



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL DE LA MUJER, SSA**

**IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE
SEPSIS NEONATAL POR PIROSECUENCIACIÓN
EN EL HOSPITAL DE LA MUJER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN

NEONATOLOGÍA

P R E S E N T A

José Alberto Ordaz Quintero

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. Javier Mancilla Ramírez**



Hospital de la Mujer

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Hospital de la Mujer

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL DE LA MUJER, SECRETARÍA DE SALUD

T E S I S

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE SEPSIS NEONATAL

POR PIROSECUENCIACIÓN EN EL HOSPITAL DE LA MUJER

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO NEONATÓLOGO

P R E S E N T A

José Alberto Ordaz Quintero

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Javier Mancilla Ramírez

CIUDAD DE MÉXICO, 2019

Dr. Benjamín Orozco Zúñiga
Subdirector Médico del Hospital de la Mujer

Dra. Martha Patricia Morales Morales
Jefa de la División de Enseñanza e Investigación

Dr. Roberto Arizmendi Villanueva
Profesor Titular del Curso de Posgrado en
Neonatología

Dr. Javier Mancilla Ramírez
Jefe de Investigación Clínica
Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mis abuelos y hermana por apoyarme en estos años.

Al Dr. Javier Mancilla Ramirez y la Dra. Norma Galindo Sevilla, por concederme la oportunidad de ser parte de este proyecto.

A todos los adscritos del servicio de neonatología del hospital de la mujer, a quienes agradezco todas las enseñanzas, conocimientos y experiencias que me han compartido en estos dos años de residencia.

A mis compañeras/amigas de residencia, Natalia Jimenez, Karinne Jiron, Kenia Zambrana, por el apoyo incondicional que me brindaron durante la residencia.

A Fabian Sarabia por brindarme motivación y apoyo para concluir este proyecto.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
4. JUSTIFICACION	11
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
7. HIPÓTESIS	14
8. OBJETIVOS	14
9. MATERIAL Y MÉTODOS	15
10. ASPECTOS ÉTICOS	19
11. RESULTADOS	20
12. DISCUSIÓN	30
13. CONCLUSIONES	31
14. BIBLIOGRAFÍA	32
15. ANEXOS	35

1. RESUMEN

Introducción. La sepsis es la principal causa de muerte de neonatos críticamente enfermos. El diagnóstico se inicia con sospecha clínica que busca confirmarse con hemocultivo y pruebas complementarias. Sin embargo, solo 30% de los casos o incluso menos, se confirman con esta prueba, con un resultado entre las 48 a 72 horas después de su toma. Actualmente se cuenta con técnicas de biología molecular como la PCR y la técnica de pirosecuenciación que permiten un resultado en tiempo menor, pero que deben de ser evaluados a profundidad.

Objetivo. Demostrar la utilidad de la pirosecuenciación para detectar agentes causantes de sepsis neonatal

Material y métodos. Estudio observacional, longitudinal, descriptivo, no probabilístico en neonatos de 0 a 28 días de edad, en donde se incluyeron 80 recién nacidos en el hospital de la mujer que presentaron sospecha de infección. Se extrajo DNA a partir de 0.2 ml de de sangre heparinizada, se amplificó con cebadores para una región en el RNA ribosomal (rRNA) de la subunidad 16S y se obtuvo la secuencia de lo amplificado con el pirosecuenciador Q24 (Qiagen). Los resultados se expresaron en porcentaje de identificación y se compararon con la prueba estándar de oro (hemocultivo). Para el análisis de variables cualitativas, se utilizó la prueba de Fisher.

Resultados. El promedio de edad gestacional de los 80 RN fue de 33 SDG (27-41). En esta población, solo 5 hemocultivos fueron positivos, en tanto que en pirosecuenciación se obtuvieron 23 muestras positivas. El análisis de los resultados de pirosecuenciación y la concordancia clínica reveló una P en 0.1777, IC 95% S 82% y E 35%, VPP 33% VPN 83%. Los hemocultivos presentaron una P 0.14000, S 40% y E 26%, VPP 3%, VPN 86%. En la detección de agentes bacterianos en pirosecuenciación vs hemocultivos se encontró una P 0.0003, S. 28% E. 93%, VPP 82%, VPN 56%.

Discusión y Conclusiones. En este estudio la utilidad de los hemocultivos en el diagnóstico de casos de choque sepsis neonatal fue baja y la pirosecuenciación no presentó significancia estadística para la detección de agentes bacterianos en pacientes con datos clínicos de choque séptico. Sin embargo, se identificó por pirosecuenciación en varias muestras *Streptococcus* sp relacionadas con neumonías, que no llegaron a choque séptico, debido probablemente a un control oportuno del microorganismo con el tratamiento que se inició desde la presentación de los síntomas.

2. INTRODUCCIÓN

La sepsis es la principal causa de muerte en los recién nacidos (RN) críticamente enfermos, sobre todo en los países de vías de desarrollo. El diagnóstico de sepsis en los RN sepsis es un reto, ya que los datos clínicos muchas veces son inespecíficos y pueden avanzar rápidamente a estadios complicados, cuando no se recibe un tratamiento oportuno. Para su diagnóstico es necesaria la sospecha clínica e idealmente confirmarse con cultivos de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo además de pruebas complementarias como la biometría hemática y biomarcadores como la procalcitonina y proteína C reactiva. Los hemocultivos se han catalogado como la *prueba de oro*; sin embargo, en los neonatos los resultados positivos se presentan en un número muy bajo y el inconveniente mayor es que el tiempo de espera para la emisión del resultado es muy largo. Si bien no existe un biomarcador ideal para confirmar o descartar el diagnóstico de sepsis neonatal, ante una sospecha clínica y con base en la historia clínica y los datos sugestivos de infección, el médico no puede esperar resultados para iniciar el tratamiento antimicrobiano. Actualmente se cuenta con técnicas de biología molecular como la PCR y la técnica de pirosecuenciación, capaces de detectar una amplia gama de enfermedades infecciosas, incluyendo las causadas por bacterias, levaduras, virus y protozoarios, teniendo su resultado en un menor tiempo al tradicional requerido por los hemocultivos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Sepsis neonatal

La sepsis neonatal es un problema de salud pública, corresponde a la principal causa de complicaciones y fallecimientos en las unidades de cuidado intensivo neonatales (UCIN). Se define como un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) en la presencia de sepsis o en la fase de sospecha de infección, siempre dentro del primer mes de vida extrauterina.¹ Según el momento de inicio, se ha clasificado en formas temprana y tardía; la primera cuando acontece dentro de las primeras 72 horas de nacimiento y se asocia a infecciones verticales maternas o adquiridas durante el nacimiento. La segunda cuando sucede posterior a las 72 horas de vida y se asocia con agentes infecciosos intrahospitalarios y con el uso de líneas vasculares, ventilación asistida, procedimientos quirúrgicos y tratamientos antimicrobianos previos, entre otros factores.²

3.2. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en todo el mundo fallecen casi 5 millones de RN cada año y que 98% sucede en países en desarrollo. Las infecciones neonatales causan alrededor de 1.6 millones de muertes, en su mayoría debidas a sepsis y meningitis.^{4,5}

Las tasas de incidencia de sepsis neonatal son muy variables. Se han reportado tasas de sepsis que varían de 7.1 a 38 por cada 1000 nacidos vivos en Asia; de

6.5 a 23 en África; de 3.5 a 8.9 en Sudamérica y el Caribe.³ Esto contrasta con lo reportado en Estados Unidos de América (EUA) con tasa de 1.5 a 3.5 en sepsis temprana y de 6 en sepsis tardía.³ En los países en vías de desarrollo la tasa de sepsis neonatal es de 2.2 a 8.6.⁴ En México, la sepsis neonatal bacteriana es la segunda causa de muerte (12.3%), principalmente en RN de uno a seis días de vida. Se ha reportado una tasa de incidencia de 4 a 15.4 en nuestro país.⁶

3.3. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo para la aparición de sepsis neonatal son parto prematuro, colonización materna por *Streptococcus agalactiae*, ruptura de membranas mayor a 18 horas y datos de corioamnionitis materna. Otras variables incluyen etnia, baja el nivel socioeconómico, el sexo masculino y puntuaciones bajas de Apgar. Los RN presentan mayor riesgo de infecciones debido, entre otras condiciones, a su inmadurez inmunológica. Diversos factores maternos, ambientales y del RN determinan que los neonatos expuestos a un microorganismo potencialmente patógeno desarrollen infecciones graves.⁷ También contribuyen las deficiencias inmunológicas cuantitativas y cualitativas, así como la inmunidad celular y humoral que en los RN no está completamente desarrollada (actividad fagocítica, la síntesis de inmunoglobulinas, la actividad del complemento o la función de los linfocitos T2). Durante el período intrauterino no existe ningún estímulo inmunológico sobresaliente que active reacciones inmunitarias preventivas.⁸ Se ha observado que los más afectados son los RN prematuros o de muy bajo peso al nacimiento, afectando la sepsis neonatal a 19

de cada mil RN prematuros. Las alteraciones inmunitarias están relacionadas con la edad gestacional; mientras mayor sea el grado de prematuridad, mayor es la inmadurez inmunológica y, por ende, aumenta el riesgo de infección grave. La transferencia placentaria materna de IgG al feto se intensifica a partir de las 32 semanas de gestación.^{7,8} El RN depende por lo tanto de anticuerpos maternos pasivamente adquiridos, los cuales son transmitidos por vía transplacentaria desde las 24 a 26 semanas de gestación. Por lo tanto, los RN prematuros tienen menores concentraciones de anticuerpos IgG que los RN a término, lo cual los hacen más susceptibles a las infecciones.⁸

