



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”**

**“FACTORES DE RIESGO EN LOS RECIÉN NACIDOS PARA
EL DESARROLLO DE SEPSIS NEONATAL CON
ETIOLOGÍA IDENTIFICADA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA**

P R E S E N T A :

Henry Nelson Pérez Santiago

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. ENRIQUE CERVANTES SEGURA

DIRECTOR

CO-DIRECTOR

Dr. RICARDO FIGUEROA DAMIAN
Departamento de Infectología e Inmunología
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

M en C HÉCTOR FLORES HERRERA
Departamento de Infectología e Inmunología
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



MÉXICO, DF. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

APROBACION DE LA TESIS

“FACTORES DE RIESGO EN LOS RECIÉN NACIDOS PARA EL DESARROLLO DE SEPSIS NEONATAL CON ETIOLOGÍA IDENTIFICADA”

DR. CARLOS RAMIREZ ISARRARAZ
SUBDIRECTOR ACADÉMICO Y DE GESTIÓN
EDUCATIVA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“Isidro Espinosa de Los Reyes”

DR. ENRIQUE CERVANTES SEGURA
PROFESOR TITULAR
ESPECIALIDAD DE INFECTOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“Isidro Espinosa de Los Reyes”

DIRECTOR DE TESIS.

CO-DIRECTOR DE TESIS.

Dr. Ricardo Figueroa Damián
DEPTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“Isidro Espinosa De Los Reyes”

M en C Héctor Flores Herrera
DEPTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“Isidro Espinosa De Los Reyes”

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“DR. ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES”
JULIO DE 2010.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el solo hecho de darme la vida y acompañarme en este camino.....

A mis hermanos por compartir este momento en el tiempo conmigo.....

A todos los que han contribuido a alumbrarme en los momentos de duda.....

INDICE

CAPITULO 1. Resumen	1
1.1 Abstract	2
CAPITULO 2. Introducción	3
CAPITULO 3. Planteamiento del Problema	4
CAPITULO 4. Marco teórico	5
4.1 Definición de Sepsis Neonatal	5
4.2 Epidemiología	5
4.3 Clasificación	6
4.4 Manifestaciones Clínicas y Diagnóstico	5
4.5 Métodos para la detección de la Sepsis Neonatal	8
CAPITULO 5. Objetivos.	11
5.1 Objetivo General	11
5.2 Objetivos Específicos	11
CAPITULO 6. Justificación	12
CAPITULO 7. Diseño Metodológico	14
CAPITULO 8. Resultados	18
CAPITULO 9. Discusión	35
CAPITULO 10. Conclusiones	34
CAPITULO 11. Bibliografía	35
ANEXO 1. Recursos materiales y financieros	40

CAPITULO 1. RESUMEN

Introducción: La sepsis neonatal es la primer causa atribuida a la morbilidad y mortalidad en los recién nacidos. Aproximadamente el 20% de los nacimientos con evidencias clínicas de infección han recibido tratamientos antimicrobianos con hemocultivo negativo. Una alternativa en estos casos es la amplificación de la subunidad ribosomal 16S rDNA en combinación con la electroforesis en gradientes desnaturizantes (DGGE). La PCR-DGGE ha identificado bacterias cultivables y no cultivables en diversas muestras biológicas.

Objetivo: Identificar los factores de riesgo más importantes que se asocian al desarrollo de la sepsis neonatal con etiología identificada mediante la técnica de electroforesis en geles con gradientes de desnaturización (DGGE).

Material y métodos: Las muestras de sangre neonatal fueron obtenidas por punción de la vena de tres grupos de estudio: control (n=30), sospecha (n=30) y con evidencias de sepsis neonatal (n=15). El hemocultivo se realizó con 1 ml de sangre para el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas. El DNA bacteriano se aisló a partir de 50 µl de sangre mediante el reactivo de DNAzol. Los geles desnaturizantes se prepararon con urea y formamida en un rango de 20-70%. La electroforesis se corrió a 60°C y 60V por 16 horas; posteriormente los geles fueron teñidos con SYBR-DNA. Las bandas fueron visualizadas en luz ultravioleta.

Resultados: De los factores de riesgo asociados con la transmisión de infección materna encontramos a las infecciones en vías urinarias, la vaginosis bacteriana así como la ruptura prematura de las membranas fetales. Se realizaron un total de setenta y cinco hemocultivos de los cuales encontramos el crecimiento en el grupo control (n=30) de *S. epidermidis*; en el grupo con sospecha (n=30) se no se detectó ningún microorganismo y en el grupo de sepsis neonatal (n=15) se identificó a *Enterococcus*, *S. epidermis*, *E. agglomerans*, *S. aureus*, *E. coli* (2 casos) y *K. pneumonia* (2 casos) como las bacterias asociadas al proceso infeccioso.

En el grupo de sepsis neonatal se detectó un hemocultivo positivo (40%) y dos bacterias (20%). Por medio de la PCR-DGGE en el grupo de sepsis neonatal se identificaron a *E. faecium* (2 casos), *S. aureus* (2 casos), *E. coli* (4 casos) y 37 bandas más que no correspondieron con la cepas de referencia. Una prueba de DGGE fue positiva (95%) y más de dos bacterias (80%). Así mismo, se detectó en el 53% de los casos una bacteria con el mismo corrimiento electroforético. Finalmente, en el grupo control el hemocultivo dio positivo en el 28.5% de las muestras analizadas, mientras que la PCR-DGGE no detectó ninguna bacteria.

Conclusiones: La prueba molecular PCR-DGGE corroboró la infección en 2.3 veces más las bacterias en los casos de sepsis con respecto a las detectadas por el hemocultivo.

Palabras claves: *Sepsis Neonatal, Hemocultivo, Electroforesis en Gradientes Desnaturizantes.*

CHAPTER 1. ABSTRACT

Background: Neonatal sepsis is the principal cause of morbidity and is responsible for about 30-50% of the total neonatal death in developing countries. Although the blood culture is considered the “gold standard” by the diagnosis, not in all neonatal sepsis is hemocultive-positive. The explications of this low sensibility included small volumes blood obtained, number colonies-forming units, the viability bacterial and special cultivation conditions is necessary. In recent year, the highly conserved bacterial 16S ribosomal deoxyribonucleic acid (rDNA) gene is use to detected many human infections. One molecular approaches is denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S rDNA gene segments offers the possibility of revealing a significant portions of the bacterial flora in differents samples.

Objective: The objective main of this study was the comparing the bacterial detection in blood between the hemocultive and the PCR-DGGE in cases with sepsis neonatal.

Materials and Methods: Blood-samples of newborns without (control group, n=7) and with clinical sepsis evidences (cases, n=15) was admitted to the neonatal intensive care unit of National Institute of Perinatology, México City. In the cases of sepsis blood samples were obtained before beginning any of the therapeutic treatment. In all the cases the blood was obtained by puntion of the vein. Eight hundred microliters of blood was used for the microbial analysis of gram-positive and gram-negative bacterial. Fifty microlites of blood was used for the extraction of the DNA which was analysis for the PCR-DGGE. The specific primers to PCR amplified of variable-3 region of 16S rDNA was used. The analysis for DGGE consisted in 8% acrilamide/bis-acrilamide electrophoresis plus urea and formamide range 20-70% by the denaturing electrophoretic conditions for 16 hours to temperature and constant voltage.

Results: Risk factors associated with maternal transmission infectious are urinary tract infections, bacterial vaginosis and premature rupture of fetal membranes. A total of seventy-five blood cultures of which we find growth in the control group (n = 30), *S. epidermidis*, in the group with suspected sepsis (n = 30) not was detected and neonatal sepsis group (n = 15) were identified *Enterococcus*, *S. epidermis*, *E. agglomerans*, *S. aureus*, *E. coli* (2 cases) and *K. pneumonia* (2 cases). In the group of neonatal sepsis was detected by hemocultive one (40%) and two bacteria (20%). PCR-DGGE in the group of neonatal sepsis were identified *E. faecium* (2 cases), *S. aureus* (2 cases), *E. coli* (4 cases) and 37 bands that did not correspond with the reference strains. Detected by DGGE, one (95%) and 2 or more bacteria (80%). Also, was detected in 53% of the bacteria with the same electrophoretic shift. Finally, in the control group had positive blood cultures 28.5% of the samples analyzed while the PCR-DGGE did not detect any bacteria.

Conclusions: The molecular test of PCR-DGGE detects 2.3% of bacterial pathogens causing of the neonatal sepsis with respect to hemocultive methods.

Keywords: *Neonatal Sepsis, Hemocultive, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

CAPITULO 2. INTRODUCCIÓN

La sepsis neonatal representa una de las causas importantes de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos en todos los hospitales del mundo; esta población infantil tiene condiciones de riesgo muy específicas que aumentan la susceptibilidad para ser colonizados e infectados por diversos microorganismos (prematurez, bajo peso al nacimiento, alteraciones de la inmunidad, entre otras), al igual que existen factores maternos que contribuyen como potenciadores del riesgo para desarrollar sepsis neonatal (infecciones durante la gestación, ruptura prematura de membranas).

Las manifestaciones clínicas de sepsis neonatal son inespecíficas, muchos de los signos son expresados por otras patologías e incluso se observan como parte normal en el período de transición de la vida intrauterina a la extrauterina, por esta razón, se emplean estudios de laboratorio que puedan apoyar o descartar la sospecha diagnóstica, sin embargo, hasta el día de hoy no se tienen estudios de gabinete y paraclínicos lo suficientemente específicos y sensibles que puedan despejar las dudas relacionadas al diagnóstico.

