



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO RESPINOSA DE LOS REYES**

**Identificación de patógenos bacterianos en recién
nacidos con sepsis mediante la amplificación del
gene 16S rDNA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

ESPECIALISTA EN NEONATOLOGÍA

P R E S E N T A

GABRIEL GONZALEZ GUEVARA

DIRECTOR DE TESIS

M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA



México, D.F.

2014



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

TÍTULO DE LA TESIS "Identificación de patógenos bacterianos en recién nacidos con sepsis mediante la amplificación del gene 16S rDNA"



DR RODRIGO AYALA YAÑEZ

DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR LUIS ALBERTO FERNANDEZ CARROCERA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN NEONATOLOGÍA



M. EN C. HÉCTOR FLORES HERRERA

TUTOR DE TESIS / INV. EN CIENCIAS MÉDICAS

INDICE

Pagina de titulo.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Objetivos e hipótesis.....	13
Material y métodos.....	14
Resultados	18
Conclusiones.....	21
Referencia.....	24
Tablas y figuras.....	29
Pies de figuras	36
Apéndice.....	37

**Identificación de patógenos bacterianos en recién nacidos con sepsis mediante la
amplificación del gene 16S rDNA**

González-Guevara G ¹., Flores-Herrera H ²

¹ Médico Residente de la Especialidad de Neonatología,

² Investigador en ciencias médicas; departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Correspondencia:

Gabriel González Guevara, MR.

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, cp 11000

México D.F

Correo electrónico:

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: Detectar a seis bacterias comúnmente asociadas con el desarrollo de la sepsis neonatal mediante la amplificación del gene 16S rDNA.

Material y Métodos: Las muestras de sangre neonatal fueron obtenidas por punción de la vena en dos grupos de estudio: con sospecha (n=6) y con evidencias clínicas de sepsis (n=6). El hemocultivo fue analizado para la detección 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: En los casos con sospecha de sepsis, el hemocultivo no detectó el desarrollo de bacterias patógenas en tanto que la prueba de PCR-DGGE detectó a *Ureaplasma urealyticum* (33.3% n=2), *Streptococcus* del grupo B (83.3%, n=5), *Prevotella melaninogenicus* (83.3%, n=5) y *Gardnerella vaginalis* (33.3%, n=2).

Aisló en el 21% y 7% de los casos, a una bacteria y dos bacterias respectivamente. Las bacterias que se identificaron fueron *Estafilococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. La bacteria que tuvo una mayor frecuencia de aislamiento en el hemocultivo fue *Escherichia coli* 6.89% (dos pacientes). En relación con el método molecular obtuvimos en los 6 casos con sepsis neonatal temprana se logro el amplificado con un tamaño esperado de 233 pares de bases que corresponde con el dominio-3 del 16S rDNA. Sin embargo, al evaluar el corrimiento electroforético en gradiente observamos ninguna banda que pudiéramos asociar con alguna bacteria patógena.

Conclusiones: El hemocultivo corroboró en el 21% de los casos el proceso de sepsis; sin embargo, la prueba molecular PCR-DGGE no logró corroborar en ninguno de los 12 casos el proceso de infección. La baja sensibilidad del análisis molecular de PCR-DGGE puede deberse al prolongado almacenamiento de las muestras antes de su análisis electroforético. En éste sentido proponemos nuevas condiciones para el manejo del DNA bacteriano.

Palabras Clave: Sepsis Neonatal Temprana; Hemocultivo; Gene 16S rDNA; Electroforesis en Gradiente Desnaturizante.

ABSTRACT

Introduction: Neonatal sepsis is the leading cause attributed to morbidity and mortality in newborns. Approximately 20% of births with clinical evidence of infection have received antimicrobial treatments with negative blood cultures. An alternative in these cases amplification is the ribosomal subunit 16S rDNA in combination with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The PCR - DGGE identified cultivable and non-cultivable bacteria in various biological samples.

Objective: To detect six bacteria commonly associated with the development of neonatal sepsis by amplifying the 16S rDNA gene.

Material and Methods: The neonatal blood samples were obtained by venipuncture into two study groups: suspected (n = 6) and clinical evidence of sepsis (n = 6). The blood culture was analyzed for the detection of gram- positive and gram- negative bacteria. The bacterial DNA was isolated from 50 μ l of blood using DNAzol reagent. Denaturing gels were prepared with urea and formamide in the range of 20-70%. Electrophoresis was run at 60°C and 60V for 16 hours, then the gels were stained with SYBR -DNA. The bands were visualized by ultraviolet light.

Results: In patients with suspected sepsis, blood culture detected the growth of pathogenic bacteria while the PCR - DGGE test detected *Ureaplasma urealyticum* (33.3%, n = 2), *Streptococcus* group B (83.3%, n = 5), *Prevotella melaninogenicus* (83.3%, n = 5) and *Gardnerella vaginalis* (33.3%, n = 2). Was isolated in 21% and 7% of cases, one bacteria and two bacteria respectively. The bacteria identified were *Estafilococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. The bacteria had a higher frequency of isolation in *Escherichia coli* blood culture was 6.89% (two patients). Regarding the molecular method obtained in the 6 patients with early neonatal sepsis we achieve the expected size amplified a 233 bp which corresponds to the domain -3 16S rDNA. However, when assessing the electrophoretic shift gradient observe any band that we could associate with some pathogenic bacteria.

Conclusions: The blood culture confirmed in 21% of cases the process of sepsis, however, the molecular test PCR - DGGE failed to substantiate in any of the 12 cases the infection process. The low sensitivity of molecular PCR - DGGE analysis may be due to long term storage of samples prior to their electrophoretic analysis. In this sense, we propose new conditions for the management of bacterial DNA.

Keywords: Early Neonatal Sepsis, Blood culture, 16S rDNA Gene, Denaturing Gradient Electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

La sepsis neonatal, es una patología que se presenta en los recién nacidos vivos, su prevalencia a nivel mundial se ha estimado en aproximadamente el 1.0% del total de los nacimientos. Sin embargo, los riesgos de morbilidad y mortalidad son hasta del 50% de los casos reportados por infección [1], con hasta 1 millón de muertes a nivel mundial (si ocurre dentro de las primeras 4 semanas)[38]. En países en vías de desarrollo la incidencia de sepsis neonatal oscila entre el 2 al 8% [2]. En el Instituto Nacional de Perinatología, la prevalencia en los últimos 5 años es del 2.3% del total de los ingresos a las unidades de cuidados neonatales [7]. Y con una tasa de ataque tan variable que se estima en desde <1% hasta <35% dependiendo edad gestacional; asociada a choque séptico hasta en 71% de los recién nacidos con peso extremadamente bajo [38].