3.4. Etiología de la sepsis neonatal

Los patógenos que causan sepsis neonatal en los países desarrollados difieren de los aislados en los países en desarrollo. *Staphylococcus epidermidis* coagulasa negativo (SCN) representa más de 50% de las bacterias aisladas en EUA y en muchos hospitales en todo el mundo.⁹ Algunos reportes recientes describen “un aumento y una caída” de la frecuencia de SCN, sugiriendo que muchos cultivos positivos de presuntos SCN pueden deberse a episodios de contaminación o colonización de una línea vascular central, posibilidad que debe considerarse en el desarrollo de manejos útiles para la sepsis en el neonato.¹⁰

En los países del tercer mundo, la etiología es principalmente por bacterias gramnegativas como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Salmonella*, seguido de organismos grampositivos como *Staphylococcus epidermidis*,

Streptococcus agalactiae, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.¹¹

En México, es más común aislar *Staphylococcus* o enterobacterias como *Escherichia coli* en sepsis temprana. En cambio, *Staphylococcus aureus* y SCN, seguidos de diversas enterobacterias, son los agentes causales más frecuentemente aislados en la sepsis tardía.¹²

3.5. Presentación clínica

Las manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal son diversas y con frecuencia inespecíficas. Las más frecuentes son síntomas digestivos, como rechazo a las tomas, vómitos, diarrea, distensión abdominal, hepatomegalia, ictericia; síntomas respiratorios, quejido, respiración irregular, taquipnea, cianosis, fases de apnea; signos neurológicos, apatía o irritabilidad, hipotonía o hipertonía, temblores o convulsiones, fontanela tensa; signos cardiocirculatorios, palidez, pulso débil, relleno capilar lento, distermia y alteraciones metabólicas. Hasta 90% de los RN con sepsis tiene al menos un síntoma y más de 90% de los RN sépticos presenta síntomas en las primeras 24 horas de vida; el resto los presentan antes de las 48 horas. Por lo tanto, la observación durante este tiempo es clave en el diagnóstico y en la decisión de tratamiento antimicrobiano. En la sepsis neonatal temprana las manifestaciones clínicas tienden a ser de aparición abrupta con falla multisistémica, dificultad respiratoria severa, cianosis y apnea, mientras que la sepsis neonatal tardía es subaguda, insidiosa y presenta características como deterioro en el estado hemodinámico, ventilatorio y metabólico, desaceleraciones

en la frecuencia cardíaca, la necesidad de aumentar parámetros ventilatorios cuando el RN se encuentra con asistencia respiratoria mecánica o de reiniciar la ventilación mecánica en caso de haberse suspendido.¹³

3.6. Diagnóstico de sepsis neonatal

Para el diagnóstico de sepsis neonatal se debe realizar historia clínica completa, exploración física y pruebas complementarias. No existe en la actualidad ningún marcador analítico que confirme o descarte con seguridad la infección en el neonato y el clínico no tiene la opción de esperar a los resultados de los cultivos de sangre y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) para iniciar el tratamiento antibiótico. Esto ha conducido al uso de distintas combinaciones de pruebas diagnósticas, con resultados muy dispares. Un indicador diagnóstico de sepsis neonatal debería, por un lado permitir un diagnóstico precoz de forma sensible y específica para diferenciar entre una causa infecciosa y una inflamación de etiología no infecciosa y, por otro lado, tener un valor predictivo positivo o negativo alto.¹⁴

Los hemocultivos se han catalogado como la “prueba de oro” para el diagnóstico de sepsis. En tanto que para cualquier grupo etario la presencia de dos hemocultivos positivos hace el diagnóstico, en pediatría y en especial en neonatología, los resultados positivos llegan apenas a 30%.¹⁵ Los factores que se han podido identificar como causa incluyen una terapia con antibióticos en el momento de la toma de muestra en el paciente, antibióticos en la madre, cantidad de sangre insuficiente para la prueba o un mal procesamiento de la muestra. En

ocasiones, el número de casos con alta sospecha de sepsis, pero con cultivos negativos, rebasa el número de casos probados.¹⁵ Además tienen el inconveniente de requerir un tiempo relativamente largo para obtener un resultado, que puede variar entre 24 a 72 horas y que se requiere aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias para que sean detectadas mediante el cultivo bacteriológico.¹⁶

Por estas razones se requieren de metodologías que permitan análisis rápidos, precisos y de alta sensibilidad que ayuden a los neonatólogos y a médicos responsables, lograr una evaluación oportuna y un mejor tratamiento de casos clínicos y subclínicos de sepsis neonatal. Resultados en menos de 12 horas y con menor cantidad de muestra se están buscando a través de técnicas de biología molecular, en donde las técnicas de amplificación de secuencias específicas de DNA (PCR) o mRNA (rtPCR) permiten detectar pocos microorganismos en una muestra, antes del tiempo tradicional de resolución de la identificación por hemocultivo.¹⁷

La mayor parte del trabajo de secuenciación de ADN realizado hasta el momento ha empleado la técnica de secuenciación de ADN de Sanger desarrollada originalmente hace 27 años. Aunque esta técnica ha pasado por importantes desarrollos técnicos para reducir el costo y aumentar la velocidad en tres órdenes de magnitud. Se han propuesto varias técnicas nuevas. Estas incluyen secuenciación-hibridación, microarreglos, técnicas de detección de molécula única, secuenciación de resonancia molecular, FRET dependiente de enzimas para la secuenciación de ADN de una sola molécula, secuenciación de nanoporos

de una sola molécula, matrices de molécula única y pirosecuenciación. Entre todas las técnicas mencionadas, sólo la pirosecuenciación y la secuenciación Sanger se han utilizado para la secuenciación de novo.¹⁸

3.7. Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de ADN en tiempo real catalizado por 4 enzimas cinéticamente equilibradas: ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. Estas enzimas crean 4 reacciones enzimáticas en un solo tubo para controlar la síntesis de ADN. Se agregan nucleótidos de forma consecutiva y en caso de incorporación, se libera pirofosfato inorgánico (PPi). La liberación de PPi desencadena la reacción de ATP sulfurilasa, convirtiendo el PPi en ATP. La luciferasa detecta el ATP, produciendo luz. La apirasa degrada los nucleótidos sin reaccionar y el ATP generado, lo que permite la adición repetitiva de dNTP a la solución.¹⁹

La luz generada por la luciferasa es detectada y registrada por un sistema detector en forma de señales pico, la cual es proporcional a la cantidad de ADN y al número de nucleótidos incorporados y se representa en señales precisas y cuantitativas. Esta característica ha permitido la secuenciación cuantitativa de ADN, que actualmente se utiliza en diferentes aplicaciones.¹¹ Entre ellas se encuentra la secuenciación de tipo microbiano. Esta técnica, está teniendo una amplia utilidad en el área de la microbiología en donde se utiliza para clasificar, identificar y subtipificar una amplia variedad de fragmentos del RNA ribosomal 16S (16S rRNA) bacteriano.²⁰

La amplificación de regiones del gen de la 16S rRNA y su posterior secuenciación han sido muy utilizadas para el diagnóstico de la sepsis neonatal en otros países, reportando una sensibilidad de 100% y una especificidad de 95.6% en comparación con los hemocultivos con sensibilidad de 69.2% y especificidad de 100%.²¹

El laboratorio de microbiología molecular del “Texas Children's Hospital” implementó la pirosecuenciación de ADN de rutina con el fin de identificar aislados refractarios a la identificación bioquímica.²² La identificación basada en la pirosecuenciación del ADN, unida a los resultados del cultivo y los resultados bioquímicos, proporcionó un enfoque sólido para una identificación más precisa de los patógenos bacterianos. Un estudio realizado en dicho hospital incluyó un total de 414 aislamientos de pacientes evaluados durante un período de 31 meses desde diciembre de 2003 a julio de 2006. Al integrar la secuenciación del ADN de los patógenos bacterianos con los métodos microbiológicos convencionales, los aislados que carecían de una identificación definitiva mediante pruebas bioquímicas, lograron la identificación de especies bacterianas en el 90% de los casos, demostrando que el aislamiento por cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas junto con la identificación bacteriana basada en la pirosecuenciación del ADN, es una herramienta valiosa que mejoró notablemente la identificación de patógenos bacterianos para los centros hospitalarios neonatales.^{22,23,24}

4. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de sepsis neonatal es por hemocultivo, pero tiene la desventaja de tener una baja sensibilidad y de requerir un tiempo relativamente largo para obtener un resultado preciso, que puede ir de 24 a 72 horas. Su confiabilidad no es buena, debido a la gran cantidad de microorganismos que son de difícil crecimiento.

