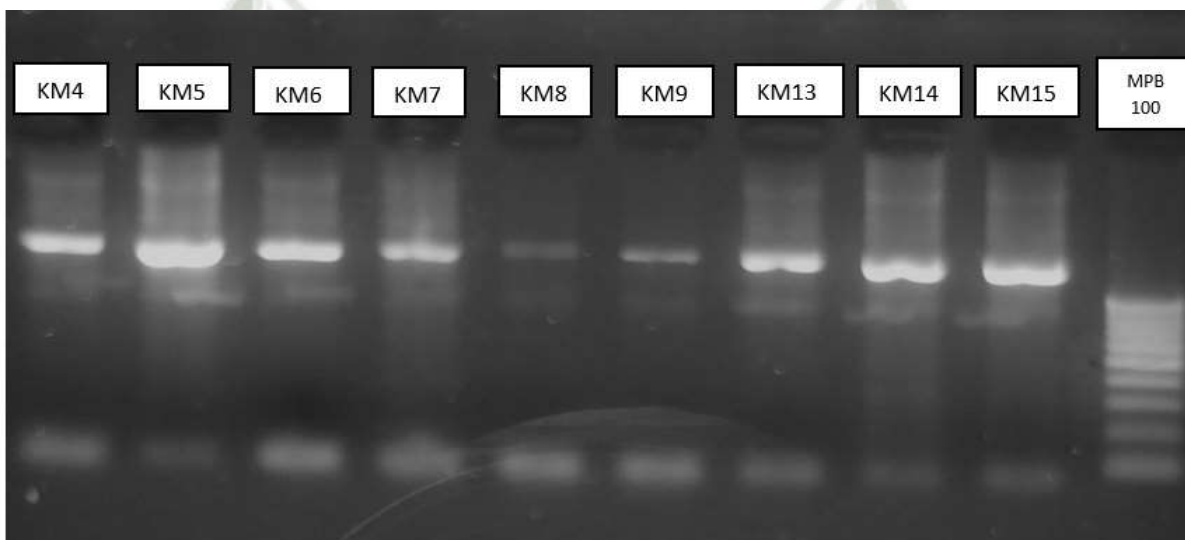
Como se aprecia en el diagrama 1 y de acuerdo a los criterios de exclusión y los objetivos planteados, finalmente se trabajó con 27 muestras correspondientes a 9 pacientes, el número de pacientes investigados es limitado y reducido por el costo y la complejidad del procedimiento de secuenciación. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 1 donde se observa que las edades de los pacientes bordean entre los 49 y 81 años, todos tuvieron un motivo de ingreso de tipo quirúrgico, seis de los nueve pacientes presentaban comorbilidades de tipo crónico no transmisible; los días que los pacientes permanecieron en la unidad variaron de 7 a 24 días con un promedio de 15.4 días; similares son los días que estuvieron bajo ventilación mecánica que fueron entre 6 a 24 días con una media de 14.7; los pacientes que sobrevivieron, permanecieron en la unidad de 1 a 3 días posteriores a la extubación, el promedio de puntuación APACHE II, que es un sistema para clasificar la gravedad de una enfermedad usada en los pacientes críticos en las unidades de cuidados intensivos, fue de 20.2 puntos lo que predice una mortalidad aproximada del 40% (62).

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes en ventilación mecánica en la UCIE**

PACIENTE	SEXO	EDAD	MOTIVO DE INGRESO		COMORBILIDADES	DÍAS DE	DÍAS DE	APACHE II SCORE
			MÉDICO	QUIRÚRGICO		VENTILACIÓN MECÁNICA	ESTANCIA EN UCIE	
B	Femenino	49		Politraumatismo abdominal cerrado	Ninguna	17	20	15
D	Femenino	75		Trombosis mesentérica	Ninguna	24	24	23
G	Masculino	51		Politraumatizado/TEC grave	HTA	11	11	20
H	Femenino	72		Perforación gástrica	HTA, ERC en hemodiálisis, FARVA, esófago de Barret	7	7	24
I	Masculino	81		TEC grave, hematoma subdural	DM II	23	23	22
J	Masculino	65		TEC grave	HTA	6	7	15
K	Femenino	77		Vólvulo de sigmoides, obstrucción intestinal	Ninguna	11	11	17
L	Femenino	77		Hemorragia subaracnoidea	Cirrosis hepática	11	11	28
M	Masculino	60		Hematoma subdural, laminar parietoccipital	HTA, ERC en hemodiliasis	23	25	18

### 1.3. PCR para amplificación del gen 16S rRNA

De las muestras obtenidas, para establecer la presencia del gen 16S rRNA se utilizó la amplificación por PCR, ya que las secuencias del gen 16S rRNA contienen regiones hipervariables que pueden proporcionar secuencias distintivas específicas de especies útiles para la identificación de bacterias. En la Figura 1 se observa la amplificación de 9 muestras luego de ser sometidas al proceso de extracción de ADN y proceso de PCR, el tamaño del amplicón del gen es de aproximadamente 1500pb, en el pozo del extremo izquierdo se colocó un marcador de peso molecular, como estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas (62).



**Figura 1. Amplificación del gen 16S rRNA de 9 muestras de ADN bacteriano de secreción bronquial.**

### 1.4. Procesamiento de los datos para secuenciación

Las muestras fueron enviadas a Novogene para su secuenciación, previo a este proceso, se realiza un control de calidad para asegurar la integridad de los datos, por lo que las lecturas siguen un proceso, generándose los datos que se muestran en la Tabla 2, donde raw PE, representa las lecturas de PE originales después de la secuenciación; raw Tags, representa etiquetas fusionadas de lecturas de PE; clean tags representa las etiquetas después del filtrado, las etiquetas efectivas representan etiquetas después de filtrar las quimeras y finalmente se pueden usar los datos para análisis posteriores.

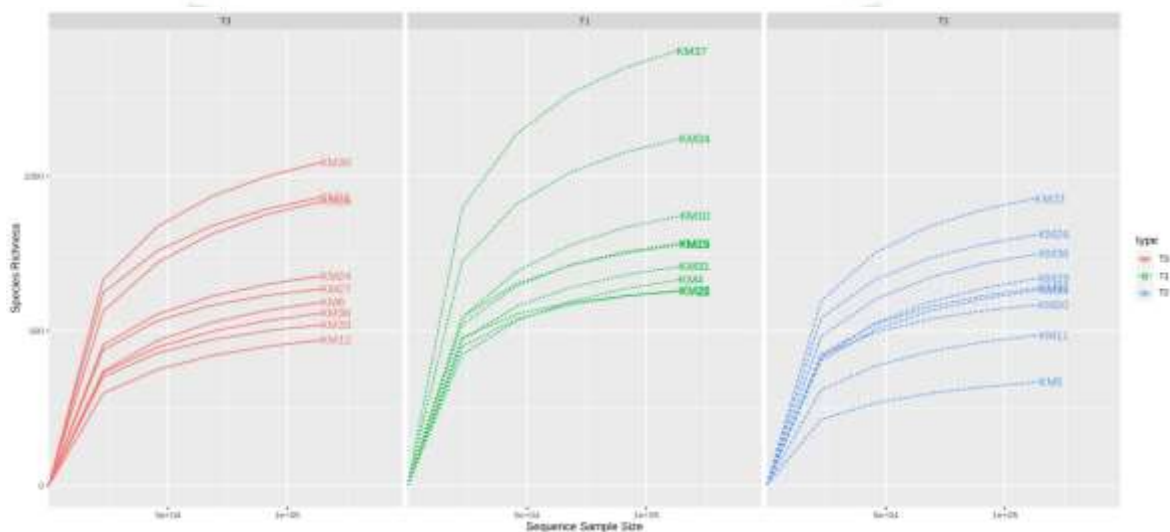
**Tabla 2. Estadísticas de control de calidad**

Nombre de la muestra	Raw PE	Raw Tags	Clean Tags	Effective Tags	Base	Avg Lent	Q20	Q30	GC%	Efectivas
KM4	185.797	163.823	157.541	148.335	63.312.079	427	97,43	92,42	51,49	79,84
KM5	183.183	165.678	160.206	155.615	66.564.980	428	97,41	92,24	51,38	84,95
KM6	188.565	169.098	163.963	156.019	65.725.169	421	97,6	92,78	52,13	82,74
KM10	182.640	166.137	163.018	147.322	62.571.159	425	97,83	93,23	54,48	80,66
KM11	181.944	160.007	154.638	148.679	62.088.607	418	97,4	92,47	52,74	81,72
KM12	174.047	154.065	149.131	144.286	61.118.599	424	97,4	92,24	54,18	82,9
KM19	184.710	163.624	158.206	135.081	56.955.460	422	97,21	92,19	52,72	73,13
KM20	176.495	150.756	144.172	128.287	53.918.385	420	97,21	92,17	52,15	72,69
KM21	178.721	161.092	158.357	136.920	56.166.081	410	98,08	93,97	53,6	76,61
KM22	180.469	155.964	151.533	128.975	53.564.593	415	97,36	92,52	52,87	71,47
KM23	176.102	155.778	151.785	127.365	53.618.102	421	97,52	92,81	53,48	72,32
KM24	184.048	162.497	157.563	142.328	59.703.372	419	97,43	92,56	53,25	77,33
KM25	176.118	154.747	150.000	127.358	53.655.065	421	97,31	92,35	52,09	72,31
KM26	188.583	165.462	160.465	139.004	58.747.746	423	97,26	92,26	52,1	73,71
KM27	170.734	143.127	138.971	125.890	53.122.554	422	97,36	92,43	51,69	73,73
KM28	175.800	153.240	149.698	128.887	54.307.355	421	97,61	92,98	51,82	73,31
KM29	177.091	152.099	148.126	134.739	56.970.045	423	97,54	92,79	51,11	76,08
KM30	189.493	167.856	164.465	138.031	58.026.687	420	97,83	93,41	51,51	72,84
KM31	187.046	164.415	159.960	146.556	60.816.898	415	97,6	92,88	52,4	78,35
KM32	179.446	163.139	158.490	148.148	62.797.000	424	97,62	92,91	51,71	82,56
KM33	176.295	147.343	143.062	125.096	52.634.712	421	97,4	92,53	51,36	70,96
KM34	183.918	159.227	155.698	128.846	54.230.580	421	97,69	93,15	51,49	70,06
KM35	180.053	153.982	150.064	143.048	58.603.233	410	97,59	92,9	52,06	79,45
KM36	178.048	158.631	154.002	145.998	61.894.165	424	97,55	92,61	51,75	82
KM37	171.261	133.714	130.335	116.648	47.532.480	407	97,78	93,26	52,01	68,11
KM38	179.734	157.845	153.668	140.695	58.944.904	419	97,62	92,95	53,12	78,28
KM39	181.688	165.756	162.418	137.948	58.596.712	425	97,88	93,29	53,84	75,93

Nota: PE: Pair-end; Raw PE representa las lecturas de PE originales después de la secuenciación; Raw Tags representa etiquetas fusionadas de lecturas de PE; Clean Tags representa las etiquetas después del filtrado; Effective Tags representan etiquetas después de filtrar la quimera y finalmente se pueden usar para análisis posteriores; Base (nt) es el número de bases de las Etiquetas Efectivas; AvgLen (nt) representa la longitud promedio de las etiquetas efectivas; Q20 y Q30 son los porcentajes de bases cuyo valor de calidad en Etiquetas Efectivas es superior a 20 (tasa de error de secuenciación inferior al 1%) y 30 (tasa de error de secuenciación inferior al 0,1%); GC (%) representa el porcentaje de GC en etiquetas efectivas; Effective (%) representa el porcentaje de etiquetas efectivas en Raw PE (62).

### 1.5. Curvas de rarefacción

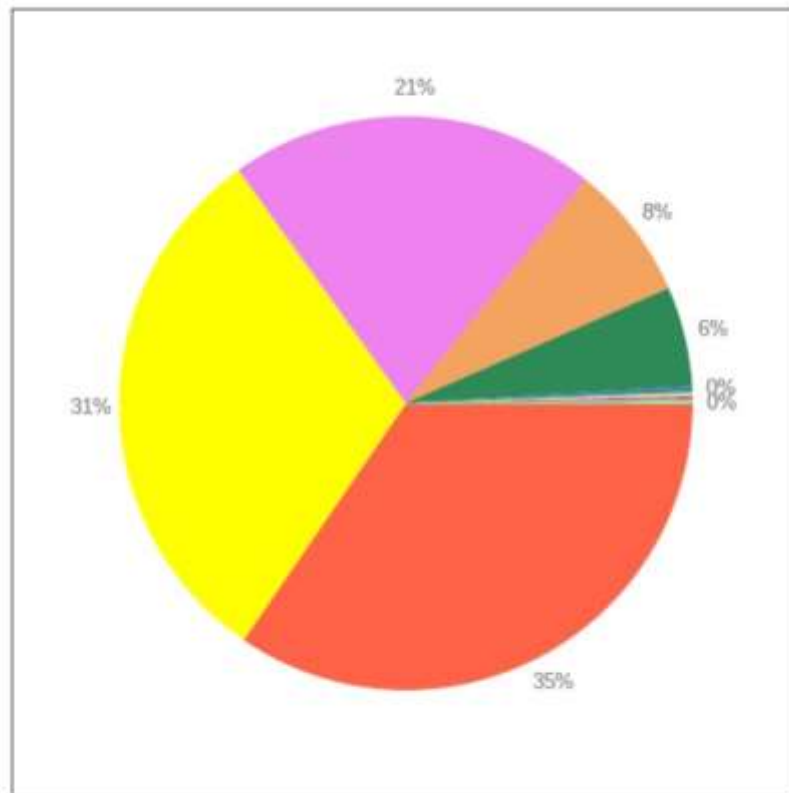
Una vez agrupados en OTUs, se presentan las curvas de rarefacción, aquí se muestran la relación entre el número de OTU y el número de secuencias. Por lo general, cuanto más profundidad en la secuencia, más especies se observará. En la figura 2 se observa las curvas de rarefacción por cada punto de tiempo, además se puede ver que la secuenciación fue la adecuada, ya que la curva llega a ser asíntota, quiere decir que se tuvo un buen muestreo de acuerdo al buen número de OTUs identificadas.