Las manifestaciones clínicas de la sepsis pueden ser diversas y con frecuencia inespecíficas siendo las más frecuentes la respiración irregular, taquipnea, fases de apnea, distensión abdominal, taquicardia, distermias, alteraciones metabólicas, vómitos y diarrea; sin embargo en algunos de los casos éstas manifestaciones pueden ser similares a algunas condiciones transitorias propias en el período neonatal [1,2]. La identificación de sepsis en algunos neonatos se complica ya que existen casos denominados subclínicos, en los cuales no es evidente la manifestación clínica y ésta es fluctuante por lo que su intervención es después de varios días.

La sepsis en el neonato es adquirida por 1) el entorno nosocomial y 2) verticalmente por infecciones maternas.

La sepsis nosocomial es producida por microorganismos procedentes del entorno hospitalario, y su sintomatología aparece después de 72 horas a su ingreso. La colonización del neonato se produce por contacto del personal médico, familiar o a partir del material utilizado en los procedimientos invasivos durante su tratamiento. La tasa de mortalidad a nivel mundial oscila

entre el 10 al 15 % y se ha reportado el aislamiento de bacterias gram-negativas hasta el 37.6% [39] (*E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) y hongos (*Candida* spp) [2] y bacterias Gram-positivas hasta el 52.1% desde el año 2000 [39].

La sepsis vertical, es producida por infecciones maternas del tracto cérvico vaginal las cuales infectan al producto por dos rutas. La primera se da de manera ascendente al colonizar a las membranas fetales, originando patologías obstétricas como la corioamnionitis y la ruptura prematura de las membranas fetales. Al vulneran la respuesta inmunológica de las membranas fetales, las bacterias invaden el líquido amniótico y pueden contactar directamente al producto produciendo infecciones fetales [2,13,14]. La segunda ruta de infección, es al momento del nacimiento cuando el producto pasa por el canal cérvico vaginal [2].

La sepsis neonatal se complican en aquellos neonatos prematuros (< 37 semanas) y con bajo peso al nacer (<1500 gramos) lo que predispone a diversas afecciones como meningitis e infecciones del sistema nervioso central, deficiencia respiratoria y neumonía [8-14].

Existen criterios para determinar si existe un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica como lo muestran Wynn y Wong con 2 de 4 criterios en los cuales al menos 1 debe ser la alteración de la temperatura o cuenta leucocitaria (leucocitosis, leucopenia o bandemia), el resto son Taquicardia-bradicardia y frecuencia respiratoria y/o necesidad de ventilación mecánica, siendo estos mismos autores quienes agregan al cuadro neonatal la proteína C reactiva >10 como parte de los criterios diagnósticos en 2010 además de contar con cultivo positivo o reacción en cadena de polimerasa.

Factores de riesgo para sepsis neonatal

Entre los factores maternos que predisponen a la sepsis se encuentran la edad materna mayor de 30 años, falta de control prenatal adecuado, ruptura prematura de membranas de mas de 6 horas, liquido amniótico meconial o

fétido, corioamnionitis, trabajo de parto pretermino, colonización recto vaginal por *Streptococo del grupo B*, infección de vías urinarias, fiebre intraparto, múltiples esquemas de esteroides prenatales o tocolítics, monitorización interna prolongada [39].

Los factores perinatales son recién nacidos menores de 37 semanas, peso menor de 2500 g, APGAR menor de 5 a los 5 minutos, reanimación avanzada, masculino.

El hemocultivo para el diagnóstico de la sepsis neonatal.

La identificación de las bacterias patógenas, causantes de las infecciones se realiza mediante el hemocultivo. Esta metodología requiere de dos condiciones para el desarrollo y crecimiento de las bacterias. La primera, está en relación con la viabilidad de las bacterias para que se desarrollen en condiciones *in vitro* y se requiere que la muestra contenga la cantidad mínima necesaria de unidades formadoras de colonias (UFC) para que se observe un crecimiento. Se ha determinado que en condiciones óptimas se requieren de aproximadamente 10 000 UFC para ser detectadas mediante el cultivo bacteriológico [15]. La segunda condición, está determinada por los requerimientos diferenciales del medio de cultivo (nutrientes esenciales y pH óptimo) y las condiciones de incubación (temperatura, presión de CO₂) las cuales están desarrolladas y dirigidas para cada tipo de bacteria. Del total de las muestras analizadas se ha estimado que aproximadamente el 40% son positivas. Otro porcentaje dan resultados falsos negativos; es decir, aunque estén presentes las bacterias no se observa su crecimiento. Finalmente, el cultivo bacteriológico, no logra analizar el contenido total de las bacterias que pudieran ser de interés para el entendimiento etiológico de la enfermedad [15,16]. Sensibilidad estimada de 50%, con cultivos positivos a las 48 h, media de tiempo positivo a 21 h, con Gram-negativas a las 11 h, y Gram-positivas a las 24 h [40]

La sangre, es la muestra biológica por la cual se analiza y se confirma si en el neonato están presentes las bacterias patógenas. A diferencia del volumen que obtienen de los adultos, en los neonatos no es posible extraer más de 1 mL de sangre y se ha estimado en éste un contenido de aproximadamente 500 UFC. Esta situación reduce considerablemente la sensibilidad para la detección de las bacterias por el cultivo bacteriológico [4,16].

Otros análisis

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) así como otras metodologías basadas en la secuenciación microbiana están comenzando a ser aplicadas en la clínica para la detección de enfermedades infecciosas de interés humano [17-18].

La cuenta leucocitaria tiene una baja sensibilidad del 29% y especificidad de 91%, la cuenta puede ser normal al inicio y alterarse en 4-12 h posteriores.

La proteína C reactiva es liberada 4 a 6 h posterior al estímulo con pico de 24 a 48 h posteriormente con disminución, es útil si se realiza seriada con al menos dos mediciones de 12 a 24 h de diferencia, cuenta con una sensibilidad de 70-93%, especificidad 41 a 98%, valor predictivo positivo de 6 a 83%, valor predictivo negativo 97 a 99%.

La procalcitonina tiene una vida media de 25-30 h con niveles posteriores al nacimiento de hasta 0.7 ng/mL y posterior a 24 h hasta 0.2 ng/mL[41]

El método molecular para el diagnóstico de la sepsis neonatal.