Resultados en menos de 12 horas y con menor cantidad de muestra se están buscando a través de técnicas de biología molecular, en donde las técnicas de amplificación de secuencias específicas de DNA permiten detectar pocos microorganismos en una muestra, antes del tiempo tradicional de resolución de la identificación por hemocultivo.

La técnica de PCR amplifica regiones blanco en el genoma bacteriano, principalmente regiones del rRNA de la subunidad 16S del ribosoma (16S rRNA), un gen que se encuentra conservado en bacterias y se utiliza como blanco de iniciadores universales. La amplificación de regiones variables puede ser utilizada en ensayos específicos para determinar género o especie. Las regiones amplificadas son entonces sujetas a otros tipos de metodología como la secuenciación o hibridación

La amplificación de regiones del gen de la 16S rRNA y su posterior secuenciación han sido muy utilizadas para el diagnóstico de la sepsis neonatal en otros países, reportando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95% cuando se ha comparado con el hemocultivo.

Por estas razones, la identificación en un corto tiempo y con una alta sensibilidad de agentes causales de sepsis neonatal con la técnica de pirosecuenciación sería una herramienta valiosa, los RN enfermos se beneficiarían con la detección oportuna del agente causal al administrar los antibióticos específicos para el agente detectado, evitando tratamientos antimicrobianos innecesarios, disminuyendo resistencias bacterianas, optimizando los tratamientos, disminuyendo los días de hospitalización por sepsis, así como reduciendo sus complicaciones a corto y largo plazo y disminuyendo la mortalidad por este padecimiento.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sepsis neonatal es una causa importante de morbimortalidad, representa el 30% de los ingresos a UCIN y en países de vías de desarrollo se estima que fallecen 1.6 millones de RN por este padecimiento, proporción que la clasifica como una epidemia. Uno de los principales problemas es la detección oportuna del agente causal para tratar específicamente al paciente y evitar el uso indiscriminado de antimicrobianos, que provocan la selección de cepas resistentes y destrucción de la flora normal.

El estándar de oro, el hemocultivo, presenta limitantes y es necesario entre 48 a 72 horas para su crecimiento. Además los métodos indirectos para diagnóstico de sepsis como son Proteína C reactiva, interleucinas (IL-6), no son específicos. Actualmente los métodos de biología molecular ofrecen nuevas alternativas para la detección de sepsis en el periodo neonatal. La pirosecuenciación de ADN bacteriano se ha establecido como un método con alta sensibilidad y especificidad, presentando un resultado en menor tiempo, lo cual confiere una gran ventaja en la detección oportuna de agentes bacterianos que ponen en riesgo la vida de los RN.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la utilidad diagnóstica de la pirosecuenciación para la detección de agentes bacterianos que causan sepsis neonatal en nuestro medio?

7. HIPÓTESIS

La pirosecuenciación es un método sensible y específico para la detección de agentes bacterianos que causan sepsis neonatal.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General

Demostrar la utilidad diagnóstica de la pirosecuenciación en la detección de agentes etiológicos causantes de sepsis neonatal.

8.2. Objetivo Específico

Identificar por pirosecuenciación a los agentes bacterianos que con mayor frecuencia causan sepsis neonatal.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, longitudinal, no probabilístico

9.2. Lugar de realización

Unidad toco quirúrgica y UCIN del Hospital de la Mujer de la Ciudad de México.

9.3. Población de estudio

Todos los neonatos de 0 a 28 días de edad, nacidos en el Hospital de la Mujer que ameriten la toma de muestra de sangre periférica por presentar factores riesgo para sepsis o datos clínicos.

9.4. Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión:	Neonatos de ambos sexos De 0 a 28 días de nacidos Nacidos en el Hospital de la Mujer Que ameriten toma de muestra de sangre periférica por sospecha de sepsis Consentimiento informado por escrito del responsable legal
Criterios de exclusión:	Malformaciones congénitas mayores Enfermedades autoinmunes en el neonato o en la madre (LES, síndrome antifosfolípidos, psoriasis, artritis reumatoide, liquen escleroso, dermatitis herpetiforme, eczema atópico, artritis reumatoide juvenil y polimiositis) Tabaquismo materno (más de 2 cigarrillos por día en los últimos 3 meses) Hemotransfusión previo a la toma de muestra de sangre periférica

Criterios de eliminación:	Dificultad a la toma de la muestra en el paciente Muestras sanguíneas insuficientes o inadecuadas para el estudio Muestras de sangre contaminadas Retiro del consentimiento por el responsable legal del neonato
---------------------------	---

9.5. Obtención de la muestra

Los neonatos de 0 a 28 días de edad nacidos en el hospital de la mujer con presencia de sintomatología de sepsis y que las madres autorizaron el consentimiento informado, se les tomaron de manera estéril y antes del inicio de los antibióticos, un hemocultivo para aerobios, uno para anaerobios y una muestra para la prueba de pirosecuenciación. La toma de muestra se realizó de manera estéril, bajo asepsia y antisepsia de la zona y con campos estériles, se procedió a realizar la punción periférica en dorsal de manos para la extracción de la muestra. Si se optó por colocación de catéteres umbilicales o de un percutáneo, se aprovechó la instalación del catéter para la extracción de la muestra sanguínea.

9.6. Hemocultivo

Se requiere al menos 0.5 ml de sangre para cada uno de los 2 frascos de hemocultivos que se tomaron (aerobios y anaerobios). Los hemocultivos se rotularon con el nombre del paciente y se cultivaron en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de la Mujer.

9.7. Pirosecuenciación y Extracción de DNA

Se requiere 1 ml de sangre en un tubo especial previamente heparinizado y rotulados. Las muestras se procesaron por fases, la primera fase en el laboratorio del hospital de la mujer y la segunda fase en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer). La obtención del DNA total se realizó a partir de 1ml de muestra de sangre heparinizada, utilizando el kit *DNeasy Blood & Tissue* de Qiagen, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez purificado el material genético, este se almacena a -20 °C hasta su uso. Posteriormente se realizó la técnica de pirosecuenciación en el Laboratorio de Investigación en Inmunología del INPer, mediante 5 pasos:

1. ssDNA amplificado por PCR hibrida con el cebador de secuenciación y se incuba con las enzimas DNA polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, más los sustratos adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y luciferina.
2. La adición de uno de los 4 dNTPs inicia el segundo paso, en el que la DNA polimerasa cataliza la incorporación del dNTP al molde si es complementario. Es importante notar que si hay incorporación se libera PPi equivalente a la cantidad de un dNTP incorporado.
3. La ATP-sulfurilasa convierte cuantitativamente el PPi en ATP en presencia de APS. El ATP generado permite la conversión de la luciferina en oxiluciferina por acción de la luciferasa, generando luz visible en cantidades proporcionales a la cantidad de ATP presente. La luz emitida es detectada por una cámara CCD y puede ser analizada por el programa. Cada señal luminosa es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados.

-
4. Para continuar con la secuenciación, es esencial la degradación de aquellos dNTPs que no han sido incorporados. La apirasa es el enzima encargado de ello.
 5. Nuevos dNTPs pueden ser adicionado para iniciar un nuevo ciclo

9.8. Datos Clínicos y Demográficos

Se llenó la hoja de recolección con los datos del expediente del RN acerca de las características sociodemográficas de los pacientes, los factores de riesgo para sepsis, cuadro clínico del RN y los antibióticos empleados.

La información recabada se procesó en formato digital en hojas de Excel.

Se realizaron gráficas, tablas, y muestras comparativas con las variables recolectadas.

9.9. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de identificación y se compararon con el Gold estándar (hemocultivo). Se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1 para procesamiento de los datos obtenidos, se realizó el estudio estadístico con la prueba de Fisher.

10. ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación se consideró como una investigación con riesgo mínimo y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el Artículo 17 del Reglamento de Investigación de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de México, este estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- I. Según el apartado II del artículo 17, se menciona que esta investigación se considera con riesgo mínimo, considerado como estudio prospectivo en donde bajo consentimiento informado, se extrajo muestras sanguíneas menor al 2% del volumen sanguíneo total de los recién nacidos.
- II. Cabe mencionar que el estudio fue realizado en neonatos sin existir antecedentes de su aplicación en animales, laboratorios o en otros hechos científicos, puesto que representa un riesgo menor.
- III. Fue el único método empleado, dado que las características con las que se realizaron mediante la pirosecuenciación tienen como finalidad comprobar la utilidad de la misma.
- IV. Riesgo mínimo ya que no se requiere de tomas adicionales de muestras sanguíneas, para realizar la prueba se utilizó un mililitro de sangre que se separa de la toma que normalmente se les realiza a los pacientes para el diagnóstico de infección por hemocultivo, considerando todas las medidas de asepsia y antisepsia necesarias que se utilizan durante una toma sanguínea.
- V. Se solicitó consentimiento informado por escrito a las madres de los recién nacidos para poder ser incluidos en el estudio.
- VI. El estudio fue realizado en el hospital de la mujer de la ciudad de México, el cual cuenta con toda la infraestructura necesaria y el personal capacitado para llevar a cabo dicho estudio.

11. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron a 80 RN del Hospital de la Mujer que presentaron sospecha de sepsis neonatal entre el periodo de Febrero 2018 a enero 2019, la información obtenida se recabo en una base de datos.

11.1. Característica de los pacientes

Se analizaron las muestras de 42 RN masculinos y 38 femeninos (gráfica1), Con respecto al tipo de nacimientos 19 fueron por vía vaginal y 61 por vía abdominal (gráfica 2). Se obtuvieron 16 pacientes de termino (>37 sdg), 41 pretermino tardío (32 a 36.6 sdg), 22 muy pretérmino (28 a 31.6sdg) y 1 pretermino extremo (<28 sdg). La edad media de semanas de gestación (sdg) fue de 33 (27- 41). Sobre los antecedentes de infección materna, 16 madres no contaban con ningún antecedente, 10 con datos de corioamnionitis, 10 con infección de vías urinarias, 8 con cervicovaginitis durante el embarazo, 26 con ruptura prematura de membranas de más de 18 horas y 15 con antecedente de infecciones combinadas entre cervicovaginitis y vías urinarias (Cuadro 1). Nueve RN presentaron datos de respuesta inflamatoria sistémica por sepsis con diagnóstico de choque séptico y los 71 recién nacido restantes no la presentaron (Cuadro 2). De los que no presentaron Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS), 48 pacientes presentaron sospecha clínica de sepsis (29 RN con dificultad respiratoria, 18 con diagnóstico de neumonía congénita y solo uno presento fiebre), 24 pacientes no presentaron ningún síntoma y se sospechó sepsis por los antecedentes maternos.

A todos los RN en el estudio se le inició esquema antimicrobiano por sospecha de infección, 71 de ellos se manejaron con esquema de ampicilina y amikacina, 4 con ampicilina y cefotaxima, 2 con vancomicina y cefotaxima, 2 con meropenem y vancomicina, 1 con dicloxacilina y amikacina (Cuadro 3). Los días de tratamiento antimicrobiano fueron un mínimo 3 días y un máximo de 14 días

Figura 1. Porcentaje de muestras de RN del sexo masculino y femenino.

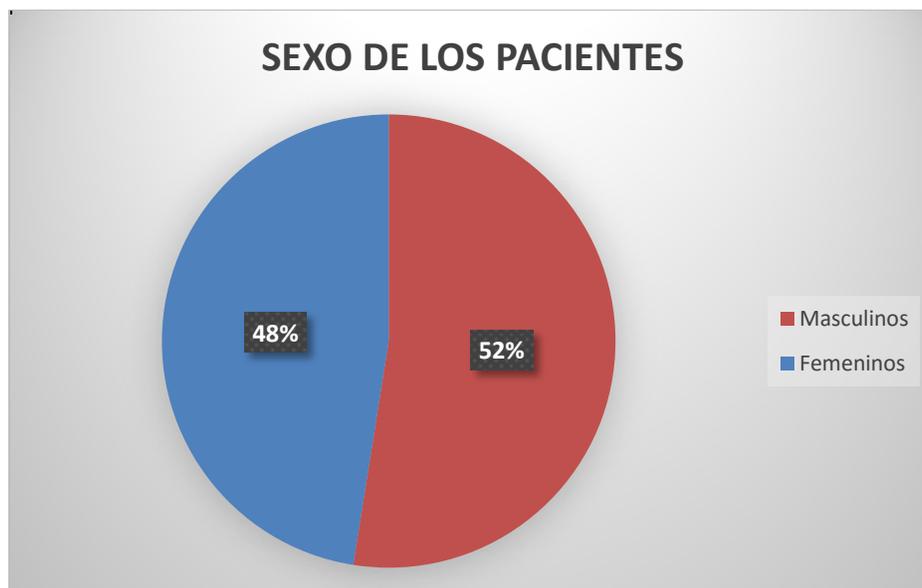


Figura 2. Tipo de nacimiento. Vaginal o Cesárea.

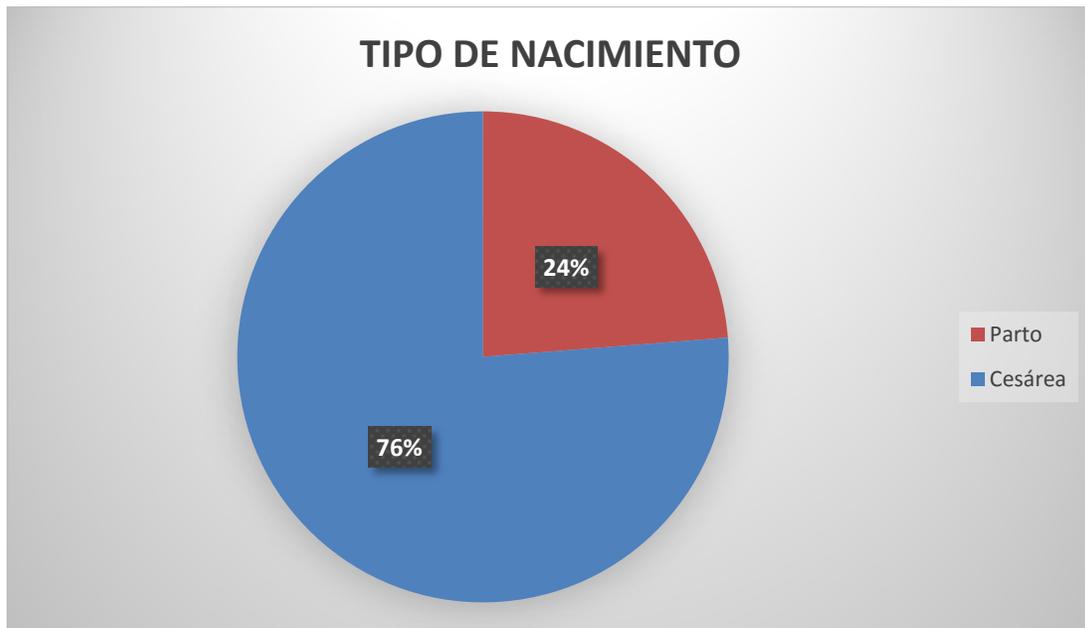
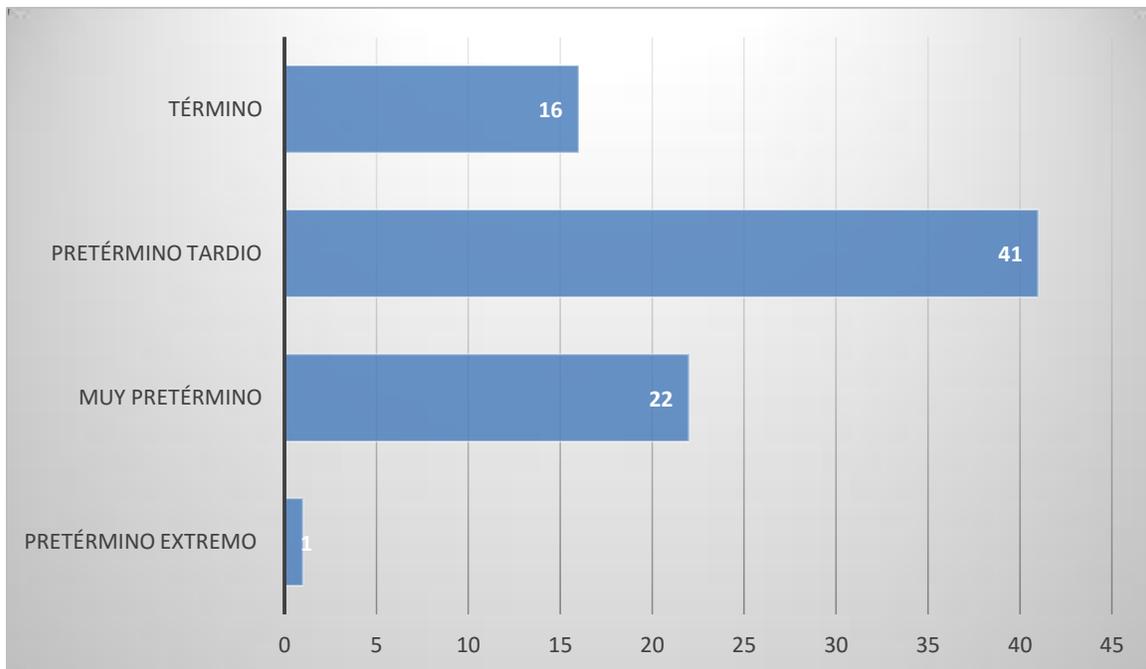


Figura 3. Semanas de gestación al nacimiento.