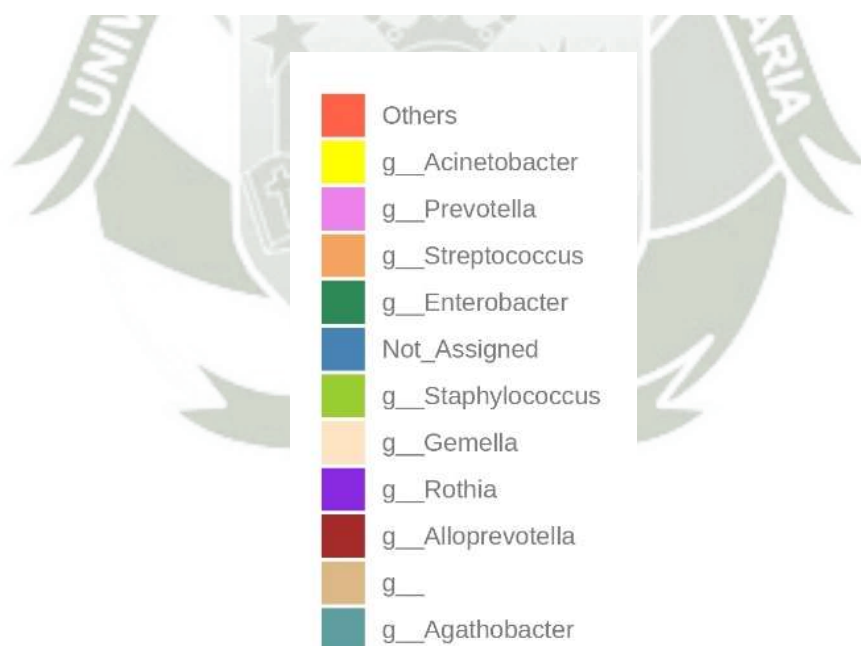
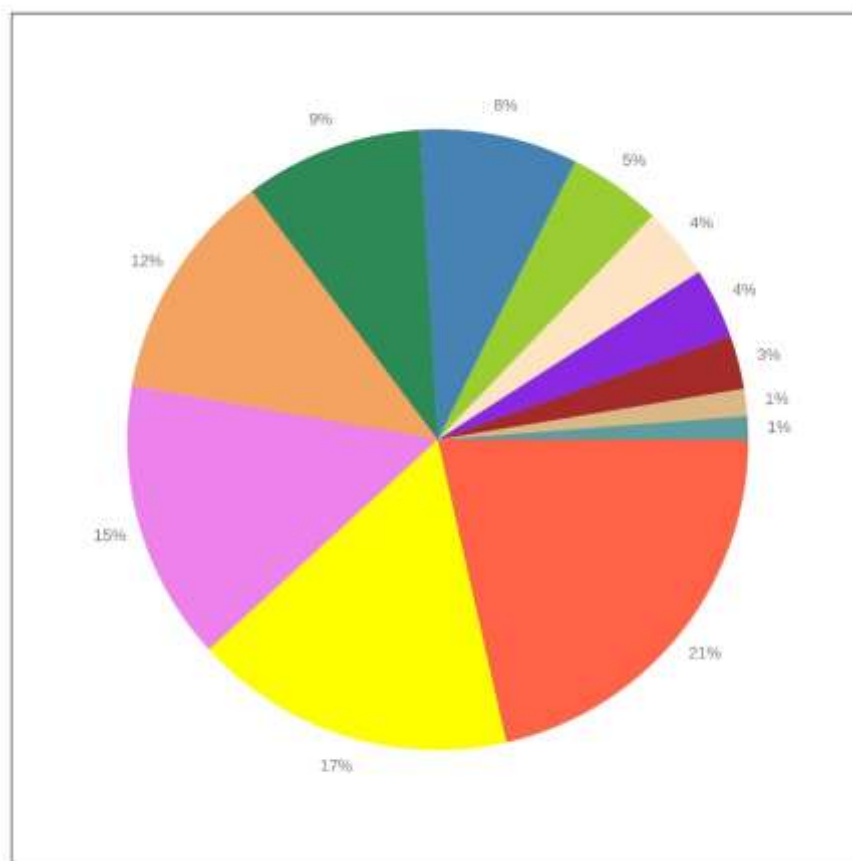
**Figura 2. Curvas de rarefacción de las OTU identificadas y por puntos de tiempo**

### 1.6. Composición taxonómica de las muestras

La composición taxonómica del total de las muestras, según su abundancia y de acuerdo al filo y género; se aprecia en la figura 3, siendo el filo más abundante: Proteobacteria (35%), Firmicutes (31%) y Bacteroidota (21%) y de acuerdo al género (figura 4), el más abundante fue: *Acinetobacter* con 21%, género perteneciente al filo Proteobacteria, seguido de *Prevotella* (17%), *Streptococcus* (15%) y *Enterobacter* (12%).



**Figura 3. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de filo**



**Figura 4. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género**

### 1.7. Composición taxonómica por puntos de tiempo

Para valorar los cambios en el transcurso de la ventilación mecánica, se tomaron tres puntos de tiempos, como se aprecia en la Tabla 3, en el primer punto (dentro de las primeras 24 horas) filos identificados fueron: Firmicutes (39%), Proteobacteria (29%) y Bacteroidota (20%), en el segundo punto estos cambiaron a Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidota con 34, 29 y 21%, para permanecer en el mismo orden en el tercer punto, sin embargo hay un incremento en el filo Proteobacteria a 41%, seguido de Firmicutes con 24% y Bacteroidota con 22%.

**Tabla 3. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de filo por puntos de tiempo**

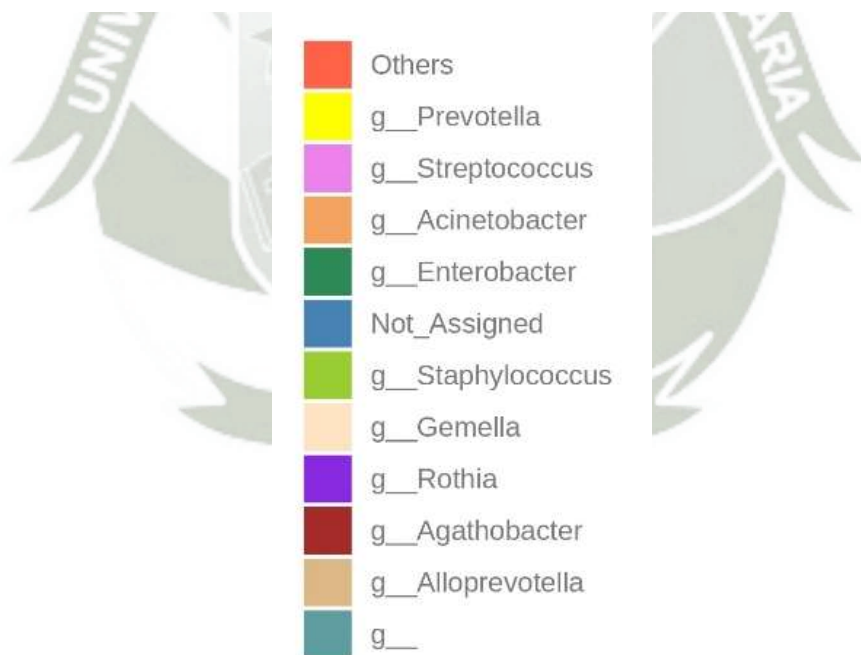
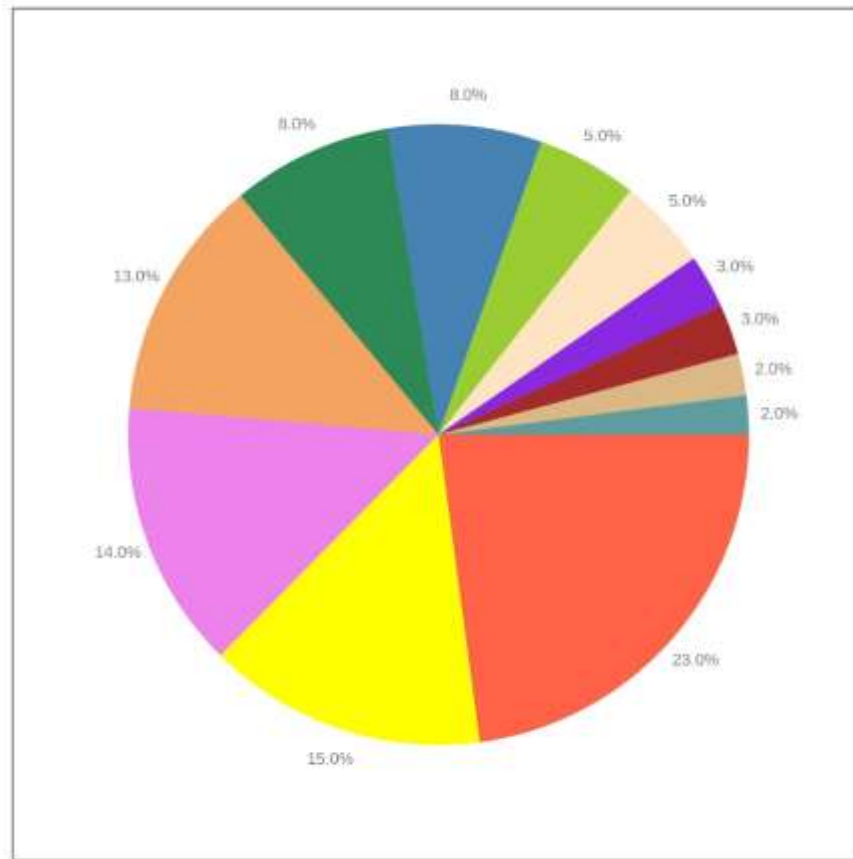
Puntos de tiempo Filo	Primero	Segundo	Tercero
<b>Firmicutes</b>	39%	29%	24%
<b>Proteobacteria</b>	29%	34%	41%
<b>Bacteroidota</b>	20%	21%	22%
<b>Otros</b>	12 %	16%	13 %

En cuanto a las variaciones a nivel de género, se tiene la tabla 4 donde se aprecia que en el primer punto la categoría con más porcentaje es “otros”, esto se refiere a géneros con porcentajes no significativos pero que sumados nos dan este valor, de allí, están presentes los género: *Prevotella* con 15%, *Streptococcus* (14%), y *Acinetobacter* (13%), y en menor porcentaje *Enterobacter* (8%), para el segundo punto hay un incremento de *Acinetobacter* con 19% seguido de *Prevotella* 14%, *Streptococcus* 13% y *Enterobacter* con 7% y finalmente para el tercer punto: *Acinetobacter* ocupa un 18 %, *Prevotella* 15%, *Enterobacter* 12% y *Streptococcus* 9%, si bien *Prevotella* mantiene su porcentaje a lo largo de los días, se evidencia un amento de gérmenes nosocomiales como *Acinetobacter* y *Enterobacter*, dichas abundancias se ven también en las figuras 5,6 y 7.

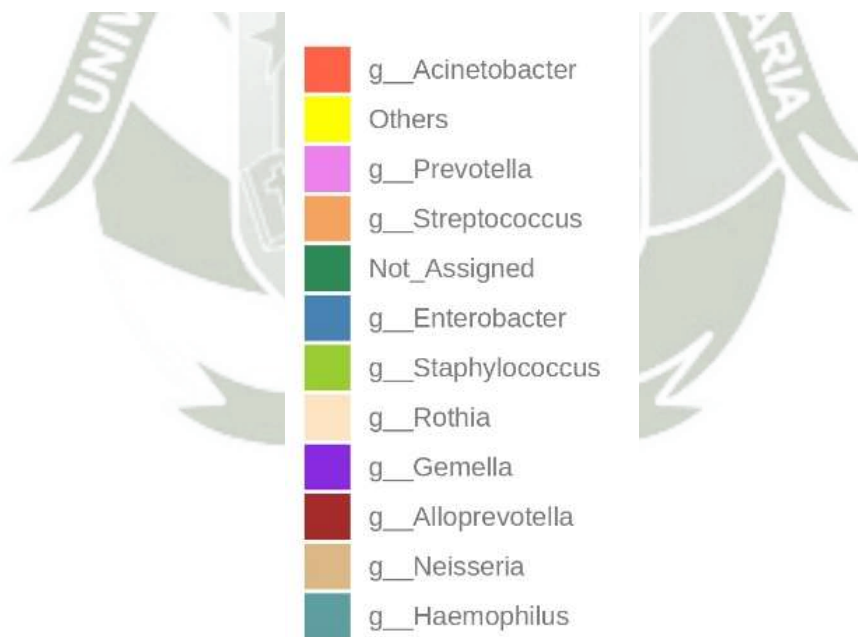
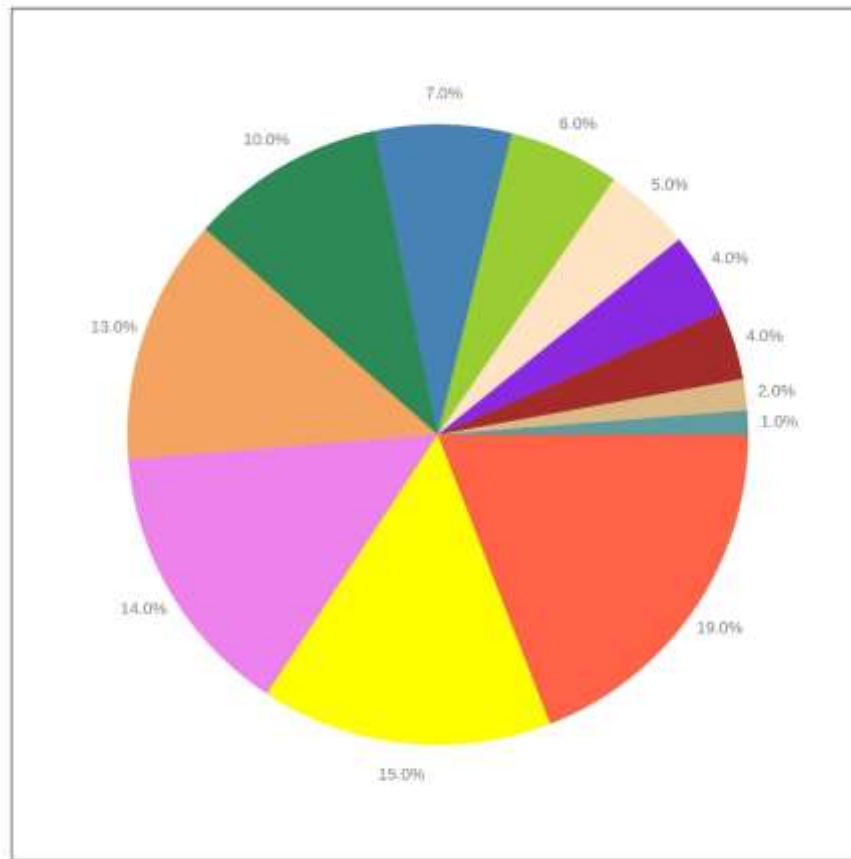
**Tabla 4. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género por puntos de tiempo**

<b>Puntos de tiempo</b>	<b>Primero</b>	<b>Segundo</b>	<b>Tercero</b>
<b>Género</b>			
<b>Prevotella</b>	15%	15%	15%
<b>Streptococcus</b>	14%	9%	9%
<b>Acinetobacter</b>	13%	19%	18%
<b>Enterobacter</b>	8%	12%	12%
<b>Otros</b>	23%	15%	23%