A diferencia del hemocultivo, la amplificación del DNA (PCR) no requiere de grandes cantidades de muestra a analizar; de hecho en condiciones ideales, la PCR puede amplificar a partir de una sola copia del DNA blanco, lo que la favorece para ser empleada como herramienta de diagnóstico [17,18]. El uso de la PCR, ha identificado en la sangre de neonatos, al virus del herpes simplex el cual ha sido asociado con el desarrollo de la meningitis [18-20].

Esta técnica, ofrece mejor sensibilidad con respecto al hemocultivo, es confiable y el resultado se da en seis horas desde la obtención de la muestra [5,8,21,22]. Una de las limitantes de este tipo de PCR es que están dirigidos contra una bacteria en particular, por lo que en los casos de sepsis no se realiza la exploración completa de las bacterias involucradas en el desarrollo de la sepsis neonatal.

Recientemente se tienen iniciadores bacterianos, para la amplificación de la región pequeña del gene 16S ribosomal (16S rDNA). El 16S rDNA, está presente en todas las bacterias, es altamente conservado y tiene secuencias definidas lo que permite diferenciarlas entre cada especie de bacteria [6,23-28].

Ohlin y colaboradores (2008) mediante el 16S rDNA identificaron en el 41 % de las muestras sanguíneas neonatales la presencia simultáneamente de dos bacterias como fue el caso de *Staphylococcus coagulasa-negativo* en combinación con *S. aureus*, *Acinetobacter iwoffii*, *Enterococcus faecalis* y en uno de los casos se identificó a *E. coli* en combinación con *S. aureus*; estas asociaciones no fueron detectadas por el cultivo bacteriológico [6]. Recientemente se han identificado a *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus vestibularis*, *Corynebacterium jeikeium*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus gallinarum*, *Capnocytophaga ochracea*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter freundii* las cuales no han sido detectadas por el cultivo bacteriológico [26,29].

El hemocultivo no ha identificado a *S. marcescens*, la cual es causante de diversas afecciones como: neumonía, conjuntivitis, infecciones del tracto urinario y del sistema nervioso central y está asociada con la morbilidad y mortandad en los neonatos [30,31].

Para establecer la identidad de las bacterias, la amplificación de la región 16S rDNA puede combinarse con diversas estrategias como son la

clonación, secuenciación así como de una electroforesis en gradientes de desnaturalización (DGGE) [32].

Análisis del DNA bacteriano mediante el DGGE.

La electroforesis en gradientes desnaturalizantes separa diferentes tamaños de amplificación del DNA mediante la adición de urea y formamida en un rango de 0 a 100% de concentración. El DNA de las bacterias al migrar por la matriz desnaturalizante se irán rompiendo los enlaces débiles de hidrógeno del DNA que se forman entre las bases nitrogenadas (Adenina-Timina y Citosina-Guanina). Entre más cantidades de CG estén contenidas en la secuencia del 16S rDNA, se requerirá de mayor concentración de urea-formamida para abrir la cadena de DNA por lo que esta migrará más en la matriz [32].

La PCR-DGGE, ha permitido identificar diversas bacterias que son difíciles de cultivar como es el caso de: *Atopobium vaginae*, *Eggertella*, *Bacteroides fragilis*, *Faecalibacterium prauznitzii*, *Tanerella forsythensis*, *Deferribacter Butyrivibrio*, *fibrisolvens*, *Slackia exigua* y *Prevotella bivia* [33-37].

En el presente trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Detectar a las bacterias involucradas con el desarrollo de la sepsis neonatal mediante la amplificación del gene 16S rDNA.

3.2. Objetivos particulares

1. Detectar a *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus* del grupo B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Gardnerella vaginalis* en casos con sospecha de sepsis neonatal mediante la amplificación por PCR-DGGE.
1. Detectar a *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus* del grupo B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Gardnerella vaginalis* en casos con sepsis neonatal mediante la amplificación por PCR-DGGE.
2. Analizar y comparar mediante un cuadro descriptivo el resultado obtenido entre el hemocultivo y el análisis molecular de PCR-DGGE del 16S rDNA.

HIPÓTESIS

La prueba molecular del 16S rDNA detectará más casos de sepsis neonatal con respecto al hemocultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras.

0.5 mililitros de sangre periférica fue colectada en tubos MicroTainer que contienen EDTA (Becton-Dickerson) de neonatos de neonatos que presentaron evidencias clínicas de sepsis indicada por la presencia clínica considerando las siguientes variables descritas por Polin (2012).

- **Hipotermia:** temperatura axilar $<36^{\circ}\text{C}$
- **Fiebre:** Temperatura axilar $>37.5^{\circ}\text{C}$
- **Taquicardia:** frecuencia cardiaca >160 latidos/min
- **Bradycardia:** frecuencia cardiaca <100 latidos/min
- **Taquipnea:** frecuencia respiratoria >60 respiraciones/min
- **Quejido:** sonido espiratorio audible
- **Distensión abdominal:** incremento del perímetro abdominal en 2 cm
- **Residuo gástrico:** $>20\%$ del volumen alimenticio aspirado antes de la alimentación, al menos en 2 ocasiones en 24 horas
- **Retracción torácica:** visualización de las costillas en cada inspiración.
- **Letargia:** dificultad persistente en despertarse, sin medicación sedativa.
- **Neutrofilia:** valor total de neutrófilos $>14,500/\text{mm}^3$
- **Neutropenia:** valor total de neutrófilos $<7,500/\text{mm}^3$
- **Trombocitopenia:** valor total de plaquetas $<100,000/\text{mm}^3$ en menores de 10 días y $<150,000/\text{mm}^3$ en las 3 semanas siguientes.

Las muestras de sangre fueron tomadas antes de haber iniciado cualquier tratamiento terapéutico. Los tubos que contienen las muestras fueron rotulados con el número del registro materno asignado por el INPer. La toma de la sangre se realizó con la previa autorización y firma de consentimiento informado de la madre (anexo 1) y de acuerdo al protocolo autorizado por los comités de investigación y ética con número de registro 212250-3210101 (anexo 2).

Se determinó que el cálculo de pacientes admitidos para éste estudio fue de 60 (EPI-Info2000) teniéndose los siguientes criterios de selección.

Inclusión: de acuerdo a los criterios establecidos para evaluar el desarrollo clínico de infección se asignarán dos grupos 1) aquellos casos con sospecha de sepsis; y 2) aquellos casos con signos y síntomas evidentes de sepsis neonatal.

Criterios de no inclusión: aquellos neonatos que hayan iniciado el tratamiento antimicrobiano correspondiente.