Cuadro 1. Antecedente de infección materna

ANTECEDENTE DE INFECCIÓN MATERNA	n
Ninguno	16
Corioamnioitis	10
Infección de Vías Urinarias	10
Cervicovaginitis	8
RPM > 18 horas	26
IVU + Cervicovaginitis	15

Cuadro 2. SRIS en los neonatos.

SINDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTEMICA	n
Presente	9
Ausente	71

Cuadro 3. Tratamiento antimicrobiano utilizado.

TRATAMIENTO ANOMICROBIANO	n
Ampicilina + Amikacina	71
Ampicilina + Cefotaxima	4
Cefotaxima + Vancomicina	2
Meropenem + Vancomicina	2
Dicloxacilina + Amikacina	1

11.2. Resultado de las muestras

Se tomaron 80 muestras de hemocultivos a RN para aerobios y anaerobios, obteniéndose un total de 5 muestras positivas representando el 6.25% (gráfica 4), de las cuales 2 fueron positivas a *Klebsiella pneumoniae*, 1 a *Staphylococcus epidermidis*, 1 a *Escherichia coli* y 1 a *Staphylococcus warneri* (tabla 4). La pirosecuenciación fue positiva en un total de 23 muestras que representan el 28.75% (gráfica 5), de las cuales en 16 muestras se identificó *Streptococcus* (70%), en 3 *Staphylococcus* (13%), en 2 *Escherichia coli* (9%), 1 *Klebsiella* (4%) y 1 *Haemophilus* (4%) (gráfica 6). En dos ocasiones el hemocultivo y la pirosecuenciación coincidieron en la detección del mismo agente bacteriano (paciente número 28 "*Klebsiella*" y número 55 "*Staphylococcus*").

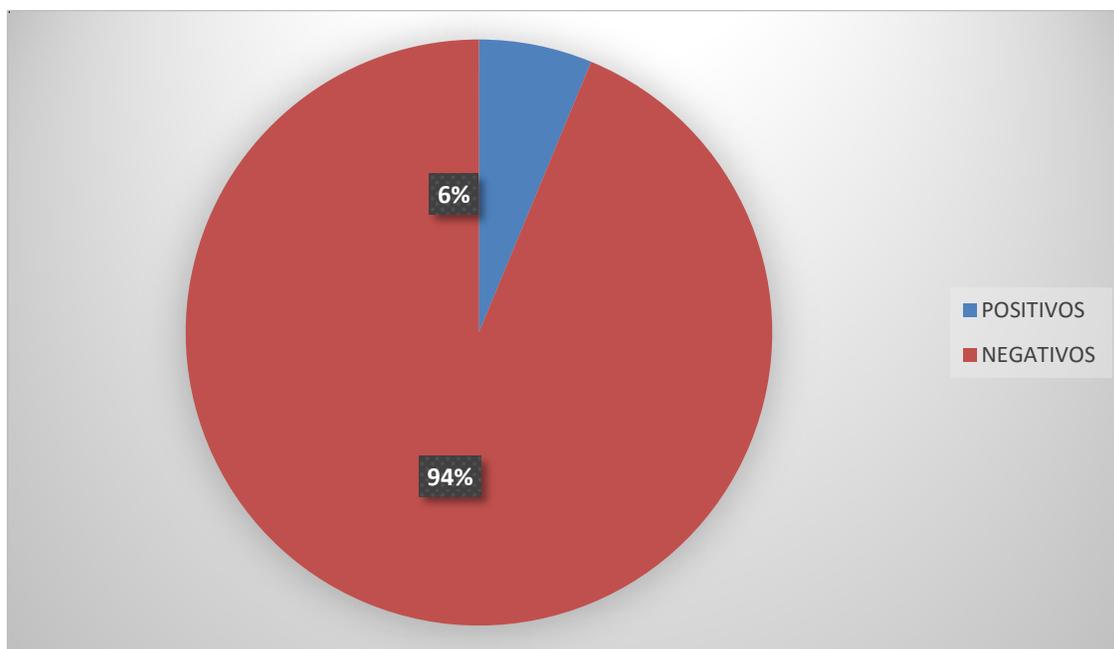
La prevalencia de factores de riesgo asociados a pirosecuenciación positiva fue de: 9% corioamnionitis, 31% ruptura prematura de membranas > 18 horas, 30% con asociación a Cervicovaginitis e Infección de vías urinarias y el 30% de estos se evidenció sin factores de riesgo (gráfica 7). Entre los datos clínicos de los pacientes con pirosecuenciación positiva, un 74% iniciaron con dificultad respiratoria, 4% con choque séptico, 4% con fiebre, y 18% no presentaron síntomas (gráfica 8). Se presentó choque séptico con pirosecuenciación positiva solo en 2 pacientes (paciente número 13 y número 64).

Se realizó el análisis estadístico con la prueba de Fisher entre los resultados de la pirosecuenciación y su concordancia clínica de sepsis, obteniendo el valor de P en 0.1777, RM 2.568, IC 95% con una sensibilidad de 82% y una especificidad de

35%, VPP 33% VPN 83% (gráfica 9). Los hemocultivos presentaron una P 0.1400 sensibilidad de 40% y una especificidad de 26%, VPP 3%, VPN 86%, para la detección por clínica de agentes bacterianos (Grafica 10).

Se analizó la eficacia de detección de agentes etiológicos de la pirosecuenciación en comparación con los hemocultivos encontrando: P 0.0003, S . 28% E . 93%, VPP 82%, VPN 56%, RM 6.053, CI 95% (gráfica 11).

Figura 4. Hemocultivos de los pacientes.



Cuadro 4. Resultados de los hemocultivos de los pacientes

RESULTADO DE HEMOCULTIVO	n
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Staphylococcus weneri</i>	1

Figura 5. Resultados de la pirosecuenciación.