La conjunción de los hallazgos clínicos y los antecedentes de riesgo continúan siendo las herramientas de mayor importancia al momento de decidir iniciar un tratamiento antimicrobiano, reportándose que hasta un 15% aproximadamente de los recién nacidos reciben esquemas de antibióticos sin ser necesarios, es por ello que todo estudio de investigación que pueda aportar mecanismos para identificar tempranamente a los recién nacidos con riesgo para sepsis neonatal y que pueda reconocerlos de forma temprana en la evolución del padecimiento, contribuirá a ofrecer mejores oportunidades de salud a los recién nacidos.

CAPITULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel internacional la sepsis neonatal está ubicada como la sexta causa de muerte en los neonatos y la octava en los lactantes dentro del primer año de vida ⁽¹⁾. La mortalidad asociada a infecciones neonatales es de aproximadamente del 10% ^(2,3). En México la incidencia oscila entre el 4 al 15.4 por cada 1000 nacidos vivos. En el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro espinoza de los Reyes” (INPerIER) se ha reportado una incidencia en los últimos cinco años de 9 a 36 casos por cada 100 egresos ⁽⁴⁾.

Las infecciones maternas comúnmente asociadas como factores de riesgo para el desarrollo de sepsis neonatal son: 1) vaginosis bacteriana, 2) infección de vías urinarias, 3) corioamnioítis e infecciones en líquido amniótico; las cuales explican las causas de los nacimientos prematuros (ruptura de las membranas fetales y trabajo de parto) y el bajo peso de los recién nacidos; sin embargo, la sintomatología clínica de las infecciones materno-fetales no siempre son evidentes, por lo que los médicos encargados en la salud neonatal se apoyan de diversas pruebas de laboratorio que corroboren el proceso infeccioso.

Como parte de la búsqueda de la etiología y confirmación de la sepsis neonatal, se emplean estudios de laboratorios como el hemocultivo, marcadores serológicos y la cuenta hemática ⁽⁵⁾; sin embargo, estas estrategias no son totalmente sensibles y específicos. Otra de las limitantes es que el reporte del hemocultivo tarda hasta tres días lo que complica el tratamiento terapéutico en los recién nacidos. Lo que conlleva que hasta el 15% de los recién nacidos reciban tratamiento antimicrobiano sin obtenerse el aislamiento de un microorganismo como causante de la infección ⁽⁶⁾.

Actualmente se han comenzado a utilizar herramientas moleculares como la amplificación de genes específicos para diversos microorganismos y la citometría de flujo lo que permite corroborar en qué casos la presencia de la sintomatología es derivada de un proceso infeccioso ⁽⁵⁾.

El presente estudio se realizó con la finalidad de identificar los diversos factores de riesgo maternos que condicionen infecciones neonatales con etiología identificada mediante la amplificación del dominio-3 del gen 16S rDNA en combinación con la electroforesis en gradientes desnaturizantes (DGGE). Lo anterior permitirá establecer diferentes estrategias de vigilancia materna oportunas que contribuyan a disminuir la morbilidad y mortalidad relacionada a la sepsis neonatal.

CAPITULO 4. MARCO TEÓRICO

4.1 DEFINICION

La palabra sepsis se deriva de la lengua griega “pepsis”, que significaba el proceso de maduración y fermentación, sepsis era sinónimo de putrefacción caracterizada por mal olor. Fue hasta el consenso de la American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM), en 1991 cuando se propuso la siguiente definición operativa que es la presencia de manifestaciones clínicas de respuesta inflamatoria sistémica asociados a un proceso infeccioso activo ⁽⁷⁾.

4.2 EPIDEMIOLOGIA

La sepsis está ubicada en el sexto lugar como causa de muerte en los neonatos y la octava causa de muerte en los lactantes dentro del primer año de vida ⁽¹⁾. La sepsis neonatal afecta aun más a los recién nacidos prematuros menores a 37 semanas de gestación y con peso menores a 1500 gramos.

Las incidencia de la sepsis neonatal en países desarrollados es menor al 1.2%; sin embargo, éste porcentaje aumenta en los países en vías de desarrollo donde se ha reportado una incidencia de entre el 20 al 40% del total de los nacimiento atendidos en la clínica ^(8,9).

En Estado Unidos se ha estimado que en los últimos 20 años la incidencia de la sepsis ha aumentado a un ritmo de 8,7% por año, y en Europa se reportan cifras similares. La incidencia de sepsis neonatal en España en la población en general oscila entre 1 – 8/1000 recién nacidos vivos ⁽¹⁰⁾. En Cuba en el año de 1995 se registró un incremento de la mortalidad infantil, quedando colocada la sepsis neonatal como la tercera causa de muerte en el menor de un año, solo superada por afecciones perinatales y anomalías congénitas ⁽¹¹⁾.

En México se ha reportado una incidencia de sepsis neonatal entre el 4 al 15.4 casos por cada 1,000 recién nacidos vivos. El Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes” (INPerIER), es un hospital de alta especialidad que cuenta con una unidad de cuidados intensivos para el manejo de recién nacidos, productos de embarazos de alto riesgo; la tasa de sepsis neonatal es del 15,4 por cada 1000 nacimientos ^(12,13).

4.3 CLASIFICACION

Con base al tiempo en el cual el neonato presenta los signos y síntomas de infección, la sepsis neonatal se clasifica en 1) temprana y 2) tardía. Los factores de riesgo para el desarrollo de la sepsis neonatal temprana y tardía, incluyen una historia de inmunodeficiencias, algunos errores del metabolismo como la galactosemia en la cual se ve comprometida la respuesta inmunológica a las infecciones. Además de la infección por las bacterias se encuentran los virus como el virus sincitial respiratorio y los enterovirus lo que aumenta significativamente la morbilidad y mortalidad ⁽¹⁷⁾.

Sepsis neonatal temprana

Es la patología diagnosticada dentro de las primeras 72 h de vida ⁽¹²⁾. La sepsis neonatal temprana ocurre principalmente por la transmisión materna (vertical), de diferentes microorganismos patógenos (bacterias, hongos y virus) alojados en el tracto cervico vaginal y que de manera ascendente infectan e invaden la cavidad uterina. Los factores de riesgo son la ruptura prematura de las membranas fetales (> 18 horas antes del nacimiento), fiebre constantes, corioamnioítis, trabajo de parto prematuro menor a 37 semanas de gestación y la preeclampsia/eclampsia. Los recién nacidos obtenidos por vía vaginal pueden infectarse durante su paso por el canal de parto y manifestar las síntomas clínicas como taquipnea, distensión abdominal, fiebre, e inestabilidad en la temperatura corporal.

Las bacterias frecuentemente aisladas en la sepsis neonatal temprana son: *Escherichia coli*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *Ureaplasma urealyticum*. El *Streptococcus agalactiae* es asociado a meningitis, actualmente su frecuencia de aislamiento ha descendido debido a las medidas de prevención y tratamiento oportuno ⁽¹⁶⁾.

Sepsis neonatal tardía

Es aquella infección diagnosticada después de las 72 horas de vida ⁽¹²⁾. Los factores de riesgo relacionados con la sepsis neonatal tardía son la permanencia prolongada en las unidades de cuidados intensivos. Procedimientos invasivos durante sus tratamientos terapéuticos como son el uso de catéteres venosos centrales, la alimentación parenteral, presencia de sistemas de derivación ventriculoperitoneal.

Los microorganismos patógenos que se aíslan son los provenientes del ambiente hospitalario, del instrumental utilizado y de la flora del personal de salud que atiende a los recién nacidos, por lo que esta es una infección de origen nosocomial ^(14,15).

En la sepsis neonatal tardía, los microorganismos implicados son bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma pneumoniae* y hongos como *Candida spp*^(16,17).

4.4 MANIFESTACIONES CLINICAS

Los recién nacidos pueden presentar síntomas inespecíficos que en muchas ocasiones son similares a los observados en la adaptación a la vida extrauterina y por diversos padecimientos sin un origen infeccioso.

Entre las principales manifestaciones encontradas en la sepsis neonatal se pueden presentar: inestabilidad de la temperatura, dificultad respiratoria, diarrea, vómito, distensión abdominal, hepatomegalia, inestabilidad de la frecuencia respiratoria (taquicardia o periodos de apnea), letargia, hipoglucemia, fiebre y persistencia inexplicable de ictericia. En algunos casos, las lesiones dérmicas pueden ser manifestación de infección⁽¹⁸⁾.

En la evolución natural de la sepsis neonatal puede derivar en choque séptico, entidad clínica que tiene una alta morbilidad y mortalidad⁽¹⁹⁾, siendo las principales manifestaciones clínicas: la taquicardia o bradicardia, cambios neurológicos, letargia o irritabilidad, hipotermia, retardo en el llenado capilar, hipotensión, mala perfusión sanguínea periférica y oliguria⁽²⁰⁾.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de sepsis neonatal no es fácil, informándose que hasta un 15% de los recién nacidos reciben tratamiento antimicrobiano sin obtenerse un aislamiento microbiológico como causa de una probable infección⁽⁶⁾.