Criterios de exclusión: cuando no se tenga en el historial clínico el resultado de hemocultivo.

Variable(s) independientes: las diferentes cepas que son comúnmente asociadas con el desarrollo de la sepsis neonatal *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus* del grupo B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Gardnerella vaginalis*

Variable(s) dependientes: sepsis neonatal definida como la presencia de los signos y síntomas (ver apartado *obtención de las muestras*).

La sangre (0.5 mL) fue analizada mediante la prueba molecular de PCR-DGGE en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular del INPer la cual se describe a continuación.

Extracción del DNA.

La sangre fue mezclada con un mililitro del reactivo de DNAzol (InvitroGene) el procedimiento se realizó con las recomendaciones del fabricante que consistió en mezclar vigorosamente la mezcla por 3 minutos y posteriormente fue centrifugada a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y el DNA fue resuspendido y lavado con 500 μ L de etanol (100%) y centrifugado nuevamente. El lavado se repitió dos veces más con 500 μ L de etanol (75%). Finalmente el DNA fue resuspendido con 50 μ L de hidroxido de amonio (8.0 mM) y se almacenó a -20°C hasta su amplificación.

Amplificación de la región variable del 16S rDNA

Para la amplificación por PCR de la subunidad 16S rDNA se usó la región variable (V3) que comprende la posición nucleotídica 341 a 534 con la siguiente secuencia de los iniciadores desarrollados por Muyzer y colaboradores (1999) los cuales son para el Forward (3'- 5') GCG CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG y para el Reverse (3' [Símbolo] 5') ATT ACC GCG GCT GCT GG [32].

La mezcla de la reacción se llevó a cabo en tubos Eppendorf para PCR de 0.2 mL en un termociclador (Techne touchgene gradient). Cada tubo de PCR contiene la mezcla de reacción amortiguador (InvitroGene), 2 mM de MgCl₂, 0.8 mM de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) 40 pmol de iniciadores, 5U de Taq DNA polimerasa recombinante (InvitroGene) y agua de Milli-Q (Millipore) toda la reacción a un volumen de 25.0 µL. Las condiciones de PCR fueron desnaturalización 92°C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de (desnaturalización 92°C por 45 segundos, alineamiento 55°C por 30 segundos, amplificación 72°C por 45 segundos) y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Al termino de la PCR se toman 5 µL de cada una de las reacciones de amplificado del DNA y se visualizan en geles de agarosa al 1.0% con las condiciones de corrimiento antes descritas. Se detectó la banda esperada la cual presenta un peso molecular de aproximadamente 233 pares de bases la cual es la esperada para la región V3 del 16S rDNA. El resto del amplificado 20 µL fue utilizado para su corrimiento electroforético en DGGE.

Identificación de las bacterias mediante la movilidad electroforética en geles desnaturalización (DGGE).

La preparación de los geles de acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad) al 8.0% con gradientes desnaturalizantes se realizó de acuerdo a las recomendaciones previamente descritas por Burton y Reid (2002) para el sistema de detección universal D-Code (BioRad). La mezcla desnaturalizante se preparó en un rango de 20 a 70 % partiendo de una solución concentrada 100 % (7 M de urea y 40 % de

formamida). La polimerización de los geles se realiza con la adición de 13 [Símbolo]L de N,N,N',N'-tetramethylethylenediamina (TEMED, Sigma) y 50 [Símbolo]L de persulfato de amonio (Sigma).

En cada uno de los pozos formados del gel se adicionó 20 μ L de DNA amplificado el cual estará previamente mezclado con 6 μ L de amortiguador de corrimiento (250 μ L de azul de bromofenol; 7.0 mL de glicerol y 2.5 mL de agua Milli-Q). Los geles se corrieron en la cámara de D-Code a 60 V con TBE (1x) como amortiguador a temperatura constante de 60°C por 16 horas. Al término de este tiempo, los geles fueron teñidos con el reactivo de vistra-green a dilución de 1:1000 (Amersham Bioscience) en amortiguador de TBE (1x) y se incubó a temperatura ambiente y en agitación por 1 hora. Las bandas se visualizon en un transiluminador con luz ultravioleta y las imágenes fueron capturadas en un fotodocumetador (Gel Doc 2000. Bio-Rad). La identificación presuntiva de las bacterias de las muestra se realizó con respecto a la movilidad del marcador de referencia de las diferentes bacterias usadas.

RESULTADOS

Características clínicas de los neonatos de estudio.

Durante el periodo de Marzo a Diciembre de 2013 se obtuvieron un total de 20 muestras de las cuales se extrajo el DNA bacteriano y se reviso el expediente clínico. Se eliminaron 8 muestras por no contar con el resultado de hemocultivo.

La tabla 1 presenta las características clínicas de los 12 neonatos que corresponden al grupo sin (n=6) y con evidencias clínicas de sepsis (n=6).

El sexo de los recién nacidos correspondió al 58.3 % niñas y el 41.6 % niños (tabla 1). El peso al nacer (p=0.323), la edad gestacional (p=0.443), el APGAR medido a los 5 minutos (p=0.24), y la cuantificación de la proteína C-reactiva (p=0.510) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (tabla 1).

Las madres de dos casos presentaron ruptura de membranas fetales y el cultivo bacteriológico identifió fue positivo para *Gardnerella vaginalis* (16.7 %; n=1) y *Cándida albicans* (16.7 %; n=1).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en el grupo con evidencias clínicas de sepsis fueron: taquicardia (50.0 %), fiebre (10.34 %) y taquipnea (34.48 %) incremento de leucopenia (24.13 %), bacteriemia (13.79 %) y neutrofilia (3.44 %) y la proteína de fase aguda C-reactiva (24.13 %). Las madres de dos casos presentaron ruptura prematura de las membranas fetales y fueron positivas para el aislamiento de *Streptococcus* del grupo B (33.3%; n=2).

En todos los casos se inicio el esquema antimicrobiano de acuerdo a las normas de operatividad Institucionales. A los Doce neonatos se les administró ampicilina (Beta lactámico) en combinación con Amikacina (aminoglucocido).

Detección de las bacterias en los neonatos de estudio.

La tabla 2 muestra el porcentaje de pacientes sin (n=6) y con evidencias de sepsis neonatal (n=6) en los cuales se les detectó bacterias patógenas mediante el hemocultivo y por el análisis molecular del 16S rDNA.

Hemocultivo.