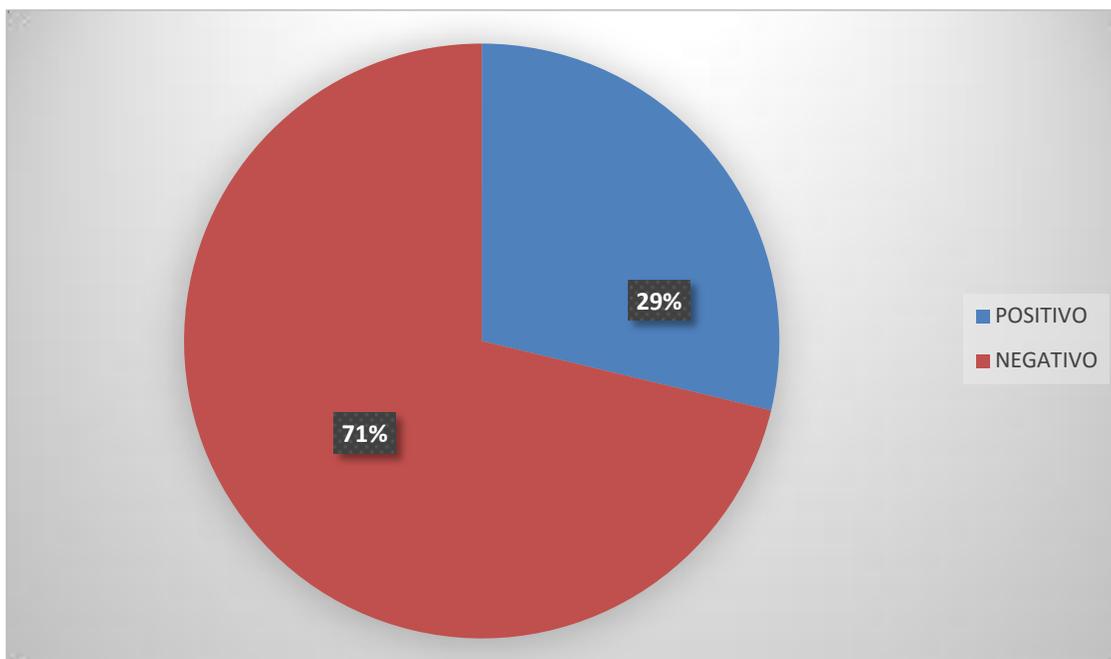


Figura 6. Agentes causales detectados por pirosecuenciación

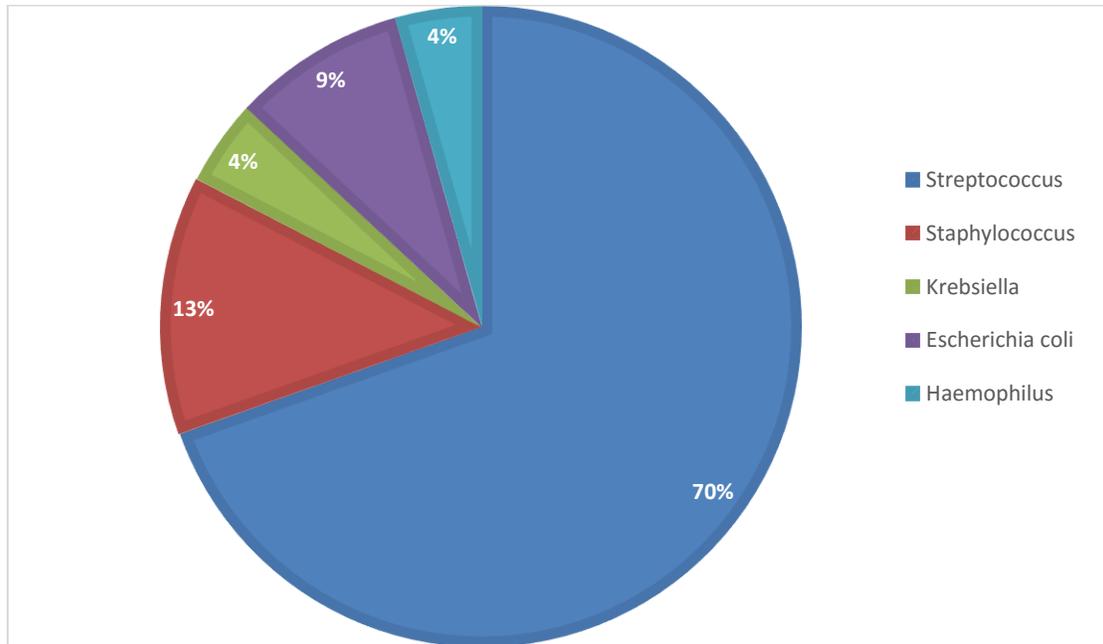


Figura 7. Factores de riesgo asociados con pirosecuenciación positiva

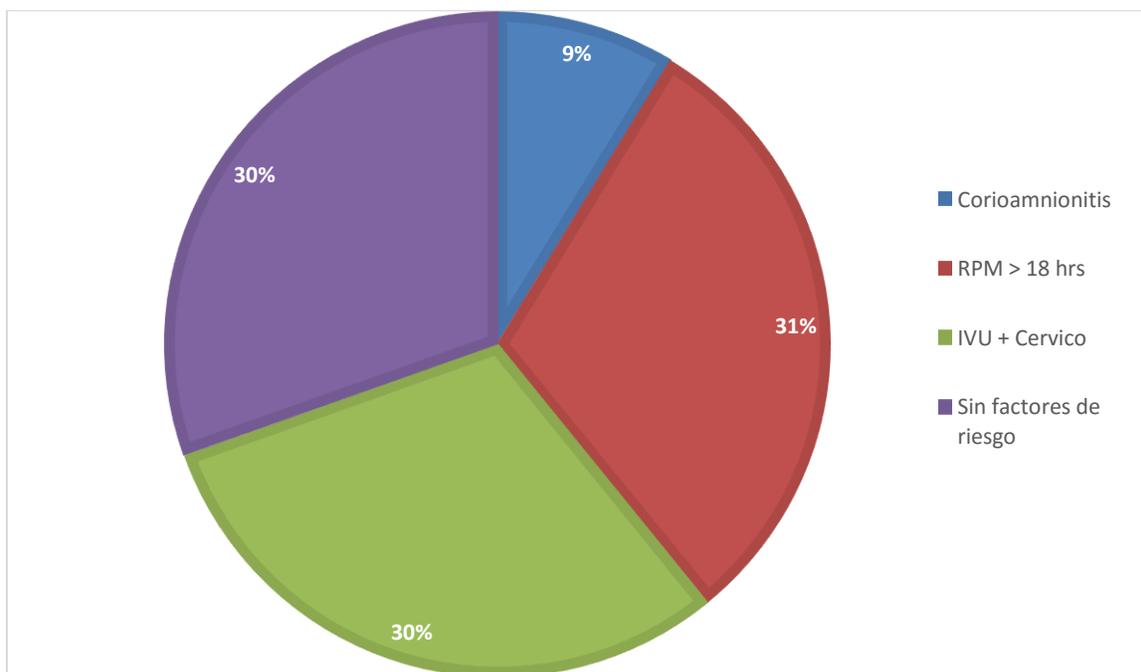


Figura 8. Datos clínicos de sepsis en pacientes con pirosecuenciación positiva

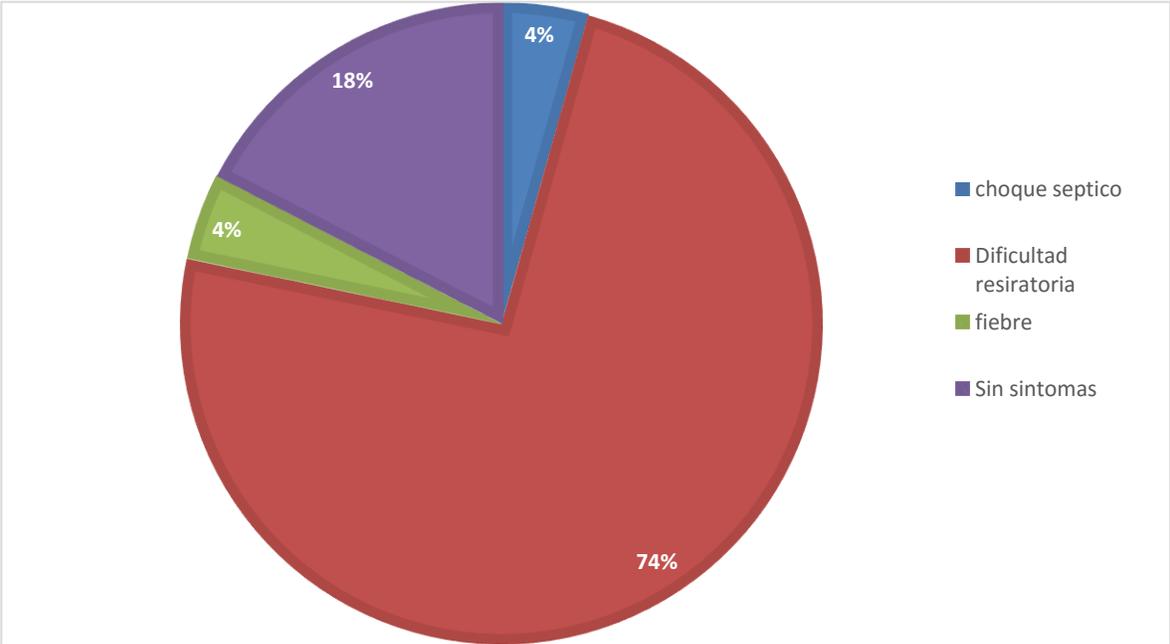


Figura 9.

Pirosecuenciación y la concordancia clínica

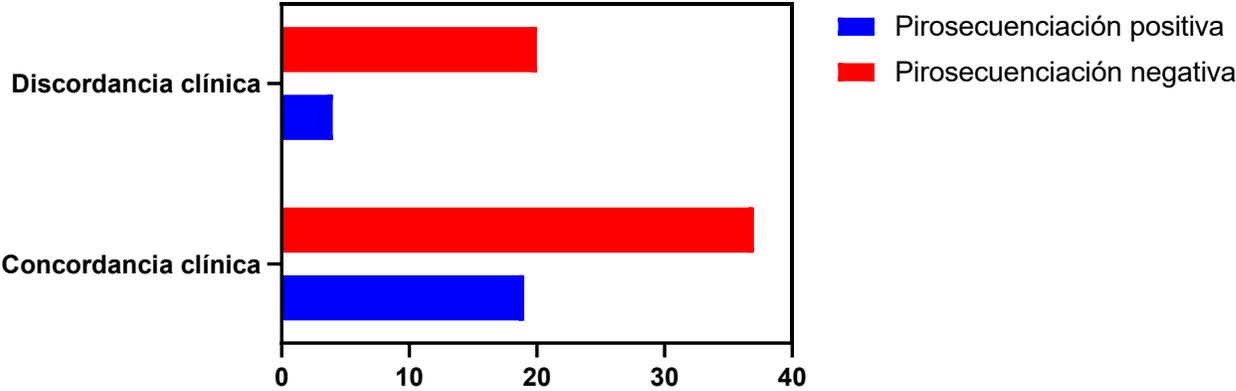


Figura 10.