A través del tiempo se han realizado escalas diagnósticas, que incluían factores maternos y neonatales, como: 1) NOSEP-I predictor de sepsis nosocomial realizado por Mahieu y cols⁽²¹⁾ publicada en el año 2000, la cual incluye un dato clínico, 3 de laboratorio y un factor de riesgo, considerándose positiva la presencia de un puntaje mayor a 8, con una sensibilidad del 95%, especificidad de 43%, valor predictivo positivo (VPP) de 93% y valor predictivo negativo (VPN) de 93%; 2) NOSEP-II incluye los mismos parámetros, además de los resultados de cultivos de los catéteres centrales⁽²²⁾.

La escala empleada en el INPerIER por algún tiempo incluía 5 datos obtenidos por anamnesis (tiempo de ruptura de membranas, sospecha de corioamnioítis, prematurez, parto fortuito, apgar menor de 6 a los 5 minutos de vida), y 6 datos de laboratorio (cuenta leucocitaria menor de 7,500 o mayor de 30,000 células/ml, cuenta de neutrófilos menor de 1,750 cel/ml, bandas, relación banda/neutrófilo mayor de 0.20, cuenta de plaquetas menor de 150,000mm³, proteína C reactiva mayor a 14 mg/L), considerándose positiva

con un puntaje mayor de 5 ⁽²³⁾. Sin embargo, dicha escala se dejó de emplear por la poca especificidad de los parámetros incluidos en la escala.

La escala propuesta por la ACCP/SCCM publicada en 1992 por Bone y cols ⁽²⁴⁾, que incluye datos clínicos y de laboratorio como son la temperatura corporal mayor de 38°C o menor de 36°C, frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto, frecuencia respiratoria mayor de 20 latidos por minuto, o PaCO₂ menor de 32 mmHg y la presencia de una cuenta leucocitaria mayor de 12,000 cel/ml o menor de 4,000 cel/ml, considerándose positivo un puntaje mayor de 2.

Actualmente los datos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica adaptados para neonatos, propuestos en el consenso de sepsis publicado en 2005, siguen siendo los datos clínicos de referencia para realizar la sospecha y el diagnóstico de Sepsis ⁽²⁵⁾.

4.5 MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO.

a) Hemocultivos.

El estándar de oro para el diagnóstico de sepsis neonatal continua siendo el aislamiento microbiológico en el hemocultivo. Es necesario tomar en cuenta que deben de presentarse dos condiciones para que los hemocultivos sean positivos, la primera de ellas es que el inóculo sea de calidad, además de los microorganismos sean viables para que se desarrollen *in vitro*; la muestra deberá de contener una mínima cantidad necesaria de bacterias, estimándose que se requieren aproximadamente 10⁶ UFC para que sean detectadas mediante el cultivo bacteriológico ^(26,27). La segunda condición, se refiere a los requerimientos diferenciales del medio de cultivo, así como de las características de la incubación: temperatura y presión de CO₂.

Del total de muestras analizadas, se estima que en el 40% se desarrolla crecimiento bacteriano y el 25% dan falsos positivos. La baja sensibilidad y especificidad, se relaciona con el bajo volumen de sangre obtenido de los recién nacido. Una limitante importante de los hemocultivos es que se necesitan de hasta 4 días para obtenerse el resultado del laboratorio de microbiología ^(28,29).

b) Métodos especiales.

Los marcadores hematológicos e inmunológicos como el recuento de células blancas, neutrófilos inmaduros, presencia de vacuolas o granulaciones tóxicas en células sanguíneas y relación banda/neutrófilos en donde el rango de sensibilidad y especificidad ha sido desde un 17% al 90% y 31% a 100% respectivamente, cuando se encuentran más de dos de éstos parámetros alterados la sensibilidad alcanza hasta 96% pero con un valor predictivo positivo de 31% ⁽³⁰⁾.

La Proteína C Reactiva (PCR) ha sido ampliamente estudiada desde finales de los 80's y principio de los 90's, cuantificando su índice hematológico como un marcador de sepsis, esta proteína es sintetizada durante la fase aguda entre las primeras 6 a 8 h después de iniciado el proceso infeccioso o el daño tisular manteniendo una vida media de 19 h, se reporta una sensibilidad en la fase inicial de 60% la cual se incrementa a las 24 y 48 h después de haberse iniciado el padecimiento a 82 y 84% respectivamente, la especificidad es de 93% y el valor predictivo positivo de 100% ^(30,31).

c) Electroforesis con geles en gradientes de desnaturalización (DGGE).

Esta prueba diagnóstica se basa en el principio físico-químico de la migración de diferentes biomoléculas a través de un soporte o matriz (acrilamida o agarosa) que se somete a un campo eléctrico. Como el DNA posee carga eléctrica negativa, se mueve hacia el ánodo. La separación de las biomoléculas depende de su tamaño (peso relativo); a mayor volumen, menor movilidad electroforética.

Aunque la DGGE, aún no se ha utilizado de forma rutinaria para identificar las bacterias responsables de sepsis neonatal, se ha iniciado a emplear en la identificación de bacterias patógenas en la vaginosis bacteriana (*Atopobium vaginae* y *Eggertella*), gastroenteritis (*Bacteroides fragilis*, *Faecalibacterium prauznitzii*) y periodontitis (*Tanerellaforsythensis*) ^(32, 33,34).

En la investigación de la microbiología de endodoncia, recientemente la técnica de PCR-DGGE ha servido para evaluar la diversidad de la microbiota del conducto radicular, la naturaleza del método permite la detección de especies raras e inesperadas ⁽³⁵⁾.

Otra aplicación de la PCR-DGGE ha sido en el análisis de mutaciones que se presentan en células linfoblásticas. El primer análisis de los genes humanos fue con el locus- β -globina, y actualmente las mutaciones continúan investigándose usando la técnica de DGGE ⁽³⁶⁾.

TRATAMIENTO

No existen datos que soporten un régimen particular de antimicrobianos ⁽³⁷⁾, considerándose los organismos potenciales, pueden realizarse ajustes en los medicamentos empleados. Para la cobertura de microorganismos gram-positivos, se recomienda ampliamente la ampicilina, esto es particularmente justificado cuando se sospeche la etiología de *Listeria* ⁽³⁸⁾. Considerándose los microorganismos gram-negativos como potenciales patógenos, el esquema terapéutico puede incluir un aminoglucósido o una cefalosporina de tercera generación.

La resistencia antimicrobiana está cambiando la epidemiología de los patógenos invasivos. La presencia de microorganismos como el *Staphylococcus aureus* meticilino-

resistentes, *Enterococcus* resistente a la ampicilina, hace que el empleo de la vancomicina sea usada en una proporción importante aunque no esté justificado ⁽³⁹⁾.

En adición a la administración de antimicrobianos, se deberá ofrecer un tratamiento de soporte para los aparatos y sistemas. Los pacientes con sepsis neonatal necesitan un accesos venosos, ya sea para la corrección de líquidos y electrolitos, alteraciones ácidos bases, anormalidades hematológicas, entre otras.

CAPITULO 5. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

5.1. OBJETIVO GENERAL:

Identificar los factores de riesgo más importantes que se asocian al desarrollo de la sepsis neonatal con etiología identificada mediante la técnica de electroforesis en geles con gradientes de desnaturalización (DGGE).

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Establecer la fuerza de asociación entre la ruptura prematura de membranas con el desarrollo de sepsis neonatal corroborada y con etiología identificada.

2.- Establecer la fuerza de asociación entre la prematuridad con el desarrollo de sepsis neonatal corroborada y con etiología identificada.

3.- Establecer la fuerza de asociación entre bajo peso al nacer con el desarrollo de sepsis neonatal corroborada y con etiología identificada.

CAPITULO 6. JUSTIFICACIÓN

La sepsis neonatal representa un padecimiento que en la mayoría de las ocasiones es difícil de diagnosticar a pesar de los adelantos en las técnicas de laboratorio, por lo cual se han investigado diversos métodos que ayuden a incrementar la sospecha y diagnóstico de una probable infección en los recién nacidos, tablas de puntaje, reactantes de fase aguda, y actualmente la aplicación de las técnicas de biología molecular, aunado los métodos tradicionales de microbiología (hemocultivo), lo que continúan siendo el estándar de oro para el diagnóstico de los padecimientos infecciosos. En el caso particular de la sepsis neonatal, el hemocultivo es la prueba diagnóstica estándar de oro, no obstante que no es lo suficientemente sensible y específico en la práctica clínica.

Las manifestaciones clínicas que se presentan en el recién nacido, si es que se presentan, son compartidas por varios padecimientos, incluso se presentan en las primeras horas de transición y adaptación a la vida extrauterina, fenómeno considerado como normal en algunos recién nacidos, esto conlleva a la necesidad de tener una alta sospecha de la presencia del padecimiento, para iniciarse el tratamiento adecuado e incidir en disminuir la morbilidad y mortalidad que se asocian con esta patología.

En la práctica diaria médica surge la interrogante de cual recién nacido deberá de someterse a una observación minuciosa y de éstos a cuales realizar exámenes de laboratorio más exhaustivos y quienes de ellos ameritan iniciar con tratamiento antimicrobiano de forma inmediata, tratamiento que generalmente es por tiempo prolongado, el cual a su vez, incrementa el riesgo de adquirir infecciones por microorganismos nosocomiales.