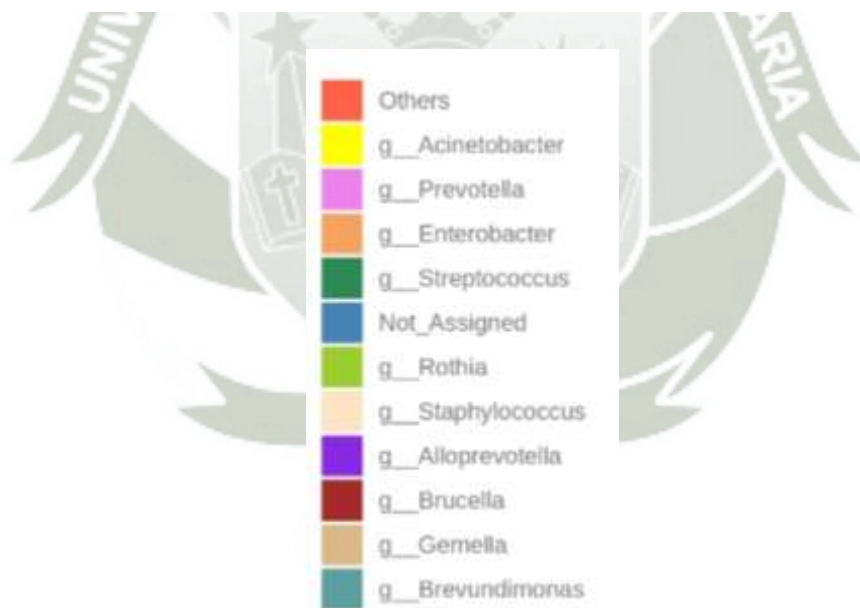
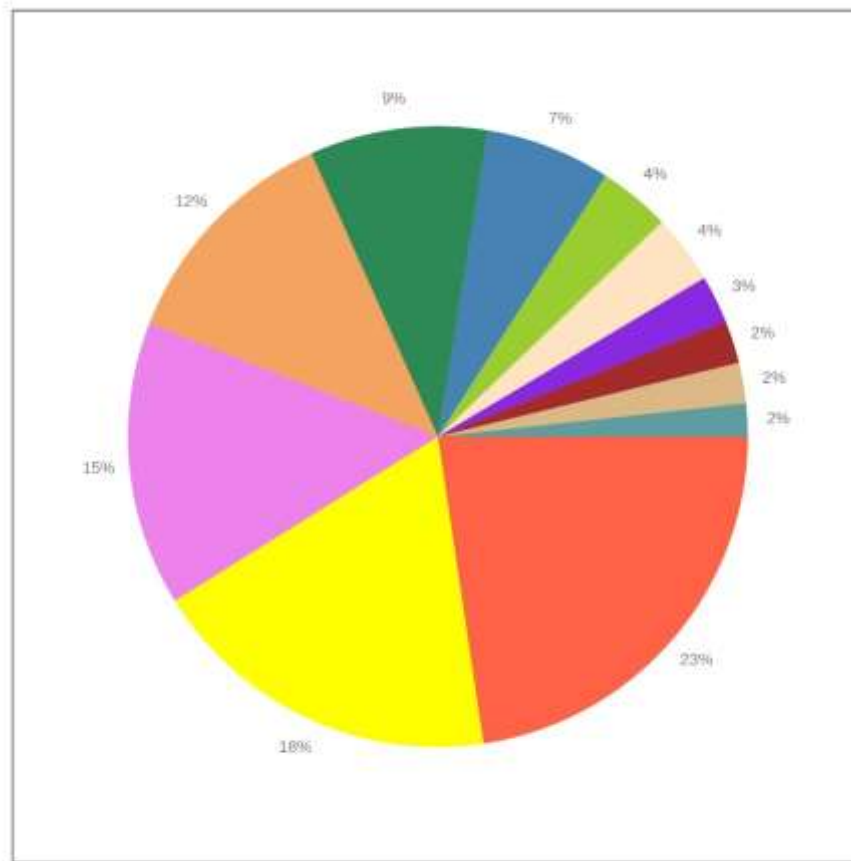




**Figura 5. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género en el primer punto de tiempo**



**Figura 6. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género en el segundo punto de tiempo**



**Figura 7. Composición taxonómica de la comunidad a nivel de género en el tercer punto de tiempo**

### 1.8. Diversidad alfa en las muestras

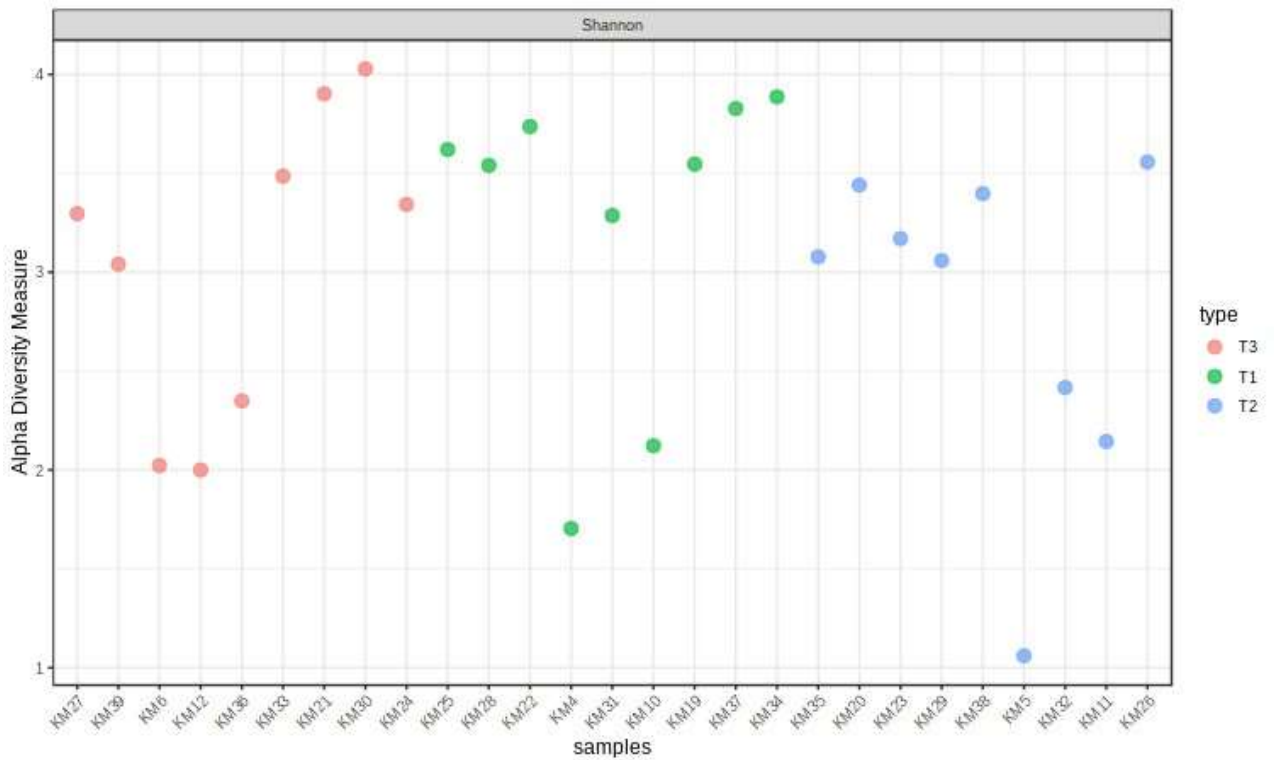
La diversidad alfa, es uno de los índices más básicos e importantes de diversidad, ya que representa la diversidad dentro de una misma muestra; el análisis de los diferentes índices a través de los cuales se presentan los resultados del análisis de la microbiota varía de acuerdo al objetivo del estudio, siendo el más comúnmente utilizado y representativo el índice de Shannon, de acuerdo al cual muchos estudios definen si la diversidad fue significativa o no.

En la tabla 5 se muestra los valores de índice de diversidad alfa según el índice de Shannon el cual nos indica que tan uniformes están representadas las especies en abundancia teniendo en cuenta todas las especies muestreadas. Se observa los valores del índice de Shannon (que van de 0 a 5) en los tres puntos de tiempo, en nuestro caso se puede apreciar que del primer al segundo tiempo la diversidad alfa disminuye en todos los pacientes, sin embargo para el tercer punto la tendencia ya no es la misma, y solo en 4 de los 9 pacientes continúa disminuyendo y en los otros 5 esta se incrementa nuevamente pero de forma discreta, dichos cambios sin embargo, no resultaron estadísticamente significativos ( $p = 0.31388$ ). En la figura 8 se expresa gráficamente los valores mencionados.

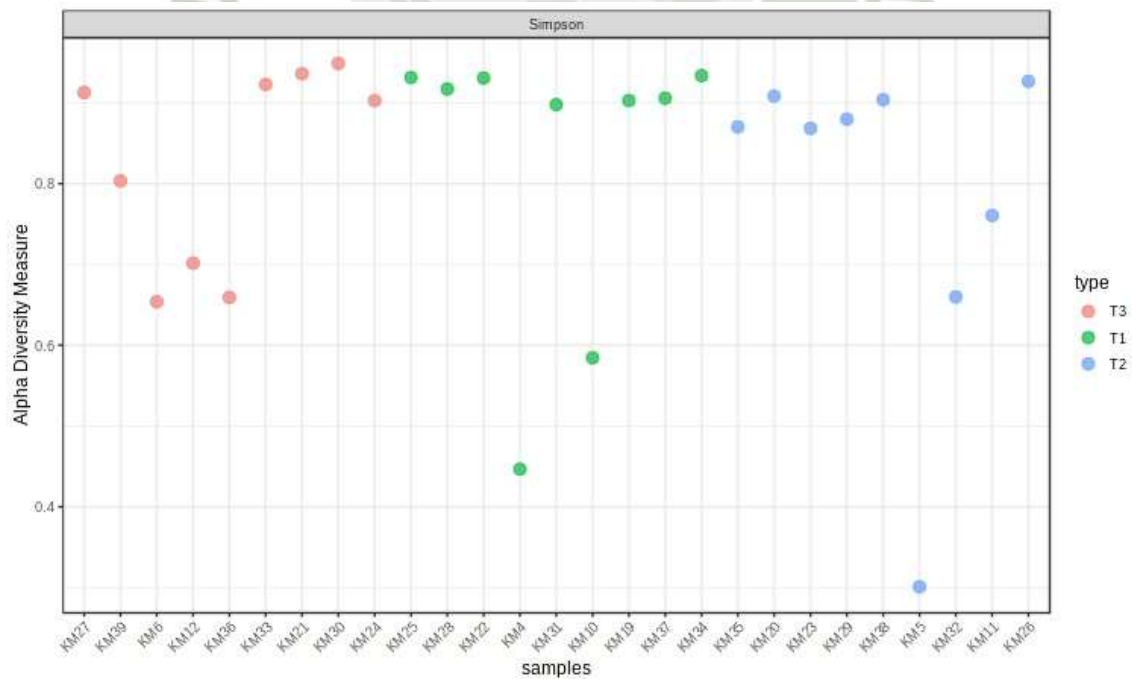
Se muestra también en la misma tabla los valores del índice de Simpson, dicho valor también representa riqueza y uniformidad, sin embargo, este valor no sigue una tendencia única de un punto de tiempo a otro, y estadísticamente tampoco resulto significativa ( $p=0.50444$ ), lo que se muestra gráficamente en la figura 9.

**Tabla 5. Medida de diversidad alfa según índice de Shannon y Simpson a nivel de OTU**

PACIENTE	ÍNDICE DE SHANNON			ÍNDICE DE SIMPSON		
	PRIMERA MUESTRA	SEGUNDA MUESTRA	TERCERA MUESTRA	PRIMERA MUESTRA	SEGUNDA MUESTRA	TERCERA MUESTRA
B	3.736332805	3.170175466	3.342650618	0.446644593837737	0.301049914456182	0.653811990868664,
J	3.827675029	3.397090044	3.040365643	0.917139426424648,	0.87979264463533	0.948772682649302
M	3.546497039	3.440554797	3.902028785	0.905737625611177	0.903877769171183	0.803374632324648
D	3.620327968	3.557120933	3.296351812	0.5844145260226	0.760517676977532	0.7015076329973
G	3.540101789	3.058697815	4.028108881	0.902816041659464	0.908393748516105	0.93606221898009
H	3.286737697	2.416965085	3.485816412	0.93061868753361	0.868356745872022	0.902777988357675
I	3.886343421	3.077643829	2.348966265	0.931325624763024	0.926605245096594	0.912846241131638,
K	1.703841395	1.060466146	2.022827882	0.897766958396941	0.659747901956934	0.922785034055315
L	2.152656052	2.143932111	1.999730777	0.933665746822255	0.870222400805939	0.659180245284323



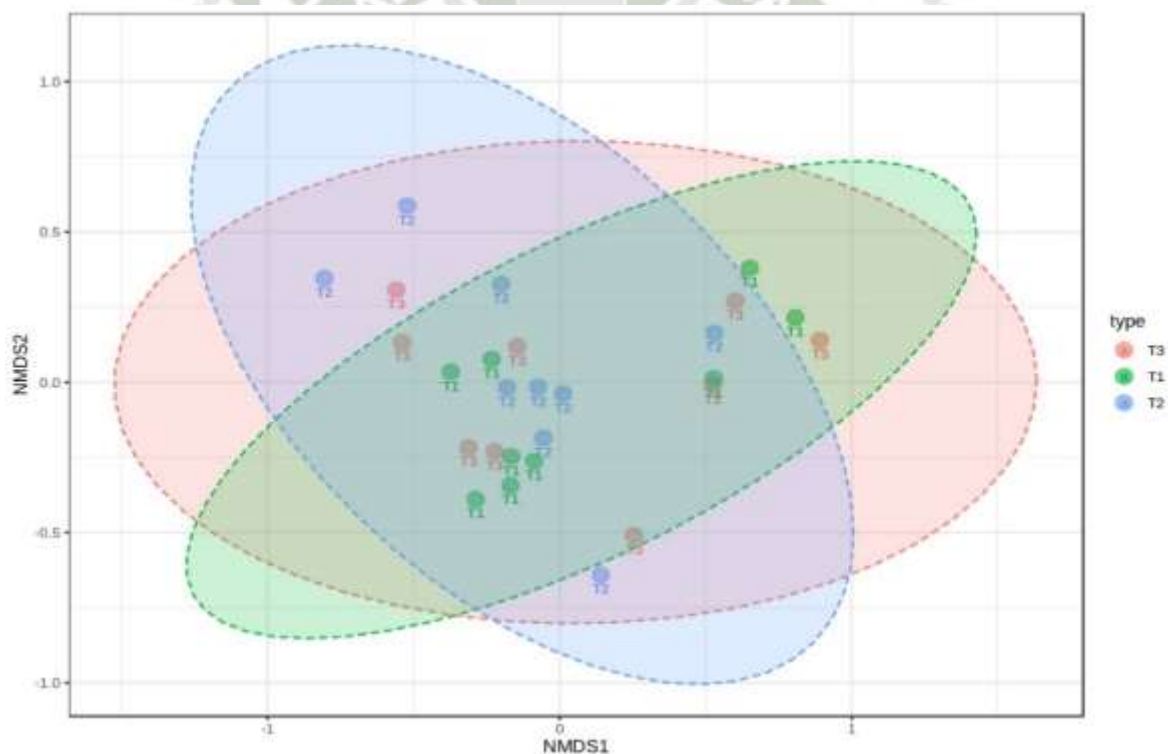
**Figura 8. Diversidad alfa de las muestras por el índice de Shannon**



**Figura 9. Diversidad alfa de las muestras por el índice de Simpson**

### 1.9. Diversidad beta

Para el análisis de dos comunidades microbianas, se realiza el análisis de la diversidad beta, que compara los cambios en la presencia/ausencia o abundancia de miles de taxones presentes en un conjunto de datos y los resumen en qué tan ‘similares’ o ‘diferentes’ son entre dos muestras. En relación a la diversidad beta, la figura 10 de NMDS en 2-D muestra la diversidad beta entre los tres grupos de tiempo, como se puede ver todas las muestras se encuentran confluyentes, lo que pone en evidencia visual que no hay diferencias, se comprueba utilizando la distancia de Bray-Curtis con el método estadístico de ANOSIM donde el valor del estadístico R es de  $-0.084438$  y  $p$  es  $< 0.955$ , no resultando significativo la diferencia entre estos grupos.



**Figura 10. Gráfico de NMDS de la medida de diversidad beta según puntos de tiempo**

### 1.10. Sensibilidad y especificidad de la NGS frente al diagnóstico de NAV

La tabla 6 muestra el consolidado de los resultados obtenidos mediante cultivo microbiológico convencional frente al diagnóstico clínico de NAV (anexo N° 3 ), mostrando los verdaderos positivos y falsos negativos y después de aplicar las fórmulas descritas en la metodología, se encuentra una sensibilidad del 75% (mayor coincidencia de verdaderos positivos) la que es relativamente aceptable detectando la enfermedad en pacientes que realmente la padecen, y una especificidad del 46.6% por lo que se podría decir que el cultivo convencional podría servir como tamizaje para diagnóstico de NAV, mas no para descartar esta patología al tener una baja especificidad.

**Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de cultivo microbiológico convencional**

Neumonía asociada a ventilador			
Resultados	Presencia	Ausencia	Total
Cultivo microbiológico (+)	9	8	17
Cultivo microbiológico (-)	3	7	10
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	

Donde:

- Sensibilidad=  $9/9+3 = 0.75$
- Especificidad=  $7/7+8 = 0.46$

La tabla 7 muestra la sensibilidad y especificidad de la NGS frente al diagnóstico hecho por el clínico, de NAV, encontrándose una sensibilidad del 25% y especificidad del 93.3%, siendo esta una baja sensibilidad y una alta especificidad, que quiere decir que detecta en baja cantidad a los pacientes con patógenos y que tengan la enfermedad, pero podría ser válida para determinar que si efectivamente en la NGS no hay una abundancia de germen patógeno, el paciente realmente no tiene NAV.

**Tabla 7. Sensibilidad y especificidad de la NGS**

Resultados	Neumonía asociada a ventilador		Total
	Presencia	Ausencia	
NGS con mayor abundancia para germen intrahospitalario	3	1	4
NGS no germen intrahospitalario	9	14	23
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	

Donde:

- Sensibilidad=  $3/3+9= 0.25$
- Especificidad=  $14/14+1=0.93$



## 2. DISCUSIÓN

El rol de la microbiota en la salud humana se considera cada vez más importante, y aunque la microbiota de individuos sanos es estable en el tiempo, se producen cambios en ella debido al estilo de vida, la dieta y las enfermedades (63). De un inicio se consideró como estéril al pulmón humano, pero de allí se iniciaron estudios a través de distintas técnicas moleculares que demostraron que contiene bacterias (64). Los estudios han utilizado principalmente las técnicas de lavado broncoalveolar, cepillado broncoscópico o muestras de esputo, una problemática que se presenta allí es la contaminación por la parte superior del tracto respiratorio o la microbiota propia de la boca. En nuestro estudio se trató de minimizar este sesgo utilizando un recolector de secreción bronquial (no habitualmente usado por las instituciones hospitalarias en nuestro medio), y similar a lo utilizado en otros estudios como el de Min-Gyun Baek, et al. donde también se utilizó una trampa de Lukens (65).

Respecto a nuestros resultados, el grupo se trató de delimitar mediante la técnica y los criterios de exclusión para poder aislar una microbiota propia de este grupo de pacientes en nuestro medio, ya que en especial en enfermedades respiratorias se ha visto bacterias predominantes; los tiempos se manejaron tomando como referencia otros estudios.

En general, en todo el grupo la microbiota estuvo dominada por los filos Proteobacteria (35%) y Firmicutes (31%) y Bacteroidota con menos presencia (21%), y en cuanto a género los más abundantes fueron: *Acinetobacter* (21%), perteneciente al filo Proteobacteria, y *Prevotella* (17%), perteneciente al Filo Bacteroidota, seguido de *Streptococcus* y *Enterobacter*, se puede notar diferencias en los géneros encontrados respecto a los estudios que muestran microbiota en pacientes sanos, como en el estudio de Daphnee Lamarche, et al. donde los géneros con más abundancia fueron *Veillonella*, *Prevotella* y *Neisseria* en el tracto respiratorio inferior (55), mientras que en el estudio de Christine M. Bassis, et al. que tomaron muestras de boca, la nariz estómago, y pulmón, los géneros prominentes en las muestras de BAL incluyeron *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus*, géneros que también se detectaron en muestras de cavidad oral (tomadas en un mismo momento), pero la abundancia de *Prevotella* del líquido de BAL no se encontraba proporcionalmente distribuida entre la boca y el pulmón (mientras que si lo hacían entre pulmón y el estómago), numerosas OTUs de este género de abundancia alta y moderada en cavidad oral dentro de un mismo

sujeto, estaban por debajo del límite de detección en comunidades de líquido BAL, por lo que se concluyó que el pulmón muestra evidencia de eliminación selectiva de especies de *Prevotella*, este hallazgo pudiera ser concordante con la baja abundancia de este género en nuestro grupo de pacientes (15).

Respecto a otras patologías, se ha observado una microbiota diversa y diferente, por ejemplo, en el estudio de Lee, et al en Seúl mediante la misma técnica, se incluyeron a 20 pacientes con cáncer de pulmón y 8 pacientes con enfermedad benigna A nivel de análisis de género, *Veillonella* y *Megasphaera* fueron significativamente más abundantes en pacientes con cáncer de pulmón que en pacientes con enfermedad benigna (66), en otro estudio de Dicker, et al. en un grupo de pacientes con EPOC se identificó como filos predominantes a Proteobacteria y Firmicutes y a nivel de género se encontraron *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella* y *Prevotella*, aquí la dominancia de Proteobacterias se asoció a una mayor mortalidad en comparación a Firmicutes (67), cabe notar que este es el filo también más presente en nuestro estudio, probablemente porque en este caso se trataba de pacientes críticamente enfermos con más probabilidad de fallecer a diferencia de pacientes en otras unidades, este hallazgo se encuentra también de acorde con un estudio de Dickson, et al. en pacientes con síndrome de distrés respiratorio, en donde el enriquecimiento con el filo Proteobacteria se correlaciona de forma positiva significativa con el TNF- $\alpha$  alveolar (que se relaciona con el diagnóstico y la gravedad de la sepsis) (68).

Ya que la microbiota también varía en cuanto a geografía, cabe notar que a nivel local (Arequipa), al momento de esta revisión solo se encontró un estudio que utilizó la next generation sequencing, tomando en cuenta a pacientes con tuberculosis pulmonar (con, sin tratamiento y con tuberculosis multidrogo resistentes) así como a algunos pacientes sanos, hallando respectivamente en el primer y segundo grupo a los siguientes géneros: *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus*, en el tercer grupo a *Neisseria* y *Alloprevotella* y en los pacientes sin tuberculosis a *Prevotella* y *Veillonella*; y en todo el estudio en general predominó *Prevotella* y el menos abundante *Staphylococcus* (53), distinguiéndose respecto a nosotros, que en nuestro estudio hay una marcada presencia de gérmenes intrahospitalarios desde el ingreso del paciente, lo que pudiera sugerir que el paciente se contamina rápidamente, en el momento de la intubación endotraqueal

mediante los fómites utilizados o que el entorno físico así como las personas que intervienen provocan también infecciones cruzadas (54).

Respecto del comportamiento de la microbiota en el transcurso de los días, a las 24 horas los géneros más abundantes son: *Prevotella*, *Streptococcus* y *Acinetobacter*, esto varió a las 72 horas, y *Acinetobacter* predominó, seguido de *Prevotella* y *Streptococcus*, aquí se observa una disminución del género *Prevotella* y un incremento de gérmenes nosocomiales característico de las unidades de cuidados intensivos como son *Acinetobacter* y *Enterobacter*; en otro estudio de Woo Seongji, et al. evaluaron pacientes en ventilación mecánica separándolos en grupos de neumonía y no neumonía, en el primer momento los filos predominantes fueron Proteobacteria y Firmicutes y los géneros fueron *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Stafilococcus*, el tercer género no se identificó en nuestro estudio en ningún momento por lo que podría ser propio de la geografía del lugar, además con el transcurso de los días las abundancias de *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Neisseria* (en el grupo que sobrevivió a los 28 días) se enriquecieron al igual que las abundancias de *Corynebacterium* y *Alloprotella* en el grupo que no sobrevivió, en nuestro estudio, este último género se mantuvo constante durante los días, aunque es muy poco representativo (2).

En otro estudio donde Dickson trabaja con pacientes en ventilación mecánica sin síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA) y con SDRA, en el primero encontró a más especies de las familias *Streptococcaceae*, *Veilonellaceae* y *Prevotellaceae*, mientras que en los que tenían SDRA estaba más comúnmente caracterizado por las familias *Pasteurallaceae* y *Enterobacteriaceae*, de estas familias la que presentaba poca presencia en nuestro estudio es *Pasteurallaceae*, además se resalta de este estudio el enriquecimiento del microbioma pulmonar con taxones bacterianos asociados al intestino (familias *Lachnospiraceae* y *Enterobacteriaceae*) que fueron predictivos tanto de malos resultados en la UCI como del diagnóstico de SDRA, lo que fortalecería la idea de que la translocación de bacterias intestinales a los pulmones contribuye a la patogénesis de la lesión pulmonar (69).

En cuanto al análisis de la diversidad de la microbiota, estudios previos como el de Brendan, et al. (45), que comparó muestras de tracto respiratorio superior e inferior en pacientes ventilados con sujetos sanos, identificó que los primeros tenían una menor diversidad inicial en ambos sitios, y mientras más tiempo pasaban en el ventilador esta

disminuía aún más, en otro estudio de Seongji Woo, et al. evaluaron el mismo tipo de pacientes y en general la diversidad  $\alpha$  bacteriana también tendió a disminuir durante la ventilación mecánica, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa, tampoco se encontró diferencia entre los pacientes supervivientes y los fallecidos después de los 28 días, pero la diversidad  $\beta$  sí difirió en el día 1, los pacientes con neumonía se subdividieron además en grupos de extubación exitosa y extubación fallida, y si bien la diversidad  $\alpha$  (índice de Shannon) disminuyó significativamente entre el día 1 y el día 7 en el grupo de extubación exitosa, no disminuyó en el grupo de extubación fallida. Donde sí se halló diferencia significativa en el cambio de la diversidad  $\beta$  entre el grupo de extubación exitosa y el grupo de extubación fallida para las distancias de Bray-Curtis; el caso se replica en el estudio de Zakharkina, et al. donde la duración de la ventilación mecánica se asoció con una disminución en la diversidad  $\alpha$  (índice de Shannon), pero la administración de terapia con antibióticos no (2).

Respecto de nuestro estudio, se observa la misma tendencia, la diversidad  $\alpha$  disminuye en todos los pacientes del primer a segundo tiempo sin embargo para el tercer punto de tiempo solo continúa esta tendencia en 4 de los 9 pacientes, mientras que los otros 5 se incrementa ligeramente de nuevo, y esta variación no resulto significativa estadísticamente.

Ya que la diversidad de la microbiota se asociado a resultados importantes, resultaría valioso replicar un estudio en el que se apliquen intervenciones o protocolos de enfermería, visto también la gran predominancia de patógenos nosocomiales que se instauran prontamente, como por ejemplo el estudio de María Lou Sole, et al. que exploró la microbiota pulmonar a lo largo del tiempo, en pacientes sometidos a ventilación mecánica prolongada y evaluó el impacto de una intervención de succión oral en la dinámica del microbioma, apreció que en el grupo total, los valores medios de diversidad traqueal de Shannon disminuyeron significativamente con el tiempo, mientras que en el grupo de intervención (pacientes con succión oral), los valores medios de diversidad de Shannon oral y traqueal disminuyeron con el tiempo, aunque no significativamente, es decir mantuvieron su diversidad más que en el grupo control, donde los valores medios de diversidad de Shannon traqueal disminuyeron significativamente con el tiempo, evidenciando que con la intervención de succión oral podría resultar benéfica para estos pacientes, siendo esto importante ya que los gérmenes

patógenos que aquí se desarrollen podrían ser fuente de contaminación del tracto respiratorio inferior (70).

En cuanto a los análisis de sensibilidad y especificidad, de inicio se analizó la del cultivo microbiológico convencional que es lo que se realiza habitualmente en nuestros hospitales, esta información microbiológica resulta siendo muy importante, ya que un tratamiento inicial no adecuado conlleva un aumento en la mortalidad, la cuantificación que se realiza permite marcar puntos de corte en el crecimiento bacteriano que facilitan diferenciar entre la colonización y la infección (71).

En la revisión de Alzate, et al. (72), para el diagnóstico de NAV por BAL, detallan una sensibilidad del 42 al 93% (media del 73%) y la especificidad del 45 al 100% (media del 82%), resultados que variaron según la población estudiada, el uso previo de antibióticos, el estado inicial del paciente, etc., mientras que en otra revisión de Cacho, et al. reconocen que el aspirado traqueal es el método de obtención más sencillo y que su sensibilidad es del 90 al 100% frente a otros métodos, ya que en el crecen todos los organismos encontrados en el BAL o en el cepillado bronquial, pero tiene una especificidad muy baja (14-47%), por lo que no se recomienda para el diagnóstico etiológico. Para nuestro análisis se tomó en cuenta las 27 muestras obtenidas y el diagnóstico de NAV hecho por el profesional médico en las historias clínicas en cada momento, obteniéndose una sensibilidad del 75% y una especificidad del 46.6%, como se puede ver revisiones anteriores efectivamente detallan márgenes amplios de dichos valores; en este caso se podría afirmar que el cultivo convencional fue válido para identificar verdaderos positivos es decir pacientes que efectivamente tenían el diagnóstico de NAV, lo que es óptimo, sin embargo la especificidad fue de menos del 50% lo que implica que aproximadamente en la mitad de pacientes que tengan un cultivo microbiológico negativo no se descartaría la presencia de NAV (3).

Por otra parte, en estudios como el de Ian Toma, et al. que utilizó NGS de ADN ribosomal 16S de aspirados bronquiales de pacientes intubados con sospecha de neumonía y cultivo convencional, se identificó una diversidad significativa de especies bacterianas del mismo género que los patógenos cultivados predominantes. El número de géneros bacterianos identificables por NGS fue consistentemente mayor que el identificado mediante métodos microbiológicos estándar, sin embargo, en el estudio no se detalla datos exactos sobre sensibilidad y especificidad (73).

En otro estudio de Jie Huang, et al. para la detección y tratamiento de infecciones pulmonares periféricas, donde se compara el rendimiento diagnóstico de mNGS y los métodos tradicionales de detección de patógenos, resultó que la mNGS fue más sensible (88,30%) en comparación con la detección de patógenos tradicional (25,73%), Sin embargo, la mNGS fue menos específica (81,16%) que los métodos tradicionales (88,41%) (74); y Zhang J., et. al. 2022 hace una comparación de plataformas para mNGS de Illumina y Nanopore para detectar patógenos en líquido de BAL en pacientes con sospecha de NAC, encontrando que hubo poca diferencia en la tasa de coincidencia de ambas plataformas con el diagnóstico clínico, pero ambos fueron superiores al cultivo (54).

En nuestro caso, se encontró una baja sensibilidad (25%) y una alta especificidad (93.3%) de NGS frente al diagnóstico de NAV, pero en comparación con el cultivo convencional, este resultó más sensible y menos específico, esta baja sensibilidad encontrada puede ser secundaria a la utilización de antibióticos de amplio espectro al usar la abundancia relativa para determinación de estas pruebas diagnósticas, por otro lado al momento de descartar la presencia o no de NAV con una especificidad del 93.3 %, nos ayudaría en confirmar o no la presencia de este diagnóstico, por ende, podría guiar en la continuidad o suspensión de terapia antibiótica.