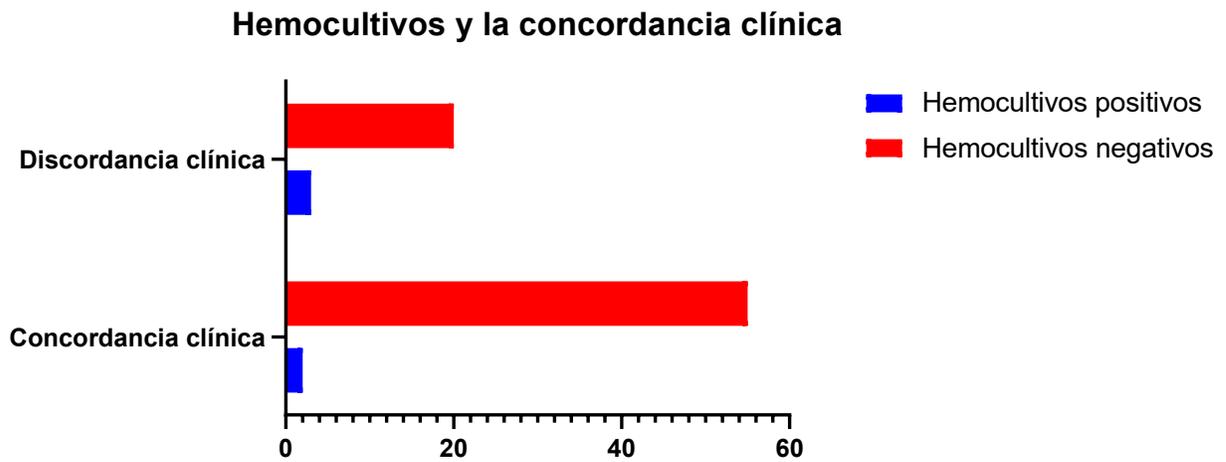
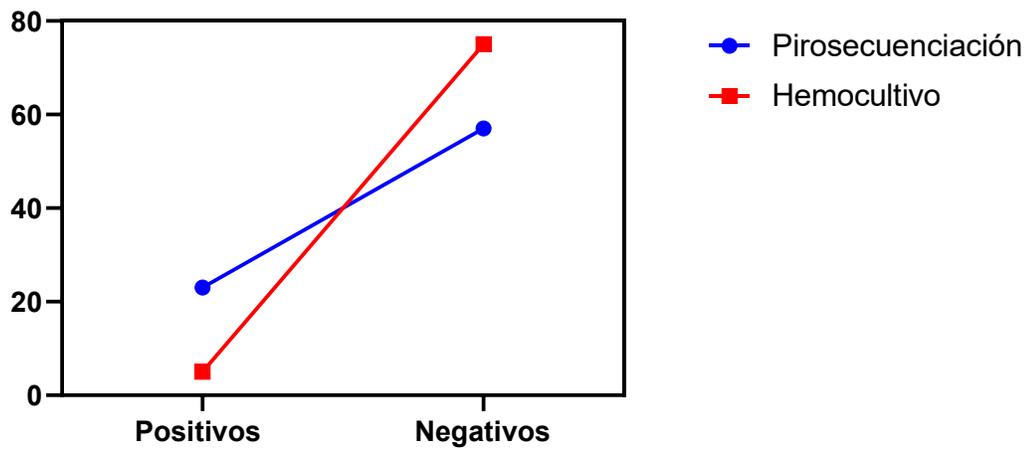


Figura 11.

Resultados de pirosecuenciación vs hemocultivos



12. DISCUSIÓN

La sepsis neonatal es un problema de salud mundial y la causa más frecuente de mortalidad en las unidades neonatales, su diagnóstico en RN representa un reto ya que los signos y datos clínicos no son específicos y simulan otras enfermedades comunes en este grupo etario por lo que su tratamiento temprano es primordial. Los neonatólogo nos apoyamos en los hemocultivos para determinar si se corrobora la sospecha de infección, tendiendo como inconveniente el tiempo de duración en la entrega de los resultados y solo un porcentaje de ellos resultan positivos, por lo que en muchas ocasiones se instaura tratamiento antimicrobiano solo con los antecedentes de riesgo maternos de infección o por algún dato clínico aislado en la sospecha de sepsis mientras se confirma el resultado por hemocultivo. En base a la información recabada, la pirosecuenciación demostró significancia estadística para la detección de agentes bacterianos que los hemocultivos tradicionales. Aunque la pirosecuenciación fue muy eficiente con su alta sensibilidad, reporto baja especificidad, no presentando significancia estadística para la para la detección de agentes bacterianos por concordancia clínica, ya que en otros estudios se ha reportado una sensibilidad de 100% y una especificidad de 95%²⁹, lo que representa una notoria diferencia en comparación con las pruebas de PCR descritas en la literatura. Los hemocultivos presentaron aún más baja sensibilidad y especificidad para detectar agentes bacterianos por concordancia clínica, además, muy pocos presentaron resultados positivos, aun cuando los pacientes presentaban datos clínicos de infección.

En este estudio se encontró que los hemocultivos no resultaron de utilidad en el diagnóstico de sepsis neonatal y la pirosecuenciación, aunque presentó mayor sensibilidad, tuvo sensibilidad baja, y no presentó significancia estadística cuando los pacientes presentaban datos clínicos de infección, probablemente porque los RN y sobre todo los prematuros, el cuadro clínico de sepsis es muy ambiguo, la inmadurez del paciente y los cuadros respiratorios transitorios al nacimiento, representan un reto para confirmar o descartar el diagnóstico de infección, lo que conlleva a la administración de esquemas antimicrobianos tempranos, aun cuando el diagnóstico no está completamente probado, por lo que la pirosecuenciación y los hemocultivos serían negativos, explicando nuestro pocos casos de detección de agentes etiológicos en las muestras obtenidas.

Aun así, la pirosecuenciación presentó significancia estadística para identificar mayor número de casos de agentes causales de infección que los hemocultivos, por lo que su uso en conjunto, podría ser una herramienta valiosa para detectar de forma rápida y precisa el diagnóstico de sepsis neonatal en los centros hospitalarios neonatales.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Robinson DT, Kumar P, Cadichon SB. Neonatal Sepsis in the Emergency Department. *Clin Ped Emerg Med* 2008; 9:160-8. Elsevier
2. Camacho-González A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60(2):367-389.
3. Bentlin MG, Rugolo MSS, et als. Late-onset Sepsis: Epidemiology, Evaluation, and Outcome. *NeoReviews* 2010;11:e426-e435.
4. Briceño I, Sepsis: Definiciones y aspectos fisiopatológicos. *Medicrit* 2005; 2(8):164-178.
5. Ganatra H A, Stoll B J, Zaidi A K M. International perspective on early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 2010; 37 (2): 501.
6. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath P, Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neo*
7. Orfali J, Sepsis Neonatal. Nuevas estrategias terapéuticas. *Rev. Ped. Elec. [en línea]* 2004, Vol 1, N° 1. 25-31.
8. Brady MT, Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 2005; 33: 268-275.
9. Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Benjamin DK Jr, et al. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(12):1052–6. [PubMed: 19953725]
10. Bizzarro MJ, Shabanova V, Baltimore RS, Dembry LM, Ehrenkranz RA, Gallagher PG. Neonatal sepsis 2004–2013: the rise and fall of coagulase-negative staphylococci. *J Pediatr.* 2015; 166(5): 1193–9. [PubMed: 25919728]
11. Zaidi A, Huskins C,Thaver D, Bhutta Z, Abbas Z, Goldmann D. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet* 2005; 365: 1175–88.

-
15. 12 Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence*. 2014; 5(1): 170-178
 12. G.D. Coto Cotallo, A. Ibáñez Fernández, Protocolo diagnóstico-terapéutico de la sepsis neonatal. *Bol Pediatr* 2006; 46(SUPL. 1): 125-134}
 13. Sheu JR, Hung WC, Wu CH, Ma MC, Kan YC, Lin CH, et al . Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia. *Circulation*. 1999;99:3056-62.
 14. Heeg P, Infecciones nosocomiales en neonatología y unidades de cuidado intensivo neonatales (UCIN). *International Federation of Infection Control* 2006 2; 82-86
 15. Venkatesh M., Flores A., Luna A. R., Versalovic J. Molecular 9. microbiological methods in the diagnosis of the neonatal sepsis. *Expert Reviews Anti-Infectious Therapy*. 2010, 8(9):1037-1048
 16. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbio! Clin* 2004;22(5):299-05
 17. Ronaghi,M., Karamohamed,S., Pettersson,B., Uhlen,M. and Nyren,P. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.*, 242, 84–89.
 18. Agah A., Aghajan M., Mashayekhi T., Sasan A., Davis R.W., Plummer J.D., Ronaghi M., Griffin P.B. A Multi- Enzyme Model for Pyrosequencing. *Nucleic Acids Research* 2004. Vol. 32, No. 21 e166.
 19. Jordan J., Butchko A. R., Durso M. B. Use of Pyrosequencing of 16S rRNA fragments to diferenciate between bacteria responsible for neonatal sepsis. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005. 7(1):105-110.
 20. Yadav A., Wilson C. Prasad P., Menon P. Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian Pediatrics* 2005, 42(7):681-685.
 21. Jonasson, J., M. Olofsson, and H. J. Monstein. 2002. Classification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *APMIS* 110:263–272.