Se considera que los antecedentes maternos obstétricos, la evolución durante la gestación, el medio ambiente y condiciones de nacimiento juegan un papel importante como factores de riesgo para incrementar la posibilidad de desarrollar una infección y derivar en una sepsis neonatal, que pudiese llegar a comprometer la vida del recién nacido. Las referencias internacionales enlistan una serie de factores de riesgo, algunas con mayor importancia (infección de vías urinarias materna, ruptura prematura de membranas, prematurez, bajo peso), que aún estando presentes no condicionan a que el recién nacido tenga alguna sintomatología.

Es necesario el análisis de los factores de riesgo asociados a sepsis neonatal y evidenciar los de mayor relevancia, por ello se planteó realizar dicho escrutinio en los recién nacidos con el diagnóstico confirmado de sepsis neonatal, al tenerse la identificación microbiológica causal mediante la técnica de Electroforesis con Geles en Gradientes de Desnaturalización (DGGE), técnica de laboratorio que apunta hacia resultados alentadores.

Los resultados obtenidos pueden contribuir a identificar a los recién nacidos con factores de riesgo importantes para presentar una infección y evolucionar a sepsis neonatal, sirviendo de igual forma para unificar criterios de decisión sobre el mejor momento de

iniciar el tratamiento antimicrobiano específico que disminuya el riesgo de complicaciones y mortalidad en los recién nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”.

CAPITULO 7. DISEÑO METODOLÓGICO

TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Estudio de casos y controles.

UNIVERSO DE ESTUDIO.

Recién nacidos con sospecha de sepsis neonatal temprana o tardía, que hayan sido atendidos en la unidad de cuidados intermedios (UCIN) y en la unidad de cuidados intensivos del recién nacido neonatales (UCIREN), ambas unidades pertenecen al Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

POBLACIÓN.

Recién nacidos con sospecha de sepsis neonatal temprana o tardía, atendidos en las unidades de cuidado neonatal del Instituto Nacional de Perinatología.

TIPO DE MUESTREO.

No aleatorio, consecutivo de conveniencia.

CRITERIOS DE SELECCION

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

CASOS

- Recién nacidos vivos con sepsis neonatal corroborada mediante el aislamiento molecular de la Electroforesis con Geles en Gradientes de Desnaturalización (DGGE).
- Recién nacidos vivos con sospecha de sepsis neonatal.
- Que no hayan recibido tratamientos antibióticos antes de la toma de la muestra.

CONTROLES

- Recién nacidos sin manifestaciones clínicas de infección.
- Recién nacidos cuyos padres aceptaron de manera informada participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Recién nacidos referidos de otra institución de salud.
- Recién nacidos a quienes no se les realizó la prueba de Electroforesis con Geles en Gradientes de Desnaturalización.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- Egresados antes de concluirse los estudios clínicos y paraclínicos necesarios para el diagnóstico de sepsis neonatal.

DEFINICIÓN DE VARIABLES.

VARIABLE DEPENDIENTE.

Sepsis Neonatal.

Definición conceptual: Presencia de manifestaciones clínicas de respuesta inflamatoria sistémica como resultado de un padecimiento infeccioso activo.

Definición operacional: Presencia de manifestaciones clínicas de respuesta inflamatoria sistémica, con o sin la presencia de un foco infeccioso en algún aparato o sistema, aunado al aislamiento microbiológico mediante la técnica de Electroforesis con Geles en Gradientes de Desnaturalización.

Tipo de variable: Nominal dicotómica.

Escala de medición: Evaluable, no evaluable.

VARIABLES INDEPENDIENTES.

Infección de Vía Urinaria Materna.

Definición conceptual: Presencia en el examen general de orina de nitritos acompañados o no de leucocitos mayores a 10/campo de alto poder, con sintomatología sugerente (disuria, polaquiuria, tenesmo, pujo, Giordano). El urocultivo con reporte de desarrollo microbiológico con más de 100,000 UFC/ml de bacterias gram-negativas o mayor de

10,000 UFC de bacterias gram-positivas de una muestra de orina tomada en condiciones asépticas.

Definición operacional: Antecedentes maternos referidos por la propia madre o anotados en el expediente clínico, de sospecha de infección de vías urinarias al presentarse manifestaciones clínicas sugerentes más un examen general de orina con alteraciones en los parámetros medidos; pudiendo estar presentes el reporte del aislamiento microbiológico.

Tipo de variable: nominal, dicotómica.

Escala de medición: evaluable, no evaluable.

Ruptura Prematura de Membranas Fetales.

Definición conceptual: Ruptura de la membrana amniótica con salida de líquido transvaginal corroborado por clínica, imagenología y/o estudio de cristalografía positiva, en un período de tiempo mayor de 12 horas antes de iniciarse el trabajo de parto.

Definición operacional: Ruptura de la membrana amniótica con salida de líquido transvaginal referido por la paciente, sospechado por clínica, apoyado por estudios de imagenología y/o cristalografía positiva, en un tiempo igual o mayor de 6 horas antes de iniciarse el trabajo de parto.

Tipo de variable: Nominal, dicotómica.

Escala de medición: Evaluable, no evaluable.

Recién Nacido Prematuro.

Definición conceptual: Recién nacido obtenido antes de cumplir las 37 semanas de gestación in-útero.

Definición operacional: Recién nacido el cual nació vivo, calificado mediante escala de Capurro y/o Ballard con menos de 37 semanas de gestación.

Tipo de variable: Ordinal, discreta.

Escala de medición: Evaluable, no evaluable.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.

Una vez realizado la técnica de Electroforesis con Geles en Gradientes de Desnaturalización (DGGE), en las muestras sanguíneas tomadas de los recién nacidos

que presentaron manifestaciones clínicas o antecedentes maternos para sospechar padecimiento infeccioso y secundariamente sepsis neonatal, se identificaron las pruebas positivas con el aislamiento de microorganismo bacteriano como la etiología de dicho eventos infecciosos. Los recién nacidos con pruebas de DGGE positivas conformaron el grupo de casos, de los cuales de forma retrospectiva se procedió a revisar de forma exhaustiva sus expediente clínicos, obteniéndose información sobre los antecedentes materno, evolución y vigilancia del embarazo, trabajo de parto, condiciones al nacimiento, atención médica en las primeras horas de vida y la evolución durante su estancia en las salas a donde fueron referidos los recién nacidos. El grupo control, conformado por recién nacidos sin sospecha de infección y recién nacidos con sospecha de infección sin identificación de algún microorganismo; por cada paciente caso se analizaron 4 pacientes controles. Para identificarse los factores de riesgo en el grupo control, de igual forma se recurrió a la revisión de los expedientes clínicos y reportes microbiológicos del laboratorio de microbiología.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis se basó en la distribución proporcional de las variables y presentados en gráficos y tablas de frecuencia porcentuales y tasas.

Los resultados se presentan como medias y porcentajes. Para comparar las características entre los grupos, se empleó ya sea el test de X^2 o la prueba exacta de Fisher en el análisis de las variables categóricas, y la prueba de t de Student para el análisis de las variables continuas. El modelo de regresión logística se empleó para calcular los *odd ratios* univariados y multivariados, con un intervalo de confianza de 95% para identificar factores asociados con sepsis neonatal. Las variables con $P \leq 0.05$ en el análisis univariado se incluyeron en el análisis multivariado.

Los datos fueron introducidos y procesados por métodos computarizados utilizando el programa SPSS-17 (2008).

ASPECTOS ÉTICOS.

Riesgo igual al mínimo.

CAPITULO 8. RESULTADOS

La población en estudio se conformó por 75 recién nacidos, los cuales estuvieron asignados a tres grupos: 1) neonatos sin manifestaciones clínicas de infección (control; n=30); 2) neonatos con sospechas clínica de sepsis neonatal (n=30); y 3) neonatos con sepsis corroborada mediante el análisis de DGGE (n=15).

Características socio-demográficas maternas.

La edad del grupo control fue de 27.3 ± 7.7 años mientras que en el grupo de neonatos con sospecha de sepsis fue de 25.3 ± 7.0 y del grupo de sepsis neonatal fue de 26.9 ± 6.7 (Cuadro 1). El 90% de las madres del grupo control presentó una escolaridad superior a los 6 años; en tanto que el grupo de sospecha de sepsis y sepsis neonatal fue del 80%. En relación al manejo prenatal, el grupo control presentó el mayor porcentaje con el 77% de asistencias a las consultas clínicas, en tanto que el grupo conformado por la sospecha de sepsis fue del 60% y el grupo de sepsis neonatal correspondió al 53.3%; sin embargo, en ninguno de estos variables analizadas se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Cuadro 1).

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS SOCIO DEMOGRÁFICOS MATERNAS.

	Control (n=30)	SS (n=30)	SN (n=15)	P
Edad materna (años)	27.3 ± 7.7	25.3 ± 7	26.9 ± 6.7	0.5
Escolaridad (%)				
Menor a 6 años	2 (6.6)	6 (20)	3 (20)	0.2
Mayor a 6 años	28 (93.3)	24 (80)	12 (80)	
Control prenatal (%)				
Si	23 (76.6)	18 (60)	8 (53.3)	0.2
No	7 (21.3)	12 (40)	7 (46.6)	

Sospecha de sepsis (SS), Sepsis neonatal (SN); valores de la edad materna representados como el promedio \pm desviación estándar.

Antecedentes gineco-obstétrico.