En los neonatos con evidencias sugestivas de sepsis neonatal no se detectó en ninguno de los casos el crecimiento de bacterias asociadas al proceso infeccioso; sin embargo, en el grupo con evidencias clínicas de sepsis se encontró el crecimiento de *Streptococcus bovis* (16.7%) y *Staphylococcus epidermis* (16.7 %; Tabla 3).

16S rDNA.

La figura 1 muestra el amplificado de la región variable del 16S rDNA el cual corresponde a un tamaño molecular de 233 pares de bases.

Antes de iniciar la identificación de las bacterias en las muestras de sangre se estimó el índice de corrimiento electroforético de las bacterias tipo. La Figura 2 muestra el corrimiento diferencial de 6 bacterias comúnmente asociadas a la ruptura prematura de las membranas fetales y activación del trabajo de parto.

Con estos valores se prosiguió a obtener el perfil de los amplificados de los neonatos a la electroforesis en gradiente (20-70%) desnaturalizante (DGGE) para la identificación presuntiva de las bacterias de acuerdo a su movilidad electroforética.

Movilidad electroforética de las muestras de neonatos.

Mediante la PCR-DGGE se detectó que en el grupo de evidencias sugestivas de sepsis, la presencia de *Ureaplasma urealyticum* (33.3 %), *Streptococcus* del grupo B (83.3 %), *Escherichia coli* (83.3 %), *Listeria monocytogenes* (16.7 %), *Enterococcus faecalis* (16.7 %) y *Gardnerella vaginalis* (33.3 %). Los microorganismos con mayor frecuencia fueron *Streptococcus* del grupo B (n=4),

Escherichia coli (n=5), *Ureaplasma urealyticum* (n=2) y *Gardnerella vaginalis* (n=2), *Listeria monocytogenes* (n=1) y *Enterococcus faecium* (n=1; tabla 4).

En el grupo con evidencias de sepsis, la presencia de *Ureaplasma urealyticum* (66.7 %), *Streptococcus* del grupo B (100 %), *Escherichia coli* (50.0 %), *Enterococcus faecium* (33.3 %). Los microorganismos con mayor frecuencia fueron *Ureaplasma urealyticum* (n=5), *Streptococcus* del grupo B (n=6), *Escherichia coli* (n=3), *Gardnerella vaginalis* y *Enterococcus faecium* (n=1; tabla 4).

Las bandas en los dos grupos están ubicadas principalmente entre el gradiente de 52 y 54% (figura 3). Para el grupo de sospecha de sepsis fueron un total de 22 bandas que no correspondieron con el marcador de movilidad. En el grupo con evidencias de sepsis fueron un total de 15 las cuales no correspondieron con la movilidad del marcador de las cepas tipo.

CONCLUSIONES

A pesar de que se tienen diferentes parámetros que sugieren el desarrollo clínico de sepsis neonatal ésta no logra ser corroborada mediante el hemocultivo el cual ha demostrado un bajo porcentaje de detección. Nuestros resultados demuestran que solamente el 16.7 % de los doce casos fueron positivos mediante el hemocultivo detectándose a *Streptococcus bovis* y *Staphylococcus epidermis* (tabla 3).

Streptococcus bovis es una bacteria que habita en los intestinos de muchos rumiantes; pero también es parte de la flora intestinal humana. Esta bacteria no causa problemas a no ser que haya algunos defectos de la salud de la persona para provocar infección por este microorganismo. Se transmite al ser humano a partir de las heces, agua y alimentos de origen alimentario. Muchos de los individuos diagnosticados con infecciones sistémicas por *S. bovis* tienen una concomitante lesión maligna del colon. Actualmente no existen reportes que indiquen la colonización neonatal por esta bacteria. Lee y colaboradores (2013) reportaron mediante la secuencia del 16S rDNA la identificación de *S. bovis* en muestras de sangre con una prevalencia menor al 1%. El hemocultivo identifico a esta bacteria en un paciente de las doce muestras (tabla 3). *S. bovis* es de la familia de los *Streptococcus* y es posible que pueda ser identificada molecularmente mediante su movilidad electroforética.

S. epidermis es una especie bacteriana del género *Staphylococcus*, consistente en cocos Gram-positivos. Se presenta frecuentemente en la piel de humanos. Por lo que probablemente la detección de esta bacteria pudiera deberse a una manipulación de la toma de la muestra o por el procedimiento para su identificación en el hemocultivo. En la prueba molecular de PCR-DGGE, esta bacteria no fue incluida como marcador de movilidad por lo que en trabajos posteriores se sugiere que sea usada como prueba de identificación.

Mediante la amplificación del dominio-3 del gene 16S rDNA en combinación con la electroforesis en gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE) encontramos en las 12 muestras 65 patrones diferentes de bacterias/bandas de las cuales fueron identificadas 28 las cuales correspondieron a *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus* del grupo B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Gardnerella vaginalis* (tabla 4).

En el grupo con evidencias de sepsis, la presencia de *Ureaplasma urealyticum* (66.7 %), *Streptococcus* del grupo B (100 %), *Escherichia coli* (50.0 %) y *Enterococcus faecalis* (33.3 %). Los microorganismos con mayor frecuencia fueron *Ureaplasma urealyticum* (n=4), *Streptococcus* del grupo B (n=6), *Escherichia coli* (n=3; tabla 4).

Con respecto a las bandas que no fueron identificadas mediante el corrimiento electroforético, las hemos cortado y mandado para su secuenciación lo que nos permitirá identificarlas mediante el análisis de filogenia.

La PCR-DGGE identifico bacterias en los neonatos en los cuales la madre presentó ruptura prematura de las membranas fetales en las cuales se identifico a *Gardnerella vaginalis* y *Streptococcus* del grupo B (datos no mostrados) en el paciente 2, 6, 11 y 12 (tabla 4).

En conclusión, en este estudio demostramos que el hemocultivo es la prueba estándar de identificación sus resultados deberán estar apoyados mediante el desarrollo de pruebas moleculares como la PCR-DGGE que permitan tener una mejor identificación de los casos con sospecha de sepsis neonatal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrollo con fondos federales al mediante el proyecto institucional con número de registro 212250-3210101 otorgado a HFH (Anexo 2).