## CONCLUSIONES

- PRIMERA:** El grupo de estudio se caracterizó, por tener un motivo de ingreso de tipo quirúrgico, una media de edad de 64.4 años, la puntuación promedio de APACHE II fue de 20.2, las muestras procesadas por next generation sequencing fueron un total de 27, correspondientes a 9 pacientes, en diferentes momentos de tiempo, a nivel de Filo las abundancias en su mayoría identificadas fueron: Proteobacterias, Firmicutes y Bacteroidota, a nivel de género las OTUS con más abundancia fueron: *Acinetobacter* (17%), *Prevotella* (15%), *Streptococcus* (12%) y *Enterobacter* (9%).
- SEGUNDA:** Los cambios en la microbiota pulmonar en el transcurso de los días, se caracterizaron por un incremento en la abundancia relativa de *Acinetobacter* y *Enterobacter* (gérmenes nosocomiales), una disminución de *Streptococcus* y un mantenimiento de la abundancia relativa del género *Prevotella*. Resulta importante la marcada abundancia de los gérmenes nosocomiales presentes en un primer punto de tiempo.
- TERCERA:** La validez fue medida a través de los parámetros de sensibilidad y especificidad, encontrándose que la sensibilidad de la next generation sequencing frente al diagnóstico de neumonía asociada a ventilador fue de un 25%, mientras que la especificidad fue del 93.3%; estos valores difirieron en comparación al cultivo microbiológico cuya sensibilidad fue del 75% con una especificidad del 46.6%. La baja sensibilidad no permitiría detectar a la gran mayoría de enfermos, mientras que su alta especificidad sugiere que en los individuos que resultaron con la prueba negativa, efectivamente no tienen la enfermedad, es decir disminuirán los positivos falsos.
- CUARTA:** En conclusión, se observó cambios en la microbiota pulmonar durante los días de ventilación mecánica, mas según el análisis de diversidad beta, estos no resultaron estadísticamente significativos, por lo que no se comprobó la hipótesis. Respecto a la validez, la sensibilidad resultó baja con un 25%, mientras que la especificidad fue del 93.3% lo que fue óptimo, sin embargo, para fines de recomendar su uso con fines de ayuda diagnóstica de forma masiva se requeriría que ambos parámetros sean óptimos, por lo que para estos fines no se recomendaría.

## RECOMENDACIONES

1. A la comunidad científica, se recomienda para futuros estudios y para una mejor caracterización de la microbiota, trabajar con un número de pacientes más amplio, y así observar variaciones a una mayor escala y poder establecer otras correlaciones, así como la presencia de un grupo control. Así mismo tomar muestras de vía aérea superior, inferior y gastrointestinal, permitiría caracterizar mejor la microbiota propia de cada lugar y su origen. Además, se recomienda tomar en cuenta la presencia de gérmenes en los fómites de las unidades, así como realizar estudios comparativos entre pacientes de unidades críticas de diferentes instituciones hospitalarias, para corroborar si la microbiota resulta característica de este grupo de pacientes o dependería principalmente del lugar o condiciones en donde se encuentren.
2. Al Departamento de Emergencia y Cuidados Críticos del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo – EsSalud, se recomienda considerar la implementación de medidas para controlar la transmisión de bacterias patógenas, dado que se encontró una gran cantidad de bacterias intrahospitalarias inicialmente. La principal forma de transmisión de estas bacterias es a través del contacto con fómites y por el personal de salud. Es esencial garantizar la bioseguridad en las técnicas de intubación, el manejo del tubo endotraqueal, la ventilación mecánica y en el contacto directo con los pacientes. Un ejemplo a seguir podría ser la implementación de programas como Neumonía Zero, la descontaminación selectiva del tubo digestivo, la limpieza oral rutinaria con agentes antisépticos u otras medidas adoptadas por unidades de cuidados intensivos a nivel internacional.
3. A los clínicos e investigadores, con interés en el uso de la next generation sequencing para identificación de bacterias patógenas, tomar en cuenta grupos más extensos para avalar los resultados encontrados respecto a la validez clínica, mientras, considerar que, la baja sensibilidad implicaría que no es recomendable para hacer un screening o cribado para captar a todos los enfermos, y su elevada especificidad identificaría a todos los individuos sanos y habría un número no elevado de falsos positivos. Sin embargo, por la complejidad y costo de esta técnica, se tendría que valorar su costo – beneficio y su real utilidad de acuerdo al contexto sanitario o de investigación.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Moreno M, Valladares J, Halabé J. Microbioma humano. Revista de la Facultad de Medicina (México) [Internet]. 2018 [cited 2023 Nov 14];61(6). Available from: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422018000600007&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422018000600007&script=sci_abstract)
2. Woo S, Park SY, Kim Y, Jeon JP, Lee JJ, Hong JY. The Dynamics of Respiratory Microbiota during Mechanical Ventilation in Patients with Pneumonia. J Clin Med [Internet]. 2020 Feb 27 [cited 2024 Mar 9];9(3):638. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/3/638>
3. Cacho J, Meseguer M, Peinado O, Puig J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. 2007. p. 13–4.
4. Rodríguez-Chávez LÁ, Esteban-Dionicio ML, Rodríguez-Mendoza CRE. Perfil microbiológico de las bacterias causantes de neumonía asociada a ventilador mecánico en la unidad de cuidados intensivos de un hospital de alta complejidad. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2023 Mar 24 [cited 2023 Nov 19];115–7. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342023000100115](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342023000100115)
5. Young VB. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. BMJ [Internet]. 2017 Mar 15 [cited 2023 Oct 28];356. Available from: <https://www.bmj.com/content/356/bmj.j831.abstract>
6. Observatorio de Tendencias de Medicina Personalizada de Precisión. Fundación InstitutoRoche. 2018 [cited 2023 Oct 14]. p. 4–4 Informes Anticipando MICROBIOMA. Available from: <https://www.institutoroche.es/observatorio/microbioma>
7. Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. Mucosal Immunol [Internet]. 2017 Mar [cited 2024 Mar 9];10(2):299–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27966551/>
8. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. Annu Rev Physiol [Internet]. 2016 Feb 10 [cited 2023 Dec 9];78(1):481–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527186/>

9. Gleeson K, Maxwell SL, Eggli DF. Quantitative Aspiration During Sleep in Normal Subjects. *Chest* [Internet]. 1997 May [cited 2023 Nov 14];111(5):1266–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9149581/>
10. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan 5 [cited 2023 Nov 19];5(1):e8578. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20052417/>
11. Pattaroni C, Watzenboeck ML, Schneidegger S, Kieser S, Wong NC, Bernasconi E, et al. Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2018 Dec [cited 2024 Mar 7];24(6):857-865.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30503510/>
12. Yu G, Gail MH, Consonni D, Carugno M, Humphrys M, Pesatori AC, et al. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome Biol* [Internet]. 2016 Dec 28 [cited 2024 Mar 7];17(1):163. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-1021-1>
13. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2014 Mar [cited 2024 Apr 9];2(3):238–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4004084/>
14. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 2015 Jun [cited 2024 Apr 9];12(6):821–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4590020/>
15. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio* [Internet]. 2015 May [cited 2024 Mar 9];6(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25736890/>
16. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the Respiratory Microbiome in Healthy Nonsmokers and Smokers. *Am*

- J Respir Crit Care Med [Internet]. 2013 May 15 [cited 2024 Apr 9];187(10):1067–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23491408/>
17. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, et al. Application of a Neutral Community Model To Assess Structuring of the Human Lung Microbiome. *mBio* [Internet]. 2015 Feb 27 [cited 2024 Apr 9];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604788/>
  18. Whiteside SA, McGinniss JE, Collman RG. The lung microbiome: progress and promise. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 Aug 8 [cited 2023 Oct 28];131(15). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8321564/>
  19. Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H, Sinha R, et al. Disordered Microbial Communities in the Upper Respiratory Tract of Cigarette Smokers. *PLoS One* [Internet]. 2010 Dec 20 [cited 2023 Nov 19];5(12):e15216. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21188149/>
  20. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Falkowski NR, Huffnagle GB, et al. Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. *mBio* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Oct 28];8(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312084/>
  21. Sulaiman I, Wu BG, Li Y, Tsay JC, Sauthoff M, Scott AS, et al. Functional lower airways genomic profiling of the microbiome to capture active microbial metabolism. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2021 Jul [cited 2023 Nov 19];58(1):2003434. Available from: Functional lower airways genomic profiling of the microbiome to capture active microbial metabolism
  22. Ren L, Zhang R, Rao J, Xiao Y, Zhang Z, Yang B, et al. Transcriptionally Active Lung Microbiome and Its Association with Bacterial Biomass and Host Inflammatory Status. *mSystems* [Internet]. 2018 Oct 30 [cited 2023 Oct 28];3(5):199–217. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6208642/>
  23. Microbiota pulmonar y el eje intestino-pulmón [Internet]. [cited 2023 Oct 28]. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312021000400012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312021000400012)
  24. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beaufils F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom

- Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 Feb 19 [cited 2024 Mar 9];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32140452/>
25. Soret P, Vandenberghe LE, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Feb 27 [cited 2024 Mar 14];10(1):3589. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/339593762\\_Respiratory\\_mycobiome\\_and\\_suggestion\\_of\\_inter-kingdom\\_network\\_during\\_acute\\_pulmonary\\_exacerbation\\_in\\_cystic\\_fibrosis](https://www.researchgate.net/publication/339593762_Respiratory_mycobiome_and_suggestion_of_inter-kingdom_network_during_acute_pulmonary_exacerbation_in_cystic_fibrosis)
26. Yagi K, Huffnagle GB, Lukacs NW, Asai N. The Lung Microbiome during Health and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 8 [cited 2023 Nov 14];22(19):10872. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34639212/>
27. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Nov 19];63(5):e61–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34639212/>
28. De Steenhuijsen P, Pitsers WAA, Huijskens EGW, Wyllie AL, Biesbroek G, Van Den Bergh MR, Veenhoven RH, et al. Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *ISME J* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Oct 28];10(1):97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681870/>
29. Kitsios GD, Morowitz MJ, Dickson RP, Huffnagle GB, McVerry BJ, Morris A. Dysbiosis in the intensive care unit: Microbiome science coming to the bedside. *J Crit Care* [Internet]. 2017 Apr [cited 2024 Mar 14];38:84–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866110/>
30. Dickson RP. The microbiome and critical illness. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2016 Jan [cited 2024 Apr 11];4(1):59–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26700442/>
31. Zakharkina T, Martin-Loeches I, Matamoros S, Povoas P, Torres A, Kastelijn JB, et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the

- intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. *Thorax* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Oct 25];72(9):803–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28100714/>
32. Huebinger Id RM, Smith AD, Zhang Y, Monson NL, Ireland SJ, Barber RC, et al. Variations of the lung microbiome and immune response in mechanically ventilated surgical patients. 2018 [cited 2023 Oct 26]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205788>
33. Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RHH, Bergmans DCJJ, Camus C, Bauer TT, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: A meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Oct 25];13(8):665–71. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70081-1/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70081-1/abstract)
34. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2012 Dec 27 [cited 2024 Oct 14];8(12):e1002808. Available from: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1002808>
35. Washington HG. Diversity, biotic and similarity indices. *Water Res* [Internet]. 1984 [cited 2023 Oct 7];18(6):653–94. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0043135484901647>
36. Hurlbert SH. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. *Ecology* [Internet]. 1971 Jul [cited 2023 Nov 9];52(4):577–86. Available from: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2307/1934145>
37. Chao A, Yang MCK. Stopping Rules and Estimation for Recapture Debugging with Unequal Failure Rates. *Biometrika*. 1993 Mar;80(1):193.
38. Koleff P, KG et al. Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology* [Internet]. 2003 [cited 2023 Nov 14]; Available from: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x>
39. Cameron SJS, Lewis KE, Huws SA, Hegarty MJ, Lewis PD, Pachebat JA, et al. A pilot study using metagenomic sequencing of the sputum microbiome suggests potential bacterial biomarkers for lung cancer. *PLoS One* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2023 Oct 24];12(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5444587/>

40. Yatera K, Noguchi S, Mukae H. The microbiome in the lower respiratory tract. *Respir Investig* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Oct 24];56(6):432–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30392534/>
41. Green ED, Guyer MS. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* [Internet]. 2011 Feb 9 [cited 2024 Mar 14];470(7333):204–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21307933/>
42. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* [Internet]. 2011 Feb 9 [cited 2024 Apr 11];470(7333):187–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21307931/>
43. Thomas AM, Segata N. Multiple levels of the unknown in microbiome research. *BMC Biol* [Internet]. 2019 Jun 12 [cited 2023 Nov 6];17(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6560723/>
44. Lu J, Carmody LA, Opron K, Simon RH, Kalikin LM, Caverly LJ, et al. Parallel Analysis of Cystic Fibrosis Sputum and Saliva Reveals Overlapping Communities and an Opportunity for Sample Decontamination. *mSystems* [Internet]. 2020 Aug 25 [cited 2023 Oct 28];5(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7343308/>
45. Brendan Kelly BJ, Imai I, Bittinger K, Laughlin A, Fuchs BD, Bushman FD, et al. Composition and dynamics of the respiratory tract microbiome in intubated patients. *Microbiome* [Internet]. 2016 [cited 2023 Oct 28];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750361/>
46. Panzer AR, Lynch S V., Langelier C, Christie JD, McCauley K, Nelson M, et al. Lung Microbiota Is Related to Smoking Status and to Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Trauma Patients. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2018 Mar 3 [cited 2023 Oct 28];197(5):621. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6005235/>
47. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* [Internet]. 2014 Nov 12 [cited 2023 Oct 28];12(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228153/>

48. Erb-Downward JR, Falkowski NR, D'souza JC, McCloskey LM, McDonald RA, Brown CA, et al. Critical Relevance of Stochastic Effects on Low-Bacterial-Biomass 16S rRNA Gene Analysis. *mBio* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Oct 28];11(3):1–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7373192/>
49. Segal LN, Alekseyenko A V., Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Chen H, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2023 Oct 28];1(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24450871/>
50. Torres A, Barberán J, Ceccato A, Martin-Loeches I, Ferrer M, Menéndez R, et al. Neumonía intrahospitalaria. Normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Actualización 2020. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Oct 24];56:11–9. Available from: <http://www.archbronconeumol.org/es-neumonia-intrahospitalaria-normativa-sociedad-espanola-articulo-S0300289620300417?referer=buscador>
51. Recomendaciones para el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica | *Medicina Intensiva* [Internet]. [cited 2023 Nov 6]. Available from: <https://medintensiva.org/es-recomendaciones-el-diagnostico-neumonia-asociada-articulo-13022458>
52. Gómez González C, Pérez Castán JF. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. *SEMERGEN - Medicina de Familia* [Internet]. 2007 Dec [cited 2024 Mar 7];33(10):509–19. Available from: <https://www.sergas.es/Saude-publica/Documents/1932/6-Ayuda%20Pruebas%20diagnosticas.pdf>
53. Luna Paredes, Fernando L. Identification of the microbiome present in sputum samples from patients with clinical tuberculosis by NGS (Next generation sequencing). [Internet]. [Arequipa]: Universidad Nacional de San Agustín; 2022 [cited 2023 Nov 10]. Available from: <https://repositorio.unsa.edu.pe/items/84da6e64-e102-4f04-8372-1863bb6043aa>
54. Zhang J, Gao L, Zhu C, Jin J, Song C, Dong H, et al. Clinical value of metagenomic next-generation sequencing by Illumina and Nanopore for the detection of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid in suspected community-acquired pneumonia patients.

- Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2022 Sep 27 [cited 2023 Nov 10];12:1021320. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9551279/>
55. Lamarche D, Johnstone J, Zytaruk N, Clarke F, Hand L, Loukov D, et al. Microbial dysbiosis and mortality during mechanical ventilation: a prospective observational study. *Respir Res* [Internet]. 2018 Dec 7 [cited 2024 Nov 23];19(1):245. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30526610/>
56. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* [Internet]. 2010 May 11 [cited 2024 Feb 9];7(5):335–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383131/>
57. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* [Internet]. 2013 Oct 18 [cited 2024 Feb 9];10(10):996–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700674/>
58. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2023 Nov 14];27(21):2957–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903629/>
59. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2024 Feb 9];10(1):57–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202435/>
60. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* [Internet]. 2011 Aug 15 [cited 2024 Feb 9];27(16):2194–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700674/>
61. Ferry B. Pruebas diagnósticas [Internet]. 2020 [cited 2024 May 26]. Available from: <https://es.slideshare.net/rzferry/6ayuda-pruebas-diagnosticaspdf>
62. Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, van Asch B, Pinto N, Gusmão L, et al. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2024 Feb 9];38(22):e203–e203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001097/>

63. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 12 [cited 2024 Mar 9];489(7415):220–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577372/>
64. Dickson RP, Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog* [Internet]. 2015 Jul 9 [cited 2024 Mar 9];11(7):e1004923. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497592/>
65. Baek M Gyung, Woo SJ, Kim NE, Baek C, Won S, Kim Y, et al. Respiratory microbiome profiles differ by recent hospitalization and nursing home residence in patients on mechanical ventilation. *J Transl Med* [Internet]. 2020 Dec 7 [cited 2023 Oct 27];18(1):464. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02642-z>
66. Lee SH, Sung JY, Yong D, Chun J, Kim SY, Song JH, et al. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer* [Internet]. 2016 Dec [cited 2024 Mar 10];102:89–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987594/>
67. Dicker AJ, Huang JTJ, Lonergan M, Keir HR, Fong CJ, Tan B, et al. The sputum microbiome, airway inflammation, and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2021 Jan [cited 2024 Mar 9];147(1):158–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32353489/>
68. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Standiford TJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol* [Internet]. 2016 Jul 18 [cited 2024 Mar 10];1(10):16113. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27670109/>
69. Dickson RP, Schultz MJ, van der Poll T, Schouten LR, Falkowski NR, Luth JE, et al. Lung Microbiota Predict Clinical Outcomes in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Mar 9];201(5):555–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31973575/>
70. Sole M Lou, Yooseph S, Talbert S, Abomoelak B, Deb C, Rathbun KP, et al. Pulmonary Microbiome of Patients Receiving Mechanical Ventilation: Changes Over

- Time. American Journal of Critical Care [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 11];30(2):128–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8344366/>
71. Antonia Meseguer M, Begoña Cacho J, Oliver A, de la Bellacasa JP. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2008 Sep [cited 2023 Nov 14];26(7):430–6. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-diagnostico-microbiologico-infecciones-bacterianas-del-S0213005X08727654>
72. Alzate-Rincón CM, Loaiza-Díaz N, Aguilar Y. Diagnóstico microbiológico en lavado broncoalveolar. Revisión de la literatura. *Medicina y Laboratorio* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Nov 14];25(4):675–93. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia25.pdf>
73. Toma I, Siegel MO, Keiser J, Yakovleva A, Kim A, Davenport L, et al. Single-Molecule Long-Read 16S Sequencing To Characterize the Lung Microbiome from Mechanically Ventilated Patients with Suspected Pneumonia. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2023 Nov 14];52(11):3913–21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313225/>
74. Huang J, Jiang E, Yang D, Wei J, Zhao M, Feng J, et al. <p>Metagenomic Next-Generation Sequencing versus Traditional Pathogen Detection in the Diagnosis of Peripheral Pulmonary Infectious Lesions</p>. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2020 Feb [cited 2023 Nov 14];Volume 13:567–76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7036976/>



**ANEXOS**

**ANEXO 1**

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**Dinámica de la microbiota pulmonar y la validez de la next generation sequencing en la detección de patógenos en pacientes con ventilación mecánica**

***Código de paciente asignado:***

A.- Edad: .....

B.- Sexo: .....

C.- Fecha de ingreso a la Unidad: .....

D.- Motivo principal de Ingreso a la unidad :

- Médico :  
.....

- Quirúrgico :  
.....

E.- Comorbilidades :  
.....

F.- APACHE II score: .....

H.- Fecha de Recolección de Muestra :  
.....

I.- Fecha de egreso de paciente: .....

J.- Días de Ventilación Mecánica: .....

K.- Días de Estancia en UCIE: .....

**L. Diagnóstico de neumonía asociada a ventilador**

Segundo punto de tiempo: .....

Tercer punto de tiempo.....

**M. Análisis molecular de la muestra**

OTUS identificadas en el 1° punto de tiempo:

.....  
.....  
.....  
.....

OTUS identificadas en el 2° punto de tiempo:

.....  
.....  
.....  
.....

OTUS identificadas en el 3° punto de tiempo

.....  
.....  
.....  
.....

**N. Análisis microbiológico**

Resultado de cultivo convencional Patología Clínica:

Microorganismo aislado 1er punto de tiempo: .....

Microorganismo aislado 2° punto de tiempo.....

Microorganismo aislado 3° punto de tiempo:.....

**ANEXO 2**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**FECHA:** \_\_\_\_\_

**DATOS DE LA INVESTIGACIÓN:**

**INSTITUCIÓN DE INVESTIGACIÓN:** Escuela de Post grado - Universidad Católica Santa Maria

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Mg. Katherine Milagros Quispe Medina

**ASESOR** PhD. Julio Cesar Bernabe Ortiz

**TUTOR RESPONSABLE:** Dr. Angel Sixto Mamani Ruelas - Servicio De Emergencia

**TUTOR RESPONSABLE:** Dr. Hugo Calisaya Luque - Servicio De Anestesiología

**COMITÉ DE ÉTICA:** Comité de ética en investigación de la Red Asistencial Arequipa – ESSALUD

Estimado(a) Señor(a) Asegurado(a)

Actualmente está bajo el cuidado y tratamiento médico en el Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo que forma parte de la Red Asistencial de Arequipa EsSalud. El cual se desempeña en favor de la protección de su salud y también estar a la vanguardia de la innovación por medio de investigaciones médicas. La presente, se llevará a cabo para conocer más sobre cómo actúa del microbioma pulmonar en los pacientes con ventilación mecánica y su relación con el curso de la enfermedad.

Le pedimos participar en el presente estudio debido a que usted/ su familiar se encuentra formando parte de la población de interés, ya que posee la indicación médica de intubación endotraqueal (un procedimiento por el que se inserta una sonda en la tráquea a través de la boca para ayudarlo a respirar) y cumple con los criterios de inclusión en el estudio, así como para la obtención de secreción bronquial con fines de cuidado, diagnóstico y tratamiento.

Su consentimiento es completamente gratuito y voluntario. Usted está en la libertad de considerar su decisión de participar en el presente estudio o de pedir que la secreción bronquial no sea utilizada para el mismo. La extracción de secreción bronquial lo realizará

de forma habitual como parte del cuidado en los pacientes de la UCIE de emergencia el personal de enfermería, y recolectado por el tutor responsable Dr. Angel Sixto Mamani Ruelas con CMP: 64206 RNE: 32498 - Medico asistente del servicio. Por lo tanto, usted decide si parte de esa muestra de secreción bronquial que ha sido extraída, pueda ser utilizado en el presente estudio (este estudio requiere 5 ml. de secreción bronquial). De lo contrario usted puede indicar que la secreción bronquial extraída no sea utilizada en el presente estudio. En cualquier caso, esta investigación respetará el anonimato. El historial médico será de carácter confidencial. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras del estudio sin que ello implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al investigador principal del estudio: Mg. Katherine Milagros Quispe Medina al correo electrónico [katherine.milagrosquispe23@gmail.com](mailto:katherine.milagrosquispe23@gmail.com), o al asesor de dicha investigación: PhD. Julio Cesar Bernabé Ortiz al correo electrónico: [jcbernabe@hotmail.com](mailto:jcbernabe@hotmail.com).

El objetivo de este documento es proporcionar información que le permita comprender el propósito de este estudio y el interés que pueda representar para usted o su familiar, por lo cual no dude en solicitar mayor información sobre palabras o expresiones que no comprenda antes de firmar este documento. Puede llevar una copia del consentimiento para revisarlo antes de firmar e incluso consultar con el resto de sus familiares, personas de confianza o su médico tratante si así lo desea.

Esta investigación se llevará a cabo con el objetivo de conocer más sobre la diversidad de microorganismos existente en el microbioma pulmonar (ya que dicho microbioma tiende a cambiar durante la intubación endotraqueal y, además, orienta el diagnóstico y la terapéutica antibiótica brindada a los pacientes en ventilación mecánica). A la actualidad, aun se conoce muy poco acerca de la real diversidad microbiana detectada por técnicas moleculares, lo que hace que en algunos casos no se logre identificar con certeza cuales son los reales gérmenes que se encuentran en el tracto respiratorio y que pudiese estar causando una complicación en la salud, y al no ser detectada no pueda ser tratada oportunamente. Éste estudio tiene la finalidad de poder conocer más acerca del microbioma pulmonar en esta población específica por ser un grupo de pacientes críticamente enfermos con alta tasas de complicaciones y de difícil manejo.

Esta investigación se llevará a cabo como parte de la formación en el programa de Doctorado en Ciencias de la Salud de la Escuela de Post Grado de la Universidad Católica de Santa María - Arequipa. Participarán en la presente investigación, todos los pacientes con

indicación médica de intubación endotraqueal y a los que se les tenga que realizar aspiración de secreciones como parte de los procedimientos de rutina que se le realiza a dichos pacientes en la UCIE del Servicio de emergencia en el Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo (HNCASE). Se tomará tres muestras durante la estancia del paciente en la UCIE. Cabe resaltar que los riesgos del procedimiento de aspiración de secreciones son: hipoxia, broncoespasmo, arritmias, reflejo vasovagal, los cuales son los más frecuentemente reportados, sin embargo, este procedimiento es llevado a cabo como parte de su atención habitual.

La extracción de secreción bronquial se realizará por medio de la aspiración de secreciones, de acuerdo a los protocolos que se manejan a nivel hospitalario, las muestras extraídas serán llevadas para su análisis correspondiente al Servicio de Patología Clínica del HNCASE y 5 ml de dicha muestra serán destinados para la investigación. Todos los procedimientos de manejo de muestras de secreción bronquial, desde su extracción hasta que sea otorgado al investigador responsable, serán realizados de acuerdo al protocolo de manejo de muestras del HNCASE.

Los beneficios quedan enmarcados en que los resultados de la presente serán dados a conocer al HNCASE, mediante un informe detallado sobre los principales hallazgos según los objetivos mencionados en el proyecto y así sembrar una base para mediante este tipo de estudios lograr una mejor respuesta al tratamiento antibiótico evitando la resistencia a estos debido a su uso empírico.

Finalmente, las muestras se procesarán en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Escuela de Post Grado de la Universidad Católica de Santa María (Laboratorio F - 403). Así mismo, la muestra de secreción bronquial que se facilite al presente estudio solo será utilizada para esta investigación, cabe mencionar que no se realizará algún método adicional a lo mencionado en el presente documento.

Además, al finalizar la investigación, se publicarán los resultados obtenidos en revistas científicas, para el caso de estas publicaciones de alcance global no se incluirá información que conlleve a la identificación de los participantes.

También usted tendrá la oportunidad de estar informado de los resultados generales de la presente investigación para la cual fue utilizada la muestra de secreción bronquial a través de los investigadores anteriormente mencionados. Ya que los resultados de la presente

investigación serán dados a conocer a la institución de salud de origen, mediante un informe detallado sobre los principales hallazgos.

Si usted considere que sus derechos son vulnerados o ante cualquier denuncia, usted puede contactarse con el Comité de Ética del HNCASE, a través del siguiente teléfono: (054) 380370, anexo; 80953. Si está de acuerdo con todo lo antes mencionado en el documento y desea participar en el estudio, le pedimos que de su consentimiento en el siguiente cuadro:

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR**

Yo, ..... (nombre completo):.....identificad a(o) con DNI, carnet de extranjería:..... en mi calidad de paciente (madre, padre, representante legal del (de la) la paciente).....

Doy mi consentimiento para que mi persona / mi familiar pueda participar en el presente estudio para el uso de 5 ml de muestra de secreción bronquial obtenida de la aspiración de secreciones de rutina con fines de cuidado, diagnóstico y/o de tratamiento, así como con fines de investigación, en las condiciones previstas en este formulario.

No me opongo a que los resultados de la presente investigación sean publicados en revistas científicas, puesto que la información es de carácter anónimo.

-----  
Firma del familiar del paciente

**ANEXO 3**

**CUADRO DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE NEUMONIA ASOCIADA A VENTILADOS SEGÚN PUNTOS DE TIEMPO Y RESULTADOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y NEXT GENERATION SEQUENCING**

PACIENTE	MUESTRA	DX NAV	RESULTADO DE			
			CULTIVO MICROBIOLÓGICO	RESULTADO DE NGS		
PACIENTE B	I	NO	A. baumannii	A. baumannii 75%	N.A 8.50%	N.A 3.3%
	II	SI	A. baumannii	A.baumannii 83%	N.A 7.40%	N.A 2.1%
	III	SI	A. baumannii	A. baumannii 56%	B. melintesis 18.90%	N.A 10.60%
PACIENTE J	I	NO	Negativo	P. melaninogenica 23%	N.A 21%	P. jejuni 15%
	II	NO	Negativo	P. melaninogenica 26%	N.A 19%	A. baumannii 16%
	III	SI	A. baumannii	N.A 16%	P. melaninogenica 19%	S. aureus 3%
PACIENTE M	I	NO	K. pneumoniae	N.A 44%	S. aureus 18%	A. baumannii 7%
	II	SI	K. pneumoniae	N.A 58%	N.A 8.9%	P. melaninogenica 6.8%
	III	SI	A. baumannii / K.pneumoniae	N.A 57%	P. melaninogenica 3%	A. baumannii 8.5%
PACIENTE D	I	NO	E. cloacae	N.A 72%	S. aureus 11%	N.A 6%
	II	SI	K. pneumoniae / E. cloacae	N.A 47%	S. aureus 38%	A. baumannii 1,8%
	III	SI	Negativo	N.A 61%	A. baumannii 24%	S. aureus 3.5%
PACIENTE G	I	NO	Negativo	N.A 35%	S. salivarius 16%	N.A 15%
	II	NO	Negativo	N.A 37%	N.A 14%	S. salivarius 12%
	III	NO	Negativo	N.A 50%	C. acnes 12%	N.A 12%
PACIENTE H	I	NO	Negativo	N.A 39%	N.A 16%	E. rectale 16%
	II	NO	Candida albicans	R. mucilaginoso 31%	N.A 33%	S. salivarius 13%
	III	SI	A. baumannii	R. mucilaginoso 23%	N.A 33%	A. baumannii 11%
PACIENTE I	I	NO	K. pneumoniae	P. melaninogenica N.A 53%	9.6%	S. aureus 5.4%

				P.	
	<b>II</b>	NO	S. aureus	N.A 29.2%	P. melaninogenica 12% S. aureus 1.4%
	<b>III</b>	SI	K. pneumoniae	P. jejuni 22%	N.A 18% S. aureus 6.3%
<b>PACIENTE K</b>	<b>I</b>	NO	Negativo	P. melaninogenica 23%	N.A 34% P. jejuni 15%
	<b>II</b>	SI	Negativo	P. melaninogenica 26%	N.A 21.7% A. baumannii 16%
	<b>III</b>	SI	A. baumannii	N.A 33%	P. melaninogenica 19% S. agalactiae 8%
	<b>I</b>	NO	S. aureus/A.baumannii	P. melaninogenica 22%	N.A 30% A. baumannii 2.2%/ S. aureus 3.4%
<b>PACIENTE L</b>	<b>II</b>	NO	A. baumannii	N.A 51%	P. melaninogenica 10% A. baumannii 3% /S. aureus 4%
	<b>III</b>	SI	Negativo	A. baumannii 58%	N.A 24 % N.A 4%

# ANEXO 4

## REPORTE DE NEXT GENERATION SEQUENCING

### Análisis de datos de Microbioma

Steven Criollo

6/6/2022

#### Contents

<b>Tiempo de exposición: Tiempo 1 (T1), Tiempo 2 (T2), Tiempo 3 (T3)</b>	<b>1</b>
1. Procesamiento y Normalización de Datos	1
1.1 Comprobación de integridad de datos	1
1.2 Filtrado de datos	3
1.3 Normalización de datos	3
2. Análisis de genes marcadores	3
2.1 Exploración visual	4
2.2 Análisis de curvas de rarefacción	4
2.3 Análisis de diversidad alfa	7
2.4 Análisis de diversidad beta	9
2.5 Agrupación jerárquica	9
2.6 Análisis del microbioma central	9
3. Pruebas estadísticas de significancia	13
3.1 Diversidad alfa	13
3.2 Diversidad beta	14
Referencias	14

#### Tiempo de exposición: Tiempo 1 (T1), Tiempo 2 (T2), Tiempo 3 (T3)

##### 1. Procesamiento y Normalización de Datos

###### 1.1 Comprobación de integridad de datos

Antes del análisis de datos, se realiza una verificación de integridad de datos para asegurarse de que se haya recopilado toda la información necesaria. La variable de muestra debe contener al menos dos grupos para realizar la mayor parte del análisis comparativo. De forma predeterminada, las variables de muestra que se consideren constantes y de naturaleza continua se eliminarán del análisis posterior. Además, las características que solo están presentes en una muestra también se descartarán de los datos. La figura 1 muestra el tamaño de la biblioteca para la inspección de cada muestra.