De acuerdo al número de embarazos, encontramos que las madres primigestas o con más de dos embarazos tanto del grupo control, sospecha de sepsis como del grupo con sepsis neonatal fueron similares entre sí (Cuadro 2; $p=0.2$). El antecedente de aborto del grupo control fue del 30% en tanto que en los grupos de sospecha de sepsis y sepsis neonatal alcanzó el 20%. Estas variables no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Cuadro 2; $p=0.6$).

El apego materno en su vigilancia prenatal mayor a 20 semanas gestacionales en el grupo control y en el de sepsis neonatal fue del 53% mientras que en el grupo de sospecha de sepsis mostró un aumento significativo del 86% (26 pacientes) en el apego en la vigilancia médica con respecto al grupo control (Cuadro 2; $p=0.02$)

CUADRO 2. ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS.

	Control (N=30)	SS (N=30)	SN (N=15)	P
Núm. Embarazos				
Primigestas	12 (40%)	17 (56.6%)	5 (33.3%)	0.2
≥ 2 gestaciones	18 (60%)	13 (43.3%)	10 (66.6%)	
Abortos				
Sí	9 (30%)	6 (20%)	3 (20%)	0.6
No	21 (70%)	24 (80%)	12 (80%)	
Control prenatal en semanas				
< 20	13 (43.3%)	4 (13%)	6 (40%)	0.02
≥ 20	17 (56.6%)	26 (86.6%)	8 (53.3%)	
Núm. consultas prenatales ^a	5.17 ± 3.6	2.93 ± 2.8	4.13 ± 5.4	0.009
Núm. consultas prenatales				
< 5	12 (40%)	25 (83.3%)	10 (66.6%)	0.002
≥ 5	18 (60%)	5 (16.6%)	5 (33.3%)	

^a valor promedio ± desviación estándar.

Antecedentes patológicos maternos.

De los antecedentes fisiopatológicos maternos que se encuentran asociados a la prematuridad de los nacimientos y son factores de riesgo para el desarrollo de la sepsis neonatal se encuentran la diabetes gestacional, hipertensión arterial sistémica, preeclampsia, e infecciones del tracto urinario y cérvico-vaginal; sin embargo, estas variables no fueron estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio (Cuadro 3).

Considerándose el antecedente materno de Diabetes Mellitus y sus repercusiones sobre la gestación, se encontró que el grupo control presentó esta patología en el 33% de las madres; en tanto que en el grupo de sospecha y de sepsis neonatal fue menor al 10% mostrando diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 3; $p=0.02$). Al considerar simultáneamente la infección en vías urinarias y la cérvico-vaginal encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio ($p=0.04$; Cuadro 3).

CUADRO 3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS MATERNOS.

	Control (n=30)	SN (n=15)	SS (N=30)	<i>P</i>
DM (%)				
si	10 (33.3)	1 (6.6)	3 (10)	0.02
No	20 (66.6)	14 (93.3)	27 (90)	
DG (%)				
si	10 (33.3)	0 (0)	3 (10)	0.06
No	20 (66.6)	15 (100)	27 (90)	
HAS (%)				
si	7 (23.3)	5 (33.3)	7 (23.3)	0.7
No	23 (76.65)	10 (66.6)	23 (76.6)	
PE (%)				
si	4 (13.3)	4 (26.6)	6 (20)	0.5
No	26 (86.6)	11 (73.3)	24 (80)	
IVU (%)				
si	5 (16.6)	6 (40)	7 (23.3)	0.2
No	25 (83.3)	9 (60)	23 (76.6)	
CV (%)				
si	4 (13.3)	4 (26.6)	6 (20)	0.5
No	26 (86.6)	11 (73.3)	24 (80)	
IVU + CV (%)				
si	8 (26.6)	3 (20)	1 (3.3)	0.04
No	22 (73.3)	12 (80)	29 (96.6)	

Diabetes Mellitus (DM), Diabetes gestacional (DG), Hipertensión Arterial Sistemca (HAS), Preeclampsia (PE), Infección de Vías Urinarias (IVU), Cervicovaginitis (CV).

Morbilidad obstétrica.

El empleo de maduradores pulmonares (betametasona y/o dexametasona) como parte del tratamiento complementario y la resolución del embarazo vía vaginal o por cesárea no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio (Cuadro 4; $p=0.6$). En relación al número de dosis de los esteroide usados en el grupo de sepsis neonatal se utilizaron esquemas dobles (27%) y cuádruples (20%), en tanto que en el grupo de sospecha fueron de una sola dosis (27%) y doble (17%).

La ruptura prematura de las membranas fetales con más de 6 horas de evolución fue para el grupo control del 7%, en tanto que en el grupo de sospecha y sepsis neonatal se incremento en el 17% y el 47% respectivamente. Esta variable mostro diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ($p=0.005$; Cuadro 4).

CUADRO 4. MORBILIDAD OBSTÉTRICA.

	Control (n=30)	SS (n=30)	SN (n=15)	<i>P</i>
RPMF (%)				
si	3 (10)	6 (20)	7 (46.6)	0.01
No	27 (90)	24 (80)	8 (53.3)	
RPMF (%)				
Mayor a 6 horas	2 (6.6)	5 (16.6)	7 (46.6)	0.005
Sin ruptura	28 (93.3)	25 (83.8)	8 (53.3)	
MP (%)				
si		13 (43.3)	7 (46.6)	0.6
No	-----	23 (76.6)	8 (53.3)	
VRE (%)				
Cesárea	28 (93.3)	30 (100)	14 (93.3)	0.4
Parto	2 (6.6)	0 (0)	1 (6.6)	

Ruptura Prematura de Membranas Fetales (RPMF), Maduradores Pulmonares (MP), Vía de Resolución del Embarazo (VRE).

Condiciones Clínicas de los Neonatos.

La calificación de Apgar realizado al minuto y a los cinco minutos de vida tomando como referencia el valor de 6, el peso al nacer y el peso al nacer mayor de 2500 gramos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio (Cuadro 5).

En una corte realizado tomando como referencia el peso al nacimiento de 1500 gramos que obtuvimos en el grupo control se presentó en 13% de la población en tanto el valor se incremento al 40% en los grupos de sospecha y sepsis neonatal (Cuadro 5; $p= 0.03$). El porcentaje de los neonatos que requirieron reanimación en el grupo fue del 23%, en tanto que en el grupo de sospecha y de sepsis neonatal fue del 57% y del 40% respectivamente con diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (Cuadro 5; $p= 0.03$). La edad gestacional mayor a 37 semanas de gestación en el grupo sospecha y sepsis neonatal fue del 27% y fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control ($p=0.01$).

CUADRO 5. CONDICIONES DE LOS RECIÉN NACIDOS.

	Control (n=30)	SS (n=30)	SN casos (n=15)	<i>P</i>
Apgar al minuto 1				
Menor a 6	3 (10.0)	8 (26.6)	3 (20)	0.2
Mayor a 6	27 (90.0)	22 (73.3)	12 (80)	
Apgar al minuto 5				
Menor a 6	0 (0)	5 (16.6)	2 (13.3)	0.1
Mayor a 6	30 (100)	25 (83.3)	13 (86.6)	
Peso gramos ^a	2691.7 ± 948	1785.7 ± 902.8	1956.3 ± 841.2	0.01
Peso al nacer (%)				
Menor a 1500 g	4 (13.3)	12 (40.0)	6 (40)	0.04
Mayor a 1500 g	26 (86.6)	18 (60.0)	9 (60)	
Peso al nacer (%)				
Menor a 2500 g	27 (90.0)	23 (76.6)	11 (73.3)	0.2
Mayor a 2500 g	3 (10.0)	7 (23.3)	4 (26.6)	
SP (%)				
si	NA	12 (40)	8 (53.3)	0.5
no		18 (60)	7 (46.6)	
Reanimación (%)				
si	7 (23.3)	17 (56.6)	6 (40)	0.03
no	23 (76.6)	13 (43.3)	9 (60)	
Edad gestacional ^a	37.3 ± 2.5	33.7 ± 3.6	33.2 ± 4.6	0.001
Edad gestacional (%)				
Menor a 37	12 (40.0)	22 (73.3)	11 (73.3)	0.01
Mayor a 37	18 (60.0)	8 (26.6)	4 (26.6)	
Edad gestacional (%)				
Menor a 32	1 (3.3)	10 (33.3)	6 (40)	0.04
Mayor a 32	29 (96.6)	20 (73.3)	9 (60.0)	

Surfactante Pulmonar (SP), ^a valores representados en promedio ± desviación estándar.
NA: No aplica.

Laboratorio clínico de las muestras de sangre.

El valor promedio de la hemoglobina en el grupo control fue de 17 g/ml, siendo similar al grupo de sospecha (15.9 g/ml) y de sepsis neonatal (16 g/ml), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.2$; Cuadro 6). Los valores promedios de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y la relación bandas/neutrófilos fueron similares en los tres grupos de estudio (Cuadro 6).

La concentración de la proteína C-reactiva en los grupos de sospecha y sepsis neonatal fue de 10.13 ± 13.34 y de 12.13 ± 15.83 respectivamente. Estos valores se incrementaron 3.6 veces en el grupo de sospecha y de sepsis neonatal con respecto al grupo control (Cuadro 6; $p=0.01$).

CUADRO 6. LABORATORIOS DE LOS RECIÉN NACIDOS.