REFERENCIAS

1. Wegman ME. Annual summary of vital statistics 1992. *Pediatrics* 1993; 92:743-54
2. Cotallo-Coto GD, Ibáñez-Fernández A. Protocolo de diagnóstico-terapéutico de la sepsis neonatal. *Bio. Pediatr* 2006; 46:125-34.
3. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol* 1990; 3:269-79.
4. 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; 16:381-85.
5. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2574-78.
6. Ohlin A, Backman A, Bjorkqvist M, Molling P, Jurstrand M, Schollin J. Real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal bacteraemia. *Acta Paediatrica* 2008; 2:1-5.
7. Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinoza de los Reyes". Anuario Estadístico 2003-2008.
8. Natarajan G, Johnson YR, Zhang F, Chen KM, Worsham MJ. Real-time polymerase chain reaction for the rapid detection on group B streptococcal colonization in neonates. *Pediatrics* 2006; 118(1):14-22.
9. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: A continuing story. *Seminar in Fetal and Neonatal Med* 2006; 11:354-62.
10. Sarkar S, Bhagat I, DeCristofaro JD, Wiswell TE, Spitzer AR. A study of the role of multiple site blood cultures in the evaluation of neonatal sepsis. *J Perinatol* 2006; 26:18-22.

11. Kafetsiz DA, Skevaki CL, Skouteri V, Gavrili S, Peppas K, Kostalos C, Petrochilou V, Michalakis S. Maternal genital colonization with *Ureaplasma urealyticum* promotes preterm delivery: association of the respiratory colonization of preterm infants with chronic lung diseases and increased mortality. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1113-22.
12. Jaffe RI, Lane JD, Albury SV, Niemeyer DM. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3407-12.
13. Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. *Infectious diseases of the fetus and newborn*. Philadelphia, W.B. Saunders 2001, pp 943-98.
14. Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and role of preventive strategies. *Semin Neonatol* 2002; 7:259-74.
15. Onderdonk AB, Lee ML, Lieberman E, Delaney ML, Tuomala RE. Quantitative microbiologic models for the preterm delivery. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3):1073-79.
16. 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; 15:157-59.
17. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(5):299-05
18. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(4):238-45
19. Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections in the newborn. *Semin Perinatol* 2007; 31:19-25.
20. Kimberlin DW. Diagnosis of herpes simplex virus in the era of polymerase chain reaction. *Pediatric Infect Dis J*. 2006; 25(9):841-842.

21. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994; 32:335-51.
22. Ehrlinch GD, Greenberg SJ. PCR-based diagnostics in infectious disease. Boston, Blackwell Scientific Publications. 1994
23. Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatrica* 1997; 86:1097-99
24. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:247-53.
25. McCabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, McCabe ER. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences. Automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics* 1995; 95:165-69.
26. Quian Q, Tang YW, Kolbert CP, Torgerson CA, Hughes JG, Vetter EA, Harmsen WS, Montgomery SO, Cockerill FR, Persing DH. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: Evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3578-82.
28. Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, Quinn TC. Detection of bacteremia in emergency department patient at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2002; 186:1677-81.
29. Zhang Y., Isaacman DJ., Wadowsky RM., Rydquist-White J., Post JC., Ehrlinch GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3):596-01.

30. Maragakis LL, Winkler A, Tucker MG, Cosgrove SE, Ross T, Lawson E, Carrol KC, Pearl PM. Outbreak of multidrug resistant *Serratia marcescens* infections in a neonatal intensive care unit. *Infect Cont Hosp Epid* 2008; 29(5):418-23.
31. Bizarro MJ, Dembry LM, Baltimore RS, Gallagher PG. Case-control analysis of endemic *Serratia marcescens* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Fetal Neonatal* 2007;92:120-26.
32. Muyzer G, De Wall E, Uitterlinder A. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(3):695-700.
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. Burton JP, Devialrd E, Cadieux PA, Hammond JA, Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods waeants further investigation. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4):1829-31.
35. Balamurugan R, Janardhan HP, George S, Raghava MV, Muliylil J, Ramakrishna BS. Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 46(5):514-9
36. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with choronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82(5):338-44
37. Fredricks DN, Marrazzo JM. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infec Dis.* 1999; 29:475-88.
38. Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *Clin Perinatol.* 2010 37(2): 439-79

39. Martin GS, Mannino, D.M.; Eaton, S.; Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*. 348:(16): 1546 - 1554
40. Sánchez Luna, Manuel y Franco Ma. Shock neonatal. *Protocolos diagnóstico terapéuticos de la AEP*. 2008 56: 535-45
41. Gerdes JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatrics Clin North Am*. 2004 51(4):939-59

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Características clínicas

	SEPSIS N=12		<i>p</i> -valor
	Sospecha de Sepsis n=6	Sepsis n=6	
Sexo			
<i>masculino</i> n (%)	3 (50.0)	3 (50.0)	
<i>femenino</i> n(%)	3 (50.0)	2 (33.3)	
Peso (gramos) ^a	1961.3 ± 389.0	1461.2 ± 283.7	0.323
Edad (semana gestacional) ^b	34.2 ± 1.9	31.9 ± 2.2	0.443
APGAR a los 5 minutos mayor de 6	8.6 ± 0.3	6.0 ± 1.5	0.24
Manifestaciones clínicas n, (%)	1.0 (16.7)	5 (31.2)	0.1
Proteína de fase aguda C-reactiva mayor de 6	157120 ± 48395	1126000 ± 42626	0.510

^{a,b} los valores se presentan en media ± error estándar.

Tabla 2 Comparación entre el hemocultivo y el método molecular del 16S rDNA.

	SEPSIS N=12	
	Sospecha de Sepsis n=6	Sepsis n=6
Hemocultivo positivo, <i>n</i> (%)	0 (0.0)	2 (33.3)
16S rDNA positivo, <i>n</i> (%)	6 (100.0)	6 (100.0)

Subunidad ribosomal 16S DNA (16S rDNA), número de casos (*n*), porcentaje (%).

Tabla 3. Comparación entre el cultivo bacteriológico y el 16S rDNA de los 12 casos con sepsis neonatal.

Diagnóstico	Número de Neonato	Identificación por hemocultivo	Número de bandas detectadas por el 16S Rdna
Sospecha sepsis	1	CBN	4
Sospecha sepsis	2	CBN	5
Sospecha sepsis	3	CBN	3
Sospecha sepsis	4	CBN	12
Sospecha sepsis	5	CBN	6
Sospecha sepsis	6	CBN	6
Sepsis	7	CBN	5
Sepsis	8	CBN	3
Sepsis	9	CBN	5
Sepsis	10	<i>Streptococcus bovis</i>	6
Sepsis	11	<i>Staphylococcus epidermis</i>	4
Sepsis	12	CBN	5

Crecimiento Bacteriológico Negativo (CBN).