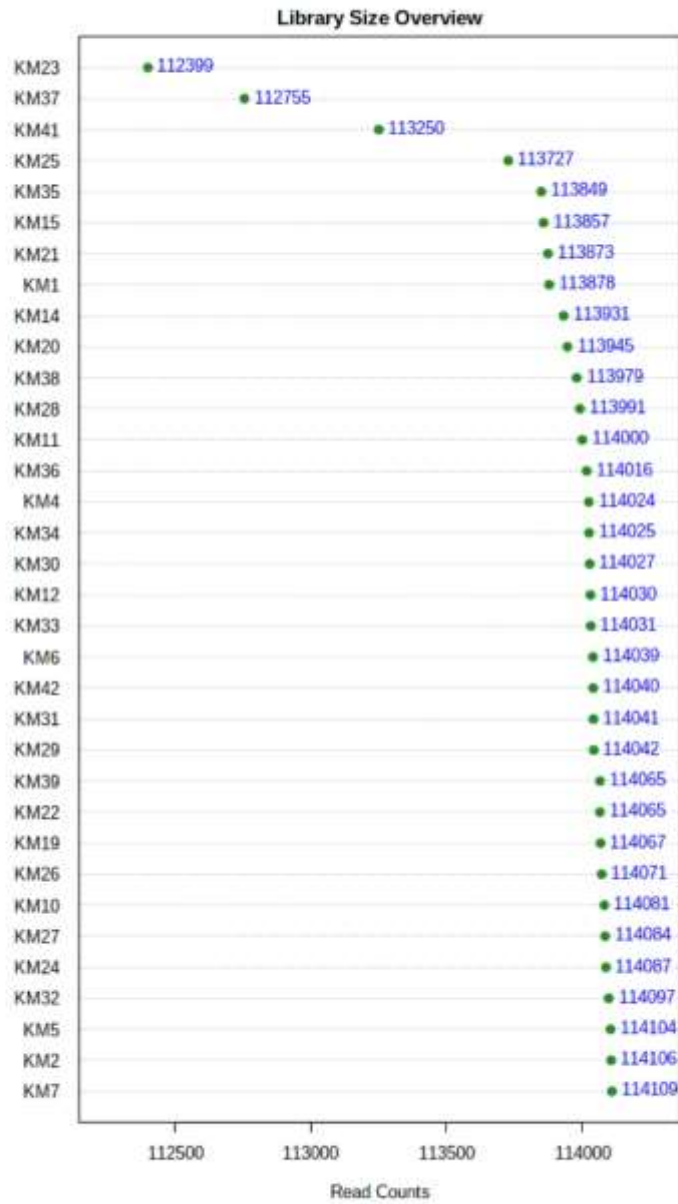


Figure 1: **Figura 1:** Descripción general del tamaño de la biblioteca.

## 1.2 Filtrado de datos

El propósito del filtrado de datos es identificar y eliminar características que es poco probable que se utilicen al modelar los datos. No se utiliza información de fenotipo en el proceso de filtrado, por lo que el resultado se puede utilizar con cualquier análisis posterior. Este paso generalmente puede mejorar los resultados. Las características que tienen un recuento y una variación bajos se pueden eliminar durante el paso de filtración. Las características que tienen muy pocos recuentos se filtran en función de sus niveles de abundancia (recuentos mínimos) en las muestras (prevalencia). Además de la prevalencia de la muestra, estas características también se pueden detectar mediante el corte de recuento mínimo en función de sus valores medios y medianos. Las características o taxones con abundancias constantes o menos variables son invaluable para el análisis comparativo. Estas características se filtran en función de sus rangos entre cuantiles, desviaciones estándar o coeficiente de variación. De forma predeterminada, las características que tengan cero recuentos en todas las muestras o que solo aparezcan en una muestra se eliminarán de los análisis posteriores.

Se eliminaron un total de 2568 características de baja abundancia en función de la prevalencia. Se eliminaron un total de 68 características de baja varianza en función de iqr. El número de características permanece después del paso de filtrado de datos: 605

## 1.3 Normalización de datos

Los datos se almacenan como una tabla con una muestra por columna y una variable (taxones u OTU) por fila. Los procedimientos de normalización implementados a continuación se agrupan en tres categorías. Los métodos basados en rarefacción y escalado de datos se ocupan de las profundidades de secuenciación desiguales al llevar las muestras a la misma escala para compararlas. Mientras que los métodos basados en transformación dan cuenta de la escasez, la composicionalidad y las grandes variaciones dentro de los datos. La normalización consta de las siguientes opciones:

1. Enrarecimiento de datos (con o sin reemplazo)
2. Escalado de datos:
  - Escalado de suma total (TSS)
  - Escalado de suma acumulativa (CSS)
  - Normalización del cuantil superior (UQ)
3. Transformación de datos:
  - Expresión logarítmica relativa (RLE)
  - Mediana recortada de valores M (TMM)
  - Relación logarítmica centrada (CLR)

Acciones realizadas: \* Rarefacción de datos realizada, \* Normalización de suma total realizada, \* No se realizó ninguna transformación de datos.

## 2. Análisis de genes marcadores

Se realizó el análisis de datos mediante una variedad de métodos comúnmente utilizados en el análisis de datos de microbiomas. Incluyen:

1. Exploración visual:
  - Diagrama de barras/áreas apiladas

- Curva de rarefacción

## 2. Perfil de la comunidad:

- Análisis de diversidad alfa
- Análisis de diversidad beta
- Análisis del microbioma central

## 3. Análisis de agrupamiento:

- Mapa de calor
- Dendograma

### 2.1 Exploración visual

Estos métodos se utilizan para visualizar la composición taxonómica de la comunidad a través de la comparación cuantitativa directa de las abundancias. Puede ver esta composición en varios niveles taxonómicos (filo, clase, orden) utilizando gráficos de barras apiladas/áreas apiladas o gráficos circulares.

Ver la composición en los niveles más altos (phylum) proporciona una mejor imagen que los niveles más bajos (especies) cuando el número de especies en una comunidad es grande y diversificado. Además, dicha abundancia o composición taxonómica se puede ver a nivel de comunidad (todas las muestras), a nivel de grupo de muestra (basado en el factor experimental) o a nivel de muestra individual.

Los taxones con recuentos de lectura muy bajos también se pueden juntar en la categoría Otros utilizando un límite de recuento basado en la suma o la mediana de sus recuentos en todas las muestras o todos los grupos. La fusión de estos taxones menores ayudará a visualizar mejor los patrones taxonómicos significativos en los datos.

La Figura 2 muestra la composición taxonómica utilizando un diagrama de barras/áreas apiladas. La Figura 3 muestra la composición taxonómica utilizando un gráfico circular.

Directorio de resultados: Composición taxonómica de la comunidad utilizando un diagrama de barras a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie en: [/TIEMPO DE EXPOSICIÓN/OTU\\_Analysis/Taxa\\_Abundance](#)

Directorio de resultados: Composición taxonómica de la comunidad usando un gráfico circular del filo más representativo y sus subniveles: clase, orden, familia, género y especie en: [/TIEMPO DE EXPOSICIÓN/OTU\\_Analysis/Piechart\\_abundances](#)

### 2.2 Análisis de curvas de rarefacción

Este método se usa para presentar la relación entre el número de OTU y el número de secuencias. Por lo general, cuanto más profundice en la secuencia o muestree sus datos, más especies observará, hasta el punto en que haya observado todas las especies en su muestra. Los investigadores usan esta observación para darse una idea de si han secuenciado o no sus muestras con suficiente profundidad. Los investigadores enrarecen (submuestrear) sus datos de secuencia o lecturas de una muestra a múltiples profundidades diferentes, calculan la diversidad alfa y trazan cómo cambia la diversidad alfa con el aumento del número de lecturas. Usando este enfoque, debería ver que la diversidad se estabiliza eventualmente. La figura 4 muestra la curva de rarefacción.

Directorio de resultados: [/TIEMPO DE EXPOSICIÓN/Alpha\\_Diversity/Rarefaction\\_Curve\\_Analysis](#)



Figure 2: **Figura 2:** Composición taxonómica de la comunidad a nivel de Phylum utilizando un diagrama de barras apiladas

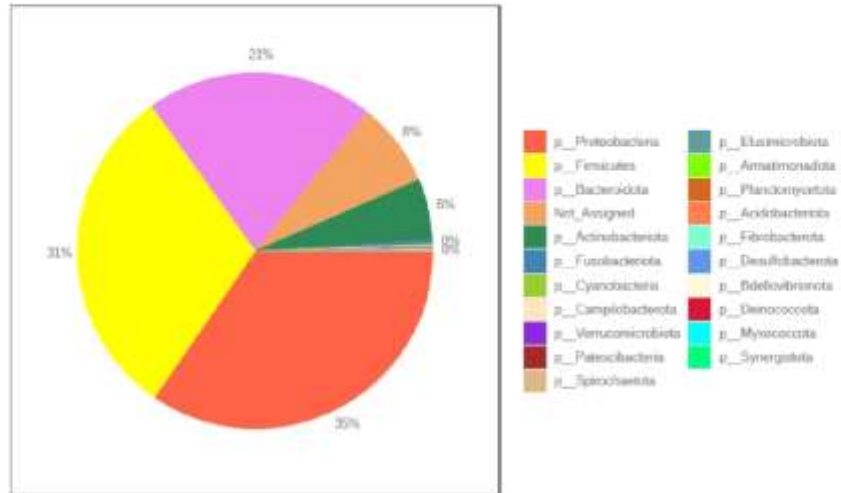


Figure 3: **Figura 3:** Composición taxonómica de la comunidad a nivel de Phylum usando un gráfico circular

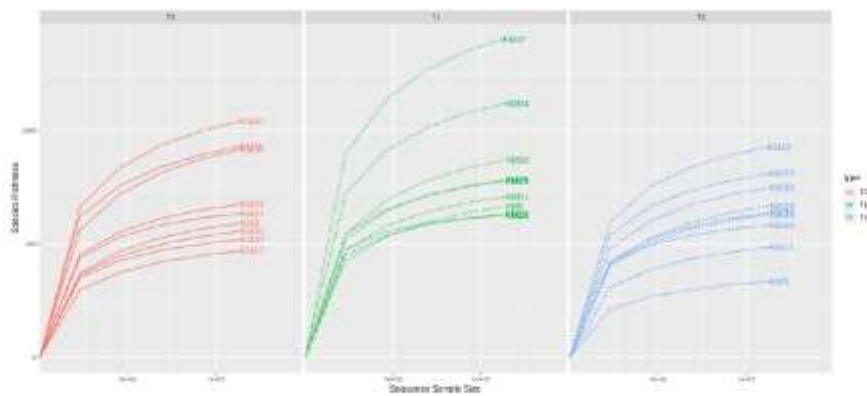


Figure 4: **Figura 4:** Curva de rarefacción utilizando el conjunto de datos original

### 2.3 Análisis de diversidad alfa

Este método se utiliza para medir la diversidad presente dentro de una muestra o comunidad. La diversidad alfa se puede caracterizar a través del número total de especies (riqueza), la abundancia de las especies (uniformidad) o medidas que consideraron tanto la riqueza como la uniformidad. Es necesario considerar cómo estas medidas estiman la diversidad al realizar un análisis de diversidad alfa.

El usuario puede elegir entre medidas basadas en la riqueza, como el índice observado, que calcula el número real de taxones únicos observados en cada muestra. Mientras que las medidas Chao1 y ACE estiman la riqueza infiriendo la cantidad de organismos raros que pueden haberse perdido debido a la falta de muestreo. Además, existen índices como el de Shannon y Simpson en los que junto con el número (riqueza), también se mide la abundancia de organismos (uniformidad) para describir la diversidad real de una comunidad.

Los resultados del análisis de diversidad alfa se grafican a través de las muestras y se revisan como diagramas de caja para cada grupo o factor experimental. Además, la significación estadística de la agrupación basada en el factor experimental también se estima utilizando una prueba paramétrica o no paramétrica. La Figura 5 muestra la medida de diversidad alfa en todas las muestras para un índice de diversidad dado. La Figura 6 muestra la distribución de la diversidad utilizando un diagrama de caja para un grupo o factor experimental determinado.

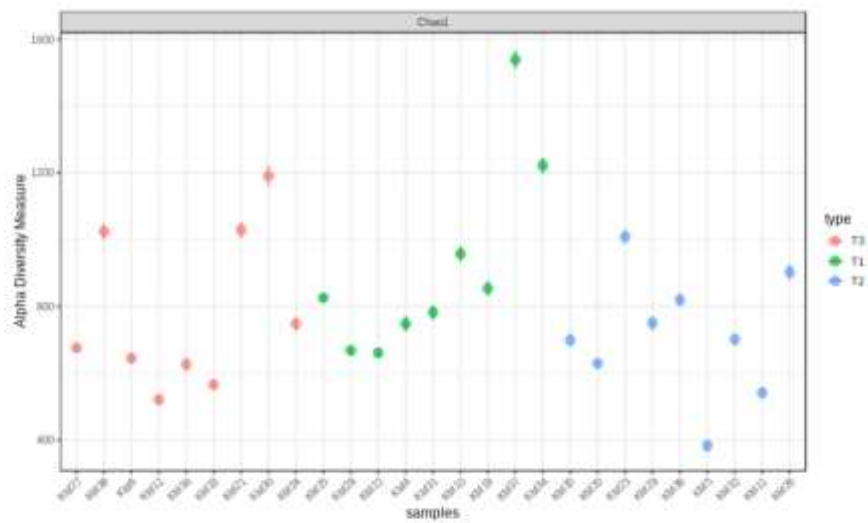


Figure 5: **Figura 5:** Medida de diversidad alfa utilizando Chao1 a nivel de OTU en todas las muestras. Las muestras se representan en el eje X y su diversidad estimada en el eje Y. Cada muestra está coloreada según el tipo de clase.