	Control (n=30)	SS (n=30)	SN (n=15)	P
Hemoglobina (g/ml)	17.11 \pm 2.57	15.9 \pm 3.37	16.04 \pm 2.20	0.2
Leucocitos (cel/ml)	16303.3 \pm 5450	15233 \pm 10939	12893 \pm 5795	0.4
Neutrófilos (cel/ml)	9791 \pm 5055	8807 \pm 8636	8102 \pm 4740	0.7
Linfocitos (cel/ml)	4826 \pm 1752	4614 \pm 2708	3853 \pm 1890	0.3
Bandas (cel/ml)	467 \pm 608	529 \pm 750	329 \pm 312	0.6
Proteína C-reactiva (g/ml)	3.33 \pm 4.61	10.13 \pm 13.34	12.13 \pm 15.83	0.01

Valores expresados en media \pm desviación estándar.

Identificación microbiológica mediante el cultivo bacteriológico.

Al momento de presentarse la sintomatología clínica de infección neonatal, se procedió a la toma de muestras de líquidos estériles para los cultivos correspondientes y posteriormente se iniciaron los esquemas de tratamientos pertinentes.

Urocultivo.

Se practicaron seis cultivos bacteriológicos y solamente en 1 caso (16.7%) que correspondió al grupo de sepsis corroborada fue positivo encontrándose a *Enterobacter cloacae* como la bacteria responsable de la infección.

Líquido Cefalorraquídeo

Se realizaron 3 cultivos de líquido cefalorraquídeo, ni uno fue positivo.

Hemocultivo

Se realizaron un total de setenta y cinco hemocultivos. En el grupo control se detectaron a *S. epidermidis* en dos (6.7%) de las 30 muestras analizadas. En el grupo de sospecha no se detectó ningún cultivo positivo.

En el grupo de sepsis neonatal se detectaron en 6 pacientes (40%) el crecimiento bacteriológico de *Enterococcus.*, *S. epidermis.*, *E. agglomerans.*, *S. aureus.*, *E. coli* y *K. pneumoniae* como las bacterias causantes del proceso infeccioso (Cuadro 7). Las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *E. coli* y *K. pneumoniae*.

El hemocultivo detecto en 3 (20%) pacientes el aislamiento simultáneo de dos bacterias; los cuales correspondieron a *Cocos gram positivos/S. epidermis* (paciente 3), *E. agglomerans/E. coli* (paciente 6) y *K. pneumoniae/S. aureus* (paciente 8).

En 9 (60%) casos de las muestras analizadas en hemocultivo no detectó el crecimiento bacteriológico.

Identificación bacteriológica en mediante la prueba molecular de PCR-DGGE.

La muestra biológica que se utilizó para la identificación de las bacterias mediante la PCR-DGGE fue la sangre. En el grupo control no encontramos en ninguno de los casos la amplificación del dominio-3 de la región variable del 16S rDNA. Sin embargo, de las 15 muestras del grupo de sepsis neonatal que fueron amplificadas por PCR obtuvimos una banda de 233 pares de bases que corresponde al tamaño esperado para este dominio (Figura 1).

Posteriormente estas muestras fueron sometidas al corrimiento electroforético en un gradiente desnaturante de 20-70% de formamida/urea. De las 15 muestras del grupo de sepsis neonatal, solamente en un caso (paciente 4) no detectamos el corrimiento electroforético de ninguna banda (Figura 2; carril 10). De las 14 muestras del grupo de sepsis neonatal detectamos 37 diferentes patrones de banda bacterias que no correspondieron con el marcador de especies (Figura 2); en tanto que , las bandas que correspondieron con el marcador de especies fueron *E. faecium*, *S. aureus*, y *E. coli* (cuadro 7).

CUADRO 7. COMPARACIÓN ENTRE EL HEMOCULTIVO Y LA PRUEBA MOLECULAR DE PCR-DGGE DE LOS TRES GRUPOS DE ESTUDIO.

	Hemocultivo	Número de bandas detectadas por la PCR-DGGE	Bacterias detectadas por la PCR-DGGE
Control (n=30)	<i>S. epidermidis</i> (2)	0	0
SS (n=30)	0	0	0
SN (n=15)	<i>Enterococcus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> (2) y <i>K. pneumonia</i> (2),	37	<i>E. faecium</i> (2), <i>S. aureus</i> (2), y <i>E. coli</i> (4).

Sospecha de Sepsis (SS), Sepsis Neonatal (SN).

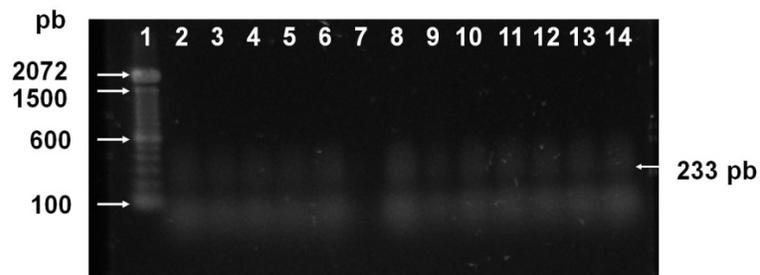


Figura 1 Amplificación del 16S rDNA. Carriles: (1) peso molecular; (2-6) bacterias de referencia; (8-14) neonatos con sepsis; (7) control negativo de PCR.

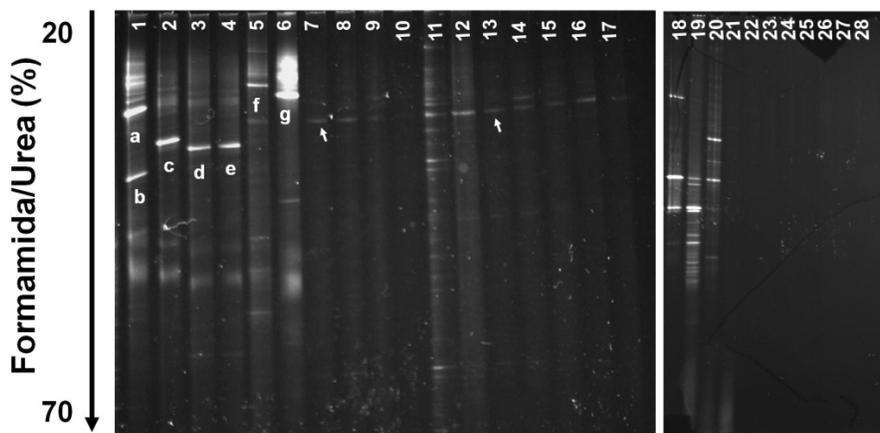


Figura 2 Huella molecular de la PCR-DGGE. a) *S. saprophyticus*, b) *S. aureus*, c) *E. coli*, d) SGB, e) *U. urealyticum*, f) *L. monocytogenes*, g) *E. faecium*; (7-21) neonatos con sepsis; (22-28) grupo control.

Los síntomas clínica más frecuentes que se presentaron en el grupo de sepsis neonatal confirmada por la PCR-DGGE fueron polipnea (20%), trombocitopenia (6.6%), hipotermia

(6.6%), disglucemia (6.6%), vasospasmo (6.6%), aumento de la proteína C-reactiva (6.6%) y aumento del volumen en tejidos blandos (6.6%).

En la CUADRO 7, se enumeran los síntomas iniciales en los Recién Nacidos con sospecha de sepsis.

CUADRO 7. SÍNTOMAS INICIALES SUGERENTES DE INFECCIÓN EN LOS RN CON SOSPECHA DE SEPSIS

	Manifestaciones clínicas de los casos con Sospecha de Sepsis.
Distermias	5
Polipnea	4
Incremento en el conteo de leucocitos y bandas	3
Vasospasmo y mal llenado capilar	1
Disglucemias	3
Leucopenia	2
Distensión abdominal	2
Hidrops no inmune	1
Gastrosquisis	1
Trombocitopenia	1

CAPITULO 9. DISCUSIÓN

Un padecimiento infeccioso en los recién nacidos que no es evidenciado de forma oportuna, por las gama amplia de manifestaciones clínicas, culmina en diversos cambios fisiológicos denominados síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que representa la antesala de complicaciones importantes que ponen en riesgo la vida de los recién nacidos⁽⁴⁰⁾.

En el Instituto Nacional de Perinatología se reporta una alta incidencia de sospecha de sepsis neonatal. Los neonatos reciben una terapia antimicrobiana prolongada en la mayoría de las ocasiones, aumentando el riesgo que a futuro se presenten microorganismos con resistencia antimicrobiana. Partiendo de éstas consideraciones, se realizó el trabajo de investigación para identificar cuáles son los factores de riesgo que se presentan en las madres y en los recién nacidos para desarrollar sepsis neonatal.

Las edades de las madres no representaron ser un factor de riesgo, en contraposición a los reportes de Klinger y colaboradores (2009), asociaron la edad materna con el riesgo para que los neonatos pudieran presentarse hasta de 3.0 veces más la sepsis neonatal con respecto al grupo control^(41,42).

La presencia de enfermedades crónicas degenerativas y propias del embarazo (diabetes mellitus, hipertensión crónica, preeclampsia) en las madres, se asocian en los neonatos a que nazcan de forma prematura, con bajo peso, desarrollo de neutropenia y trombocitopenia⁽⁴³⁾, los que vuelve vulnerables a los neonatos para ser colonizados e infectados por microorganismos, sin embargo, nosotros no encontramos esta asociación. Resultados similares a nuestros hallazgos han sido reportados previamente por Procianny y colaboradores (2010)⁽⁴⁴⁾.