Tabla 4. Identificación de los microorganismos por medio del DGGE en el grupo de sospecha y sepsis neonatal

Neonato	Bacterias identificadas por corrimiento						Bandas no identificadas
Sugestivo de sepsis	Uu	SGB	Ec	Lm	Ef	Gv	
1	0	1	0	0	0	0	3
2	0	0	1	0	0	1	2
3	0	1	1	0	0	0	2
4	0	1	1	1	0	1	8
5	1	1	1	0	1	0	3
6	1	1	1	0	0	0	3
Sepsis							
1	1	1	1	0	0	0	2
2	0	1	0	0	0	0	2
3	1	1	1	0	0	1	2
4	1	1	0	0	1	1	4
5	0	1	1	0	0	0	2
6	1	1	0	0	0	0	3

Ureaplasma urealyticum (Uu), *Streptococcus* del grupo B (SGB), *Escherichia coli* (Ec), *Listeria monocytogenes* (Lm), *Enterococcus faecalis* (Ef), y *Gardnerella vaginalis* (Gv). Bacteria identificada (1), ausente (0).

FIGURA 1

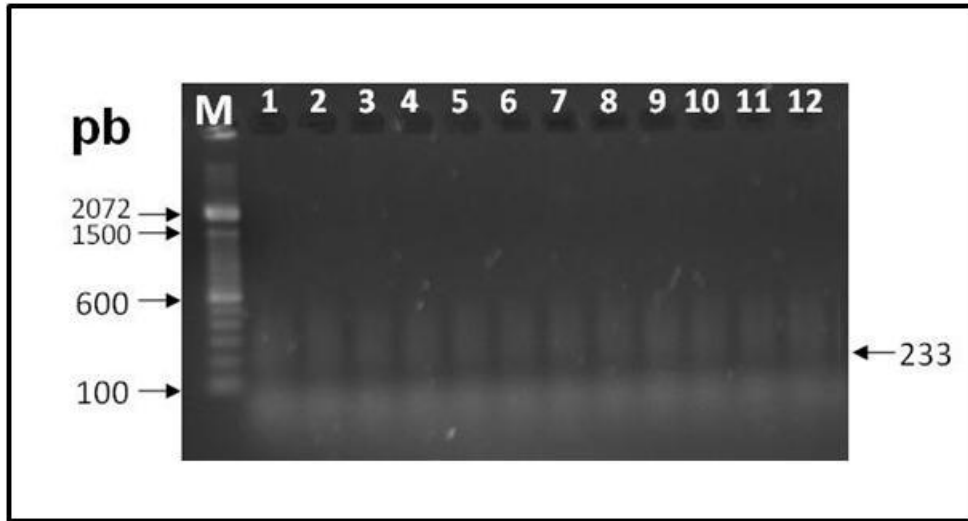


FIGURA 2

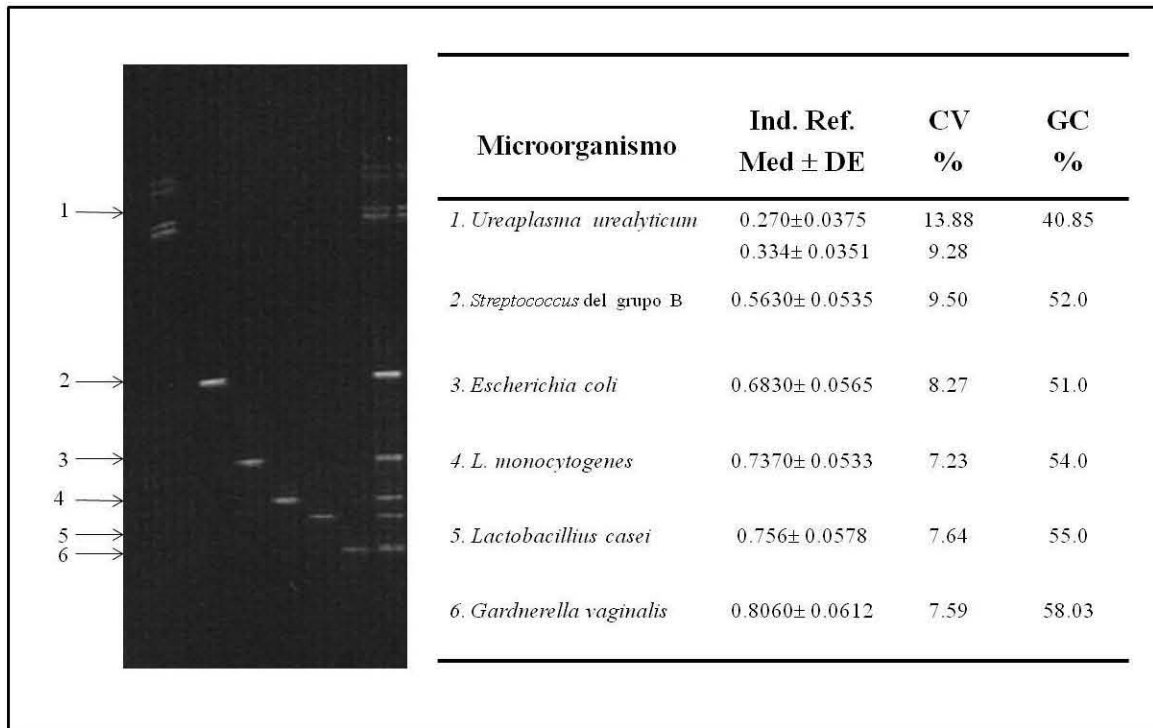
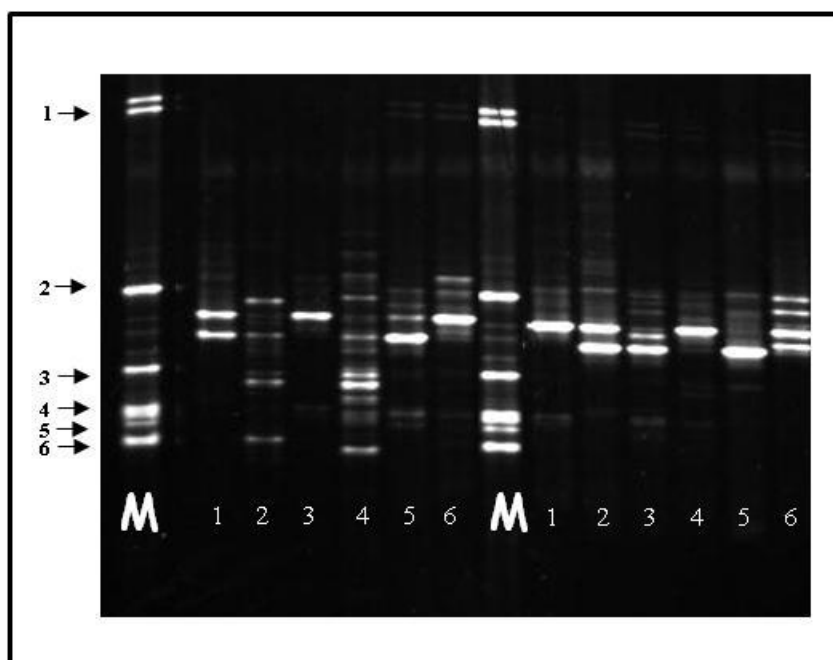