Directorio de resultados: Medidas de diversidad alfa utilizando Observed Taxa, Chao1, ACE, Shannon y Simpson a nivel de OTU en todas las muestras en: /TIEMPO DE EXPOSICIÓN/Alpha\_Diversity/Alpha\_Diversity\_Profilin

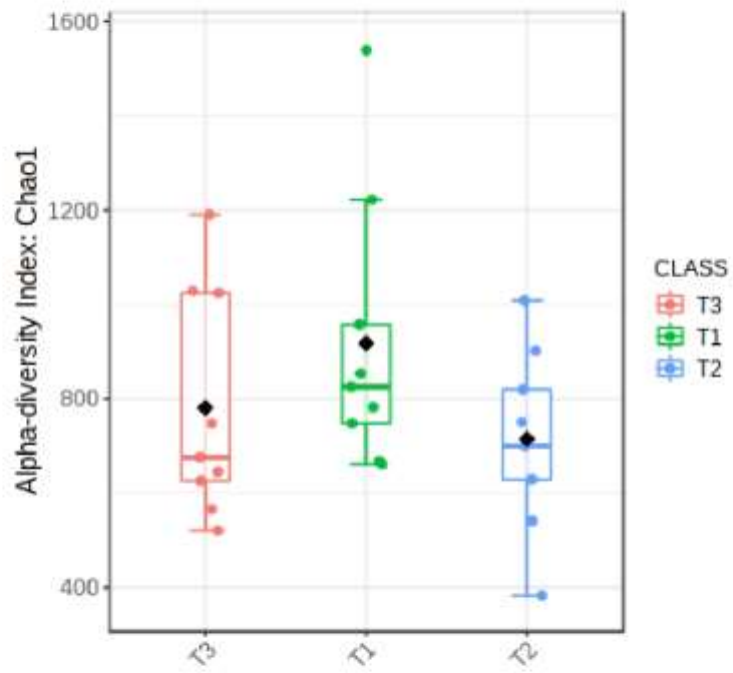


Figure 6: **Figura 6:** Medida de diversidad alfa utilizando Chao1 en el nivel de OTU representado como diagrama de caja. Cada diagrama de caja representa la distribución de la diversidad de un grupo presente dentro del tipo de clase

## 2.4 Análisis de diversidad beta

Este método proporciona una manera de comparar la diversidad o composición entre dos muestras o comunidades microbianas. Estos métodos comparan los cambios en la presencia/ausencia o abundancia de miles de taxones presentes en un conjunto de datos y los resumen en qué tan 'similares' o 'diferentes' son dos muestras. Cada muestra se compara con todas las demás muestras generando una matriz de distancia o disimilitud.

Se deben considerar dos parámetros al realizar un análisis de diversidad beta. El primero es cómo se mide la similitud o la distancia entre muestras, que incluye distancias no filogenéticas (distancia de Bray-Curtis, índice de Shannon, índice de Jaccard) y distancias filogenéticas (UniFrac ponderadas y no ponderadas).

El otro parámetro es cómo visualizar dicha matriz de disimilitud en dimensiones más bajas. Los métodos basados en la ordenación, como el análisis de coordenadas de principio (PCoA) y el escalado multidimensional no métrico (NMDS), se utilizan para visualizar estas matrices en gráficos bidimensionales o tridimensionales, donde cada punto representa el microbioma completo de una sola muestra. Cada eje refleja el porcentaje de la variación entre las muestras, con el eje X que representa la dimensión más alta de variación y el eje Y que representa la segunda dimensión más alta de variación. Además, cada punto o muestra que se muestra en los gráficos de PCoA o NMDS está coloreado según grupo de muestra, características medidas de diversidad alfa o los niveles de abundancia de una característica específica.

Además, la significancia estadística del patrón de agrupamiento en los gráficos de ordenación se puede evaluar utilizando cualquier prueba estadística de significancia como ANOVA permutacional (PERMANOVA), Análisis de similitudes de grupo (ANOSIM) y Homogeneidad de dispersiones de grupo (PERMDISP). La Figura 7 muestra el diagrama de ordenación representado en 2-D. La significancia estadística se encontró usando PERMANOVA.

Directorio de resultados: Gráficas de PCoA y NMDS en 2-D y 3-D utilizando las distancias/disimilitudes de Bray-Curtis, Jaccard y Jensen-Shannon en: /TIEMPO DE EXPOSICIÓN/Beta\_Diversity

## 2.5 Agrupación jerárquica

En el análisis de conglomerados jerárquico, cada muestra comienza como un conglomerado separado y el algoritmo procede a combinarlas hasta que todas las muestras pertenecen a un conglomerado. Dos parámetros deben ser considerados cuando realizando un agrupamiento jerárquico. El primero es cómo se mide la similitud o distancia entre muestras, que incluye la distancia de Bray-Curtis, el índice de Shannon, el índice de Jaccard, UniFrac ponderado y no ponderado.

El otro parámetro son los algoritmos de agrupamiento, incluido el vínculo promedio (el agrupamiento usa los centroides de las observaciones), el vínculo completo (el agrupamiento usa el par de observaciones más lejano entre los dos grupos), el vínculo único (el agrupamiento usa el par de observaciones más cercano) y el vínculo de Ward. (agrupación para minimizar la suma de cuadrados de dos clústeres cualesquiera).

La figura 8 muestra el resultado de la agrupación en forma de dendrograma. La Figura 9 muestra el resultado de la agrupación en forma de mapa de calor.

Directorio de resultados: /TIEMPO DE EXPOSICIÓN/OTU\_Analysis/Dendrogram\_Analysis

Directorio de resultados: /TIEMPO DE EXPOSICIÓN/OTU\_Analysis/Taxonomic\_abundance\_cluster\_heatmap

## 2.6 Análisis del microbioma central

Este método ayuda a identificar taxones centrales o características que permanecen sin cambios en su composición en toda la comunidad microbiana. Se deben considerar dos parámetros al realizar el análisis del microbioma central. El primero es la prevalencia de la muestra, que se define como las fracciones mínimas (porcentaje) de las muestras que debe observar un taxón o una característica. El otro parámetro es la

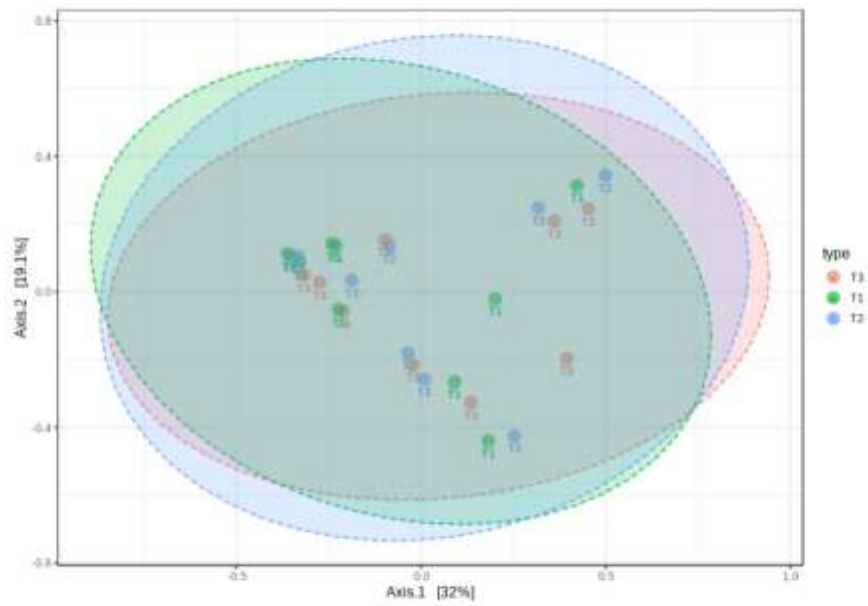


Figure 7: **Figura 7:** Gráfica de PCoA en 2-D utilizando la distancia de Bray-Curtis. Las variaciones explicadas se muestran entre corchetes.

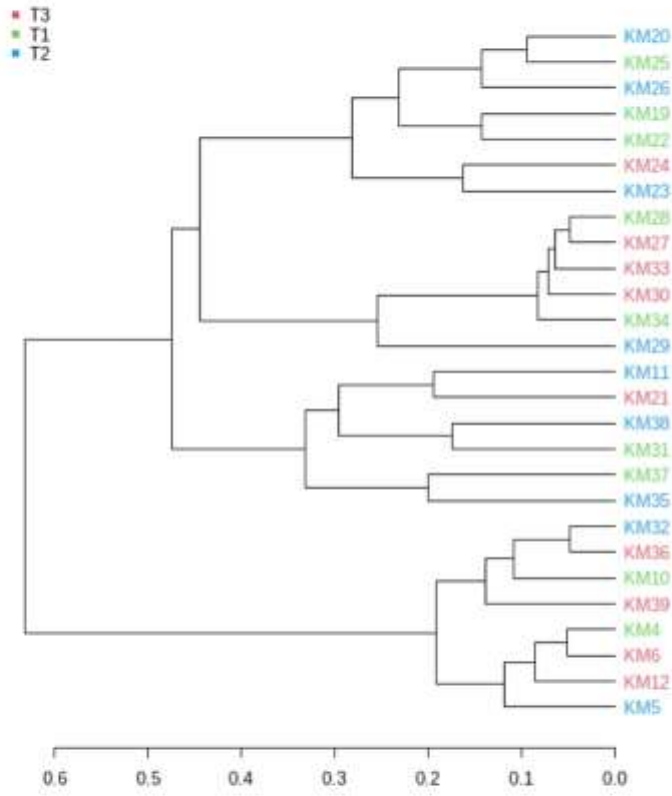


Figure 8: **Figura 8:** El resultado de la agrupación se muestra como un dendrograma (medida de la distancia mediante Bray-Curtis y el algoritmo de agrupación mediante vínculo promedio a nivel de filo)

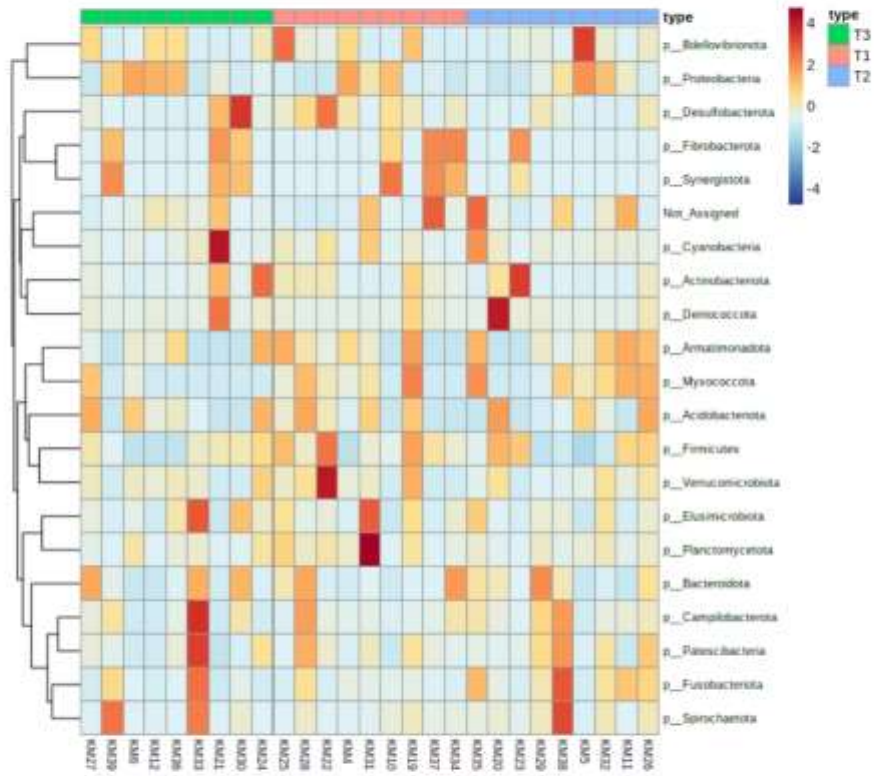


Figure 9: **Figura 9:** El resultado de la agrupación se muestra como un mapa de calor (medida de distancia usando un algoritmo euclidiano y de agrupación usando vínculo promedio a nivel de filo)

abundancia relativa (fracciones) de un taxón o características para considerarlos como parte del miembro central.

El resultado de este análisis se representa en forma de mapa de calor de los taxones principales o características donde el eje Y representa el nivel de prevalencia de las características principales en el rango del umbral de detección (abundancia relativa) en el eje X. La Figura 10 muestra el resultado del microbioma central representado en forma de mapa de calor.

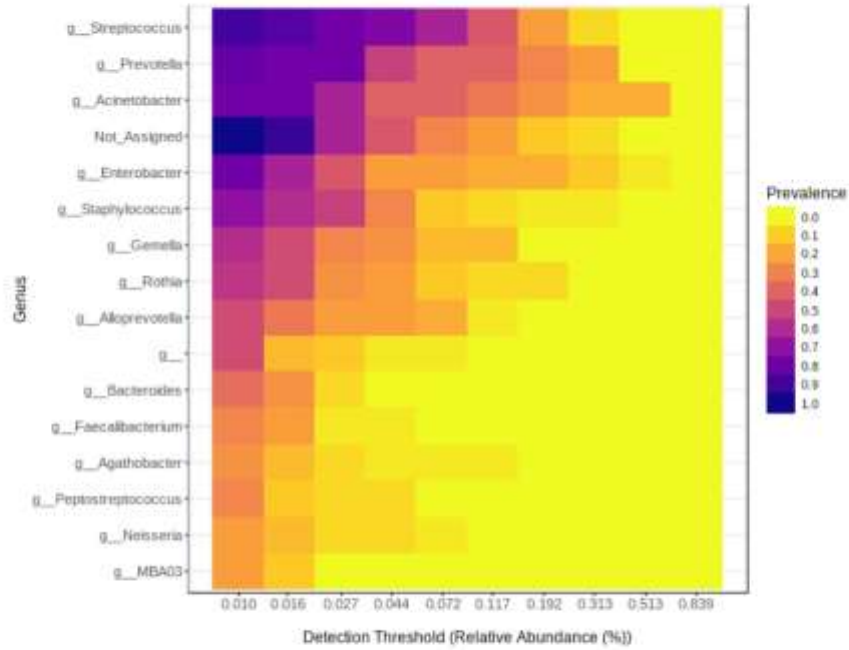


Figure 10: **Figura 10:** Mapa de calor que representa el microbioma central a nivel de género

Directorio de resultados: /TIEMPO DE EXPOSICIÓN/Core\_Microbiome

### 3. Pruebas estadísticas de significancia

#### 3.1 Diversidad alfa

Diversity measure	Statistical method	p-value	F-value	statistic
Observed	ANOVA	0.16825	1.9215	
	Kruskal-Wallis	0.27066		2.6138
Chao1	ANOVA	0.21533	1.6381	
	Kruskal-Wallis	0.25401		2.7407
ACE	ANOVA	0.23356	1.5461	

Diversity measure	Statistical method	p-value	F-value	statistic
Shannon	Kruskal-Wallis	0.29096		2.4691
	ANOVA	0.5055	0.70198	
Simpson	Kruskal-Wallis	0.31388		2.3175
	ANOVA	0.84534	0.1692	
	Kruskal-Wallis	0.50444		1.3686

### 3.2 Diversidad beta

Distance method	Statistical method	F-value	R-squared	p-value	[ANOSIM] R
Bray-Curtis	PERMANOVA	0.42604	0.034286	< 0.974	
	ANOSIM			< 0.955	-0.084438
	PERMDISP	0.11518		0.89169	
Jesen-Shannon	PERMANOVA	0.22911	0.018735	< 0.962	
	ANOSIM			< 0.979	-0.095107
Jaccard	PERMDISP	0.047134		0.95405	
	PERMANOVA	0.54025	0.043082	< 0.99	
	ANOSIM			< 0.955	-0.084438
	PERMDISP	0.14397		0.86665	

### Referencias

- Weiss et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics, *Microbiome* 2017
- Gaurav S. Kandlikar ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations., 2018.
- Paul J. McMurdie phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data., 2013, R package version 1.19
- Paul J. McMurdie phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data., 2013, R package version 1.19
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., and Xia, J. (2020) "Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data" *Nature Protocols* 15, 799–821
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I., Agellon, L.B., and Xia, J. (2017) "MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data" *Nucleic Acids Research* 45, W180-188