Se ha estimado que la frecuencia de nacimientos por cesárea ha aumentado de forma drástica, sin existir indicaciones precisas en un 40 a 50% de los casos⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾; en el Instituto Nacional de Perinatología, se ha reportado un número similar de nacimientos por ésta vía. El beneficio indirecto de este procedimiento es reducir el contacto del recién nacido con los microorganismos del canal del parto, por lo que se disminuye la incidencia de sepsis neonatal^(48, 49). Este mecanismo de nacimiento no influye en el riesgo para desarrollar sepsis neonatal tardía, cuyos factores de riesgo se asocian al tiempo de estancia en la unidad de cuidados intensivos neonatales y la presencia de microorganismos nosocomiales.

Seale y colaboradores (2009) reportaron que el factor de riesgo materno-fetal se da el primer embarazo ⁽⁴⁹⁾; en nuestra población en estudio no se encontró dicha asociación (Cuadro 2).

En la Norma Oficial Mexicana para la Vigilancia y Control del Embarazo ⁽⁵⁰⁾ se expone que un control prenatal ideal debe de iniciarse desde el primer trimestre del embarazo y cumplirse como mínimo 5 consultas. Los datos encontrados en nuestro estudio identifico que el control prenatal se inició en promedio a la mitad del embarazo, y las madres de los neonatos sin manifestaciones clínicas de infección tuvieron su primer contacto con la Institución de 4 a 7 semanas antes que las madres de los neonatos con sepsis corroborada (Cuadro 2). Al parecer el embarazo no crea el interés adecuado para solicitar atención médica en las primeras semanas de gestación, lo que ayudaría a conocer condiciones mórbidas que pueden complicar la evolución del embarazo.

Los principales factores de riesgo maternos considerados para que los neonatos desarrollen sepsis neonatal, son la ruptura prematura de membranas, fiebre materna, coriamnioítis, infecciones cervicovaginales y de vías urinarias, además de la interrupción del embarazo antes de la semana 37 ⁽⁵¹⁻⁵⁶⁾. Al igual que estos reportes, nuestros resultados identificaron que la ruptura prematura de membranas se presentó en el mayor número de las madres de los recién nacidos con sepsis corroborada, siendo ésta de larga evolución, lo que condujo a que se desencadenara el trabajo de parto prematuro. Los estudios de Linger y Herbst en 2007 ^(42, 57), reportan que a mayor tiempo de ruptura de membranas, mayor es el riesgo para que los neonatos presenten complicaciones, principalmente sepsis neonatal, observación realizada en nuestra investigación.

Secundario al trabajo de parto prematuro, el empleo de esteroides como inductores de la maduración pulmonar se hace necesario, sin embargo, existen datos contradictorios relacionado al número de dosis empleadas, momento ideal de administrarse a las gestates. Existen reportes en donde se indica que el emplear varias dosis de esteroides, asociado a la ruptura prematura de membranas y preeclampsia, aumentaba exponencialmente el riesgo para desarrollar sepsis neonatal ⁽⁵⁸⁾. Sin embargo, diversos reportes refieren que el empleo de betametasona reduce la enfermedad pulmonar en los prematuros y no se asocia a sepsis neonatal o muerte de este grupo de recién nacidos ⁽⁵⁹⁾. De los hallazgos de nuestra investigación, las madres de los neonatos a quienes se les corroboró sepsis neonatal y los neonatos con manifestaciones clínicas de infección, el 44.4% habían recibido esteroides en más de una dosis. Es posible comentar que se observó la asociación de recibir esteroides y el riesgo para desarrollar sepsis neonatal en los neonatos, ya que ninguna de las madres de los neonatos sin manifestaciones clínicas de infección recibió dichos fármacos.

Se tiene el conocimiento de que la hipoxia intraparto contribuye a aumentar el riesgo de sepsis neonatal por el compromiso respiratorio, cardiaco e inmunológico que ocasiona en los recién nacidos ⁽⁶⁰⁾, sin embargo, los neonatos con sepsis neonatal corroborada no presentaron asfixia perinatal, por lo que esta condición no se puede tomar en cuenta como de riesgo en nuestro hospital.

Los recién nacidos de bajo peso y prematuros tienen mayor riesgo de presentar sepsis neonatal ⁽⁶¹⁾. Esta información se corroboró en nuestra investigación al conocerse que los neonatos con sepsis corroborada fueron prematuros y de bajo peso, a diferencia de los otros dos grupos de neonatos. La asociación de prematuridad y bajo peso con sepsis neonatal condicionan a que el sistema inmune “inmaduro” del recién nacido, no tenga la capacidad de responder a la presencia de padecimientos infecciosos, al igual que por permanecer un mayor tiempo en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales los expone a microorganismos nosocomiales.

El compromiso del sistema inmune, específicamente referida como neutropenia ^(62,63), se reporta en mayor número en los recién nacidos hijos de madres con preeclampsia ⁽⁴⁴⁾, y por consiguiente con el riesgo para presentar sepsis neonatal. Nosotros no coincidimos con dichas observaciones, ya que en ninguno de los neonatos investigados se reportó con neutropenia, ni se observó la asociación de preeclampsia-neutropenia (Cuadro 6). La relación de células inmaduras (bandas) y el número total de neutrófilos mayor de 0.2, se considera como un parámetro directo de sepsis neonatal ^(64, 65), siendo diferente nuestros resultados, al no obtenerse dicha relación en ninguno de los recién nacidos con sepsis neonatal corroborada (Cuadro 6). Los hallazgos comentados nos hacen comprender que la presencia de valores normales de bandas, neutrófilos y leucocitos, no descartan la presencia de un padecimiento infeccioso en los neonatos.

Desde hace varios años se toma a la proteína C reactiva como un parámetro de laboratorio con una especificidad adecuada para considerar el diagnóstico de sepsis neonatal ⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾. Dollner y colaboradores (2001) reportaron que la proteína C reactiva con un valor de referencia mayor de 10 mg/L identifica de forma temprana a los recién nacidos con sepsis neonatal ⁽⁷⁰⁾. En nuestra Institución, el valor de referencia considerado normal es una proteína C reactiva menor a 6 mg/L, y los resultados de las determinaciones realizadas a los neonatos con sepsis neonatal corroborada, reportó valores por arriba de dicho valor de referencia, por lo que se puede tomar como un parámetro confiable de búsqueda de los recién nacidos con sepsis neonatal (Cuadro 6).

El hemocultivo es referido como el estándar de oro para corroborar sepsis neonatal, sin embargo, del grupo de recién nacidos con el diagnóstico preciso realizado mediante la técnica de DGGE, solamente en dos neonatos se obtuvo aislamiento microbiológico mediante el cultivo de sangre. Ante la diferencia en el número de identificaciones de microorganismos y corroboración de la sepsis neonatal, es preciso explorar nuevas técnicas de laboratorio que ayuden a realizar el diagnóstico de forma más temprana e incidir en la evolución y pronóstico de los recién nacidos enfermos, proponiéndose a la técnica de DGGE como una herramienta adecuada para tales fines.

CAPITULO 10. CONCLUSIONES

- El control prenatal debe de iniciarse en la primera mitad del embarazo, con un mínimo de 5 consultas para identificar factores de riesgo prenatales.
- La ruptura prematura de membranas es uno de los principales factor de riesgo para desarrollar sepsis neonatal.
- Los recién nacidos prematuros y de bajo peso, representan el grupo de pacientes con mayor riesgo para que se presenten sepsis neonatal.
- La proteína C reactiva es el parámetro de laboratorio más confiable para valorar a los recién nacidos con sospecha de la sepsis neonatal. Sin embargo, ésta proteína es inespecífica, por elevarse con la presencia de cualquier proceso inflamatorio.
- La prueba de DGGE identifica a un número mayor de microorganismos causantes de sepsis neonatal en comparación con el cultivo de sangre.

CAPITULO 11. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson MR, Blumer JL: Advances in the therapy for sepsis in children. *Pediatr Clin North Am* 1997; 44:179-205.
2. Despond O, Proulx F, Carcillo JA, et al: Pediatric sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13:247-253.
3. Hazelzet JA, Risseeuw-Appel IM, Kornelisse RF, et al: Age-related differences in outcome and severity of DIC in children with septic shock and purpura. *Thromb Haemost* 1996; 76:932-938.
4. Martinot A, Leclerc F, Cremer R, et al: Sepsis in neonates and children: definitions, epidemiology, and outcome. *Pediatr Emerg Care* 1997; 13:277-281.
5. Bonsu BK, Chb M, Harper MB: Identifying febrile young infants with bacteremia: is the peripheral white blood cell count an accurate screen?. *Ann Emerg Med* 2003; 42:216-225.
6. Brown DR, Kutler D, Rai B, Chan T, Cohen M. Perinatal/neonatal clinical presentation: bacterial concentration and blood volume required for a positive blood cultura. *J Perinatol* 1995; 15:157-9.
7. Heron M. Deaths: leading causes for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 2007;56:1-95.
8. López JB, Pérez D. Definiciones de sepsis neonatal: un largo camino por recorrer. *An Pediatr. (Barc)* 2006; (65): 525–28.
9. Franz AR, Bauer K, Schalk A y col. The determination combined of the interleucina 8 and the protein C reactivates reduces the antibiotic unnecessary treatment of the neonatos: randomized, controlled and multicentral test. *Pediatrics* 2004; 58 (1): 40-47.
10. López Sastre J, Coto Cotallo GD, Ramos Aparicio A, Fernández Colomer B. Reflexiones en torno a la infección en el recién nacido. *An Esp Pediatr.* 2002;56:493-6.
11. López J I, Botell M, Valdespino L M. Algunos factores maternos relacionados con el bajo peso al nacer . *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2004 Ene-Abr;30(1).
12. Kimberli DW. Herpes simplex virus infections in the newborn. *Semin Perinatol* 2007;31:19-25.
13. Mancilla RJ, Arredondo GJL, Vannier E, Dinarello CA. Interleucina-1, Interleucina-6 y Factor de Necrosis Tumoral en sepsis neonatal. *Perinatol Reprod Hum* 1996;10:230-7.
14. Baker CJ, Kasper DL. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 1976;294:753-6.