FIGURA 3



PIES DE FIGURAS

Figura 1 Amplificación del dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S rDNA de las muestras de sangre neonatal. Marcador (M) de peso molecular de 100 pares de bases (pb), neonatos sin (carril 1-6) y con evidencias clínicas de sepsis (7-12). La flecha indica el tamaño de 233 pares de bases que corresponde con al dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S rDNA.

Figura 2 El gel de PCR-DGGE (20-70 %). La imagen indica el corrimiento electroforético de las bacterias de 6 bacterias tipo: 1) *Ureaplasma urealyticum*, 2) Streptococcus del grupo B, 3) *Escherichia coli*, 4) *Listeria monocytogenes*, 5)

Prevotella ascccharolyticum, 4) *Escherichia coli*, 5) *Listeria monocytogenes*, 6) *Gardnerella vaginalis*. Coeficiente de variación (CV %), porcentaje de guaninas y citosina (GC %; tabla).

Figura 3 Amplificación del dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S Rdna de las muestras de sangre neonatal. Marcador (M) de peso molecular de 100 pares de bases (pb), neonatos sin (carril 1-6) y con evidencias clínicas de sepsis (7-12). La flecha indica el tamaño de 233 pares de bases que corresponde con al dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S rDNA.

ANEXO 1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SOLICITUD DE EVALUACIÓN Y REGISTRO DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

TEXTO DECLARATORIO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

Quisiéramos informarle que en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PATOGENAS COMUNMENTE ASOCIADAS A LA SEPSIS NEONATAL MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DEL 16S rDNA EN COMBINACIÓN CON LA ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES.

La infección neonatal presenta fiebre, decaimiento físico y falta de apetito las cuales son producidas por diferentes bacterias.

El principal objetivo de este estudio es detectar en la sangre de su bebe a las bacterias causantes de la infección.

El estudio consiste en

1. Al momento en que a su hijo(a) se manifieste la sintomatología de infección se le limpiará la zona del antebrazo de su bebe para la toma de una muestra de sangre, la cual será realizado por el personal médico responsable y no representa ningún riesgo para su bebe.
2. La muestra será analizada en el departamento infectología e inmunología y en el departamento de la subdirección biomédica de este Instituto. La sangre únicamente será usada para la detección de las bacterias que están causando los síntomas de infección en su bebe.
3. La detección de las bacterias causantes de la infección permitirá proporcionarle una mejor atención terapéutica a su bebe.

Su participación en este estudio permitiría contribuir en forma importante a la identificación de las bacterias causantes de la infección en su bebé. Nos permitimos invitarla a usted a participar en

este

estudio, aclarándole que en caso de que usted no acepta participar, **no tendrá ninguna repercusión** en

la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto, ni en el costo de la atención médica que ambos reciban.

Uno de los beneficios es que este estudio no producirá **ningún costo adicional**, así mismo, le informamos

que a usted no se le pagará por la participación de su bebe en el estudio.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será usada sólo para fines

de investigación, así mismo le informamos que nunca serán utilizados con fines diferentes para la que han

sido proporcionados.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con el

M en C. C Héctor Flores Herrera al teléfono 55 20 99 00 Ext 346 de Lunes a Viernes de 8:00 a

4:00 pm. También en será atendida vía correo electrónico en la dirección floresh8@yahoo.com

YO _____

(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho.

En el caso que yo decida retirarlo, deberán seguir las siguientes indicaciones:

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D.F. a _____ de _____ de _____.

NOMBRE

FIRMA

PARTICIPANTE

REPRESENTANTE

INVESTIGADOR

TESTIGO

TESTIGO

ANEXO 2 CARTA DE ACEPTACIÓN INSTITUCIONAL



Instituto Nacional de Perinatología
Isidro Espinosa de los Reyes

Dirección General

México, D.F., a 5 de diciembre de 2013

"2013, Año de la Lealtad Institucional y
Centenario del Ejército Mexicano"

2013.1000 - 000905

M. en C. Héctor Flores Herrera
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Departamento de Inmunobiología
Presente.

Me es grato informar a usted y a su grupo de colaboradores que el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación han revisado y emitido el dictamen correspondiente a su proyecto:

Identificación de las bacterias patógenas comúnmente asociadas a la sepsis neonatal mediante la amplificación de la región variable 16S rDNA en combinación con la electroforesis en geles desnaturalizantes

ACEPTADO

Registro: 212250-3210101

En cuanto al monto económico solicitado por usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos fiscales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los recursos entregados por agencias financiadoras externas.

Me permito hacer de su conocimiento que, durante el desarrollo de este proyecto, usted deberá entregar informes trimestrales y al concluir el mismo un **informe técnico final**, según el formato institucional disponible en: www.inper.mx/investigacion.html, para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un atento saludo.

Atentamente,


DR. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ
DIRECTOR GENERAL

c.c.p.- Dr. Arturo Cébulo Vázquez.- Director de Investigación
C.P. Gabriel Vázquez Sierra.- Jefe del Departamento de Contabilidad
y Responsable de la Unidad Contable de Proyectos, INPer


ACV/phg

Montes Urales 800, Lomas Virreyes, México, DF 11000; Tel. (55) 5520 8565; Fax (55) 55201593; dirgral@inper.mx

ANEXO 3. RECURSOS HUMANOS

Director de la Tesis: M en C. HECTOR FLORES HERRERA

- Revisión del protocolo de investigación.
- Seminario de investigación
- Obtención del DNA bacteriano, amplificación del gene 16S rDNA
- Análisis de los resultados obtenidos por PCR-DGGE

Tesista: Gabriel González Guevara

- Identificación de los casos con sepsis neonatal
- Obtención de la sangre de los recién nacidos
- Seminarios de investigación
- Revisión de los expedientes clínicos
- Amplificación del gene 16S rDNA
- Elaboración del protocolo