- 15.- Okascharoen C, Sirinavin S, Thakkestian A, Kitayaporn D, Supapanachart S. A bedside Prediction-Scoring Model for Late-onset Neonatal Sepsis. *Journal of Perinatology* 2005; 25:778-783.
16. Pantell RH, Newman TB, Bernzweig J, et al. Management and outcomes of care of fever in early infancy. *JAMA* 2004;291:1203-12.
17. Byington CL, Emriquez FR, Hoff C, et al. Serious bacterial infections in febrile infants 1 to 90 days old with and without viral infections. *Pediatrics* 2004;113:1662-6.
18. Fanaroff A, Martin RJ. Neonatal-perinatal medicine, diseases of the fetus and infant. 8th ed. St Louis: Mosby;2006.
19. Carcillo J, Han K, Lin J et al. Goal-directed management of pediatric shock in the emergency department. *Clin Pediatr Emerg Med* 2007:165-75.
20. Carcillo JA, Fields AI. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:1365-78.
21. Mahieu L, De Muyenck AO, De Dooy JJ, Laroche SM, Van Acker KJ. Prediction of nosocomial sepsis in neonates by means of a computer-weighted bedside scoring system (NOSEP score). *Crit Care Med* 2000;28:2026-33.
22. Reyna FJ, Briseño VR, Ortíz FJ. Validación de la escala NOSEP-1 para el diagnóstico de sepsis nosocomial en recién nacidos prematuros menores de 1500 g. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 2005; 62:321-328.
23. Normas y Procedimientos en neonatología 2003. Instituto nacional de Perinatología. Pj 197.
24. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger P. ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992; 101:1644-55.
25. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions of sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6:2-8.
26. Onderdonk AB, Lee ML, Lieberman E, Delaney ML, Tuomala RE. Quantitative microbiologic models for the preterm delivery. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3):1073-9.
27. Brown DR, Kutler D, Rai B, Chan T, Cohen M. Perinatal/neonatal clinical presentation: bacterial concentration and blood volume required for a positive blood culture. *J Perinatol* 1995; 15:157-9.
28. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol* 1990; 3:269-79.

29. Kellog JA, Ferrentino MH, Goodstein MH, Liss SL, Shapiro SL, Bankert DA. Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatr Infect Dis* 1997; 16:381-5.
30. Pakcheungng PC Ng. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004; 89:F229-F235.
31. Da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. Accuracy of leucocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:362-66.
32. Ehl S, Gering B, Bartmann P, Hôgel J, Pohlandt F. C-Reactive Protein is a Useful Marker for Guiding Duration of Antibiotic Therapy in Suspected Neonatal Bacterial Infection. *Pediatrics* 1997; 99:216-21.
33. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nungent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis* 2002; 186:1770-80.
34. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger periodontitis. *J Dent res* 2003; 82(5):338-44.
35. Siqueira JF Jr. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod* 2003; 29:619-23.
36. Cai SP, Kan YW. Identification of the multiple beta-thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1990; 85:550-53.
37. Gordon A, Jeffery HE. Antibiotic regimens for suspected late onset sepsis in newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD004501.
38. Brown JC, Burns JL, Cummings P. Ampicillin use in infant fever: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002;156:27-32.
39. Robinson DT, Kumar P, Cadichon SB. Neonatal Sepsis in the Emergency Department. *Clin Ped Emerg Med* 2008;9:160-168
40. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644–55.
41. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Reichman B, Lerner L, et al. Epidemiology and risk factors for early onset sepsis among very-low-birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:38.e1-6.
42. Salem SY, Sheiner E, Zmora E, Vardi H, Shoham-Vardi I, Mazor M. Risk factors for early neonatal sepsis. *Arch Gynecol Obstet* 2006;274:198-202.

43. Koenig JM, Christensen RD. Incidence, neutrophil kinetics, and natural history of neonatal neutropenia associated with maternal hypertension. *N Engl J Med* 1989;321:557-62.
44. Procianoy RS, Silveira RC, Mussi MM, Souza LM, Leone CR, Lopes JM, et al. Sepsis and Neutropenia in Very Low Birth Weight Infants Delivered of Mothers with Preeclampsia. *J Pediatr* 2010;90:1-5.
45. Miesnik S, Reale B. A review of issues surrounding medically elective cesarean delivery. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2007;36:605–15.
46. Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. Births: preliminary data for 2005. Hyattsville (MD): National Center for Health Statistics;2006.
47. Bettes BA, Coleman VH, Zinberg S. Cesarean delivery on maternal request. *Obstet Gynecol* 2007;109:57–66.
48. Yancey MK, Duff P, Kubilis P, Clark P, Frentzen BH. Risk Factors for Neonatal Sepsis. *Obstet Gynecol* 1996;87:188-94.
49. Seale AC, Mwaniki M, Newton Ch, Berkley J. Maternal and early onset neonatal bacterial sepsis: burden and strategies for prevention in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* 2009;9:428–38.
50. Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.
51. Robunsin DT, Kumar P, Cadichon SB. Neonatal Sepsis in the Emergency Department. *Clin Ped Emerg Med* 9:160-168.
52. Laving AM, Musoke RN, Wasunna AO, Revathi G. Neonatal bacterial meningitis at the newborn unit of Kenyatta National Hospital. *East Afr Med J* 2003; 80: 456–62.
53. Bomela HN, Ballot DE, Cooper PA. Is prophylaxis of early onset group B streptococcal disease appropriate for South Africa? *S Afr Med J* 2001; 91: 858–60.
54. Ben Hamida Nouaili E, Harouni M, Chaouachi S, Sfar R, Marrakchi Z. Early onset neonatal bacterial infections: a retrospective series of 144 cases. *Tunis Med* 2008; 86: 136–39.
55. Oddie S, Embleton ND. Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis; case-control study. *BMJ* 2002;325: 308.
56. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002;51:1-22.
57. Herbst A, Kallen K. Time between membrane rupture and delivery and septicemia in term neonates. *Obstet Gynecol* 2007;110:612-8.

58. Banks BA, Cnaan A, Morgan MA, Parer JT, Merrill JD, Ballard PL, et al. Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. North American Thyrotropin-Releasing Hormone Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:709-17.
59. Elimian A, Verma U, Visintainer P, Tejani N. Effectiveness of multidose antenatal steroids. *Obstet Gynecol* 2000;95:34-6.
- 60.- Soman M, Green B, Daling J. Risk factors for early neonatal sepsis. *Am J Epidemiol* 1985;121:712-9.
61. López S, Coto C, Fernandez C. Neonatal sepsis of vertical transmission: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo". *J Perinat Med* 2000;28:309-15.
62. Procianoy RS, Silveira RC, Mussi MM, Souza RL, Leone CR, Lopes JM, et al. Sepsis and Neutropenia in very Low Birth Weight Infants Delivered of Mothers with Preeclampsia. *J Pediatr* 2010;1097:4-16.
63. Doron MW, Makhlof RA, Katz VL, Lawson EE, Stiles AD. Increased incidence of sepsis at birth in neutropenic infants of mothers with preeclampsia. *J Pediatr* 1994;125:452-8.
64. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979;95:89-98.
65. Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Sepsis Neonatal Temprana. Nicaragua 2006:1-22.
66. Da Silva O, Ohlsson A. How accurate are leucocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis? *Paediatr Child Health* 1998;3:158-9.
67. González OM, De la O Vizcarra M, Garibay GF. Identificación de marcadores hematológicos para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana, en el Hospital Militar Regional de Irapuato. Gto. *Rev Sanod Milit* 2006;60:390-396.
68. Somech R, Zakuth V, Assia A, et al: Procalcitonin correlates with C-reactive protein as an acute-phase reactant in pediatric patients. *Isr Med Assoc J* 2000; 2:147-150
69. Mathers NJ, Pohlandt F. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. *Eur J Pediatr* 1987;146:147-51.
70. Doller H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: Comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors andvsoluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol* 2001;54:1251-1257.

ANEXO 1: RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS

En el Departamento de Neonatología se contó con los insumos necesarios para la obtención de la sangre neonatal.

En el Departamento de Infectología e Inmunología se contó con los reactivos y el equipo necesario para el desarrollo total del estudio mediante. Se recibió apoyo parcial otorgado por el INPerIER mediante el registro provisional *PR080413* del protocolo titulado *“Identificación de las bacterias patógenas comúnmente asociadas a la sepsis neonatal mediante la amplificación de la región variable del 16s rDNA en combinación con la electroforesis en geles desnaturalizantes”* otorgado a HFH.