-
22. Pourmand N., Elahl E., Davis R.W., Ronaghi M. Multiplex Pyrosequencing. *Nucleic Acids Research* 2002. Vol 30, No. 7 e31.
 16. Renz-Polster H, David M, et al. Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clinical and Experimental Allergy* 2005; 35: 1466-72.
 23. Ritchie A., Castán P. Aplicación de Nuevas Técnicas de Microsecuenciación Dirigida a la Detección de Bacterias Mediante Pirosecuenciación. *Life Science Lab.* 2010:2-3
 24. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research* 2001. 11:3-11.
 25. Saltigeral P., Valenzuela A., Avendaño E., Plascencia S., Martínez D. 27. Agentes causales de sepsis neonatal temprana y tardía: una revisión de 10 años en el "Hospital Infantil Privado". *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2007, Vol. XX Núm. 80 abril-junio; 99-105.
 17. 28. El-Hawary I.M., Nawar N.N., Al-Inany M.G., Yonan M.A. and El Seweify M. Early diagnosis of Neonatal Sepsis In Obstetric Ward: The Role of 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Evidence Based Women's Health Journal.* 2011. 1(2):64-72.
 18. 29. Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Ped* 1997 86: 1097-1099.

19. ANEXOS

19.1. Hoja de recolección de datos

Número de MUESTRA:

Nombre del PACIENTE:

Registro de expediente:

Fecha de toma de muestra:

Resultado de HEMOCULTIVO:

Resultado de PCR-RT:

Resultado de PCR:

Resultado de PYROSEC:

¿Se confirma diagnóstico de sepsis?:

Días de vida del RN cuando se observaron los síntomas de sepsis:

Fecha de nacimiento:

Datos clínicos SRIS:

SRIS: 0 = NO 1 = SI

Género: 1= Masculino 2= Femenino

Edad gestacional:

Vía de nacimiento: 1= parto 2= cesárea 3= distócico

Infección materna: 0= No 1= Corioamnionitis 2= IVU 3= CV 4=
RPM>18 h 5= otra

Peso al nacimiento:

Tratamiento antibiótico: Si / No

Criterios al nacimiento para el desarrollo de sepsis:

Datos adicionales de historia clínica:

Antibiótico administrado al recién nacido:

Fecha de tratamiento:

Tiempo de tratamiento:

19.2. Carta de consentimiento informado



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Investigación:
**IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE SEPSIS NEONATAL POR
PIROSECUENCIACIÓN**

Objetivo del Estudio:

Conocer si esta prueba nos puede proporcionar un resultado más rápido, con menor cantidad de muestra, para mejorar el diagnóstico de la infección generalizada en los recién nacidos.

Procedimientos empleados:

La prueba es conocida como "pirosecuenciación" porque detecta con producción de luz la presencia de microorganismos.

La muestra que requiere es una pequeña gota de sangre, que será separada de la muestra que regularmente se toma para realizar el diagnóstico por hemocultivo (300 microl.).

El estudio se realiza en el Departamento de Infectología e Inmunología del Instituto Nacional de Perinatología en colaboración con el Hospital de la mujer y ha sido evaluado y aprobado por los Comités de Ética de ambas Instituciones

Posibles riesgos para el bebé:

Sin riesgo debido al protocolo de estudio, ya que no se requiere ninguna toma adicional de muestra de sangre. Para realizar la prueba se utilizará una gota de sangre, que será separada de la toma que normalmente se les realiza a los bebés para diagnóstico de la infección por hemocultivo cuando presentan riesgo de desarrollo de infección generalizada.

Posibles beneficios para el bebé:

En este momento no hay beneficios esperados para el bebé por su participación en este estudio, pero esperamos que en el futuro otros bebés puedan beneficiarse cuando se cuente con un método más rápido, de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de sepsis.

Compensaciones:

No existe ninguna compensación por participar en este proyecto, ya que no hay fines de lucro

Participación o retiro:

En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio sin que ello signifique que la atención médica que el Hospital de la Mujer y el Instituto proporciona se vea afectada por este hecho

Para retirar la información del bebé del estudio marque la extensión 1241 y pregunte por la Dr. Javier Mancilla Ramírez, quien acudirá a verla/verlo con un formato de retiro de consentimiento informado que le pedirá que firme, previa solicitud de vista de su identificación.

Dudas:

Antes de firmar esta carta, pregunte todas sus dudas relacionadas con el proyecto y solo firmela si son aclaradas satisfactoriamente por el personal que la/lo está invitando a participar.

Confidencialidad:

Cualquier información que se genere durante el desarrollo del proyecto es confidencial, no será dada a conocer de forma personal, solo será utilizada para determinar la utilidad de la prueba de pirosecuenciación. Sólo en el caso de que los resultados sean útiles para mejorar el tratamiento de su bebé, se notificará al médico tratante.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este proyecto de investigación, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis dudas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me entrega una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre del padre o tutor	
Firma del padre o tutor	
Fecha	

Les he explicado la línea de investigación a los padres o tutores del paciente y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del médico tratante	
Firma del médico tratante	
Fecha	

Mi firma como testigo certifica que el padre/madre o tutor firmaron este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Testigos

Nombre y Firma del Testigo

Nombre y Firma del Testigo

19.3. Cronograma de actividades

CRONOGRAMA DE TRABAJO 2018-2019												
ACTIVIDAD	Marz	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agost	Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
Presentación a Comités	X											
Recolección de datos		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análisis estadístico											X	
Escritura de Tesis											X	X

19.4. Cuadro de variables

DEFINICIÓN DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE			
Sepsis neonatal	Situación clínica derivada de la invasión y proliferación de bacterias, hongos o virus en sangre del RN y que se manifiesta dentro de los primeros 28 días de vida	Neonatos con al menos dos manifestaciones clínicas o dos manifestaciones hematológicas serán considerados con sospecha de sepsis, por lo que se les extraerá sangre periférica para hemocultivo y para pirosecuenciación	Cualitativa, nominal
VARIABLES DEPENDIENTES			
Identificación por pirosecuenciación	Identificación por sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular	Pacientes con factores de riesgo a quienes se inicia el tratamiento antimicrobiano	Cualitativa, nominal
Hemocultivo	Cultivo de sangre que permite identificar bacterias y hongos	Sin o con desarrollo bacteriano	Cualitativa, nominal
Sexo	Condición que distingue el sexo	Masculino/femenino	Cualitativa, Nominal
Peso al nacimiento	Medida de la fuerza gravitatoria que actúa sobre un objeto	Gramos De bajo peso (hipotrófico): Inferior al percentil 10 de la distribución de pesos para la edad de gestación De peso adecuado (eutrófico):	Cualitativa, nominal

		Peso corporal entre el percentil 10 y 90 De peso alto (hipertrófico): Mayor al percentil 90	
Semanas de gestación al nacimiento	Semanas cumplidas al momento de nacimiento	Pretérmino extremo: <28 SDG RN de pretérmino: <37 SDG a >28 SDG RN a término: 37-41 sem RN posttérmino: >42 sem	Cuantitativa, discreta
Vía de nacimiento	Vía de expulsión o extracción del RN	Parto/cesárea	Cualitativa, nominal
Antecedente de Infección materna	Factores de la madre que predisponen a infecciones bacterianas al RN	Coriamnionitis Infección de vías urinarias Cervicovaginitis Ruptura prematura de membranas >18 horas	Cualitativa, nominal
Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica	Los diferentes estadios del proceso infeccioso, hasta el choque séptico refractario y eventualmente a la disfunción orgánica múltiple y la muerte	Presente/ Ausente Al menos dos síntomas: a) Afectación del sistema respiratorio: apnea, taquipnea (> 60/min), retracción, cianosis, insuficiencia respiratoria grave b) Cardiocirculatorios: taquicardia o bradicardia (>180/min o < 100/min), hipotensión arterial c) Sistema neurológico: letargo, irritabilidad d) Palidez o tiempo prolongado del llenado capilar (> 2 seg) e) Fiebre o hipotermia (> 38.5° C ó < 36° C) f) Leucocitosis de > 34 000/uL g) Neutrófilos totales >14 400/uL o < 7 000/uL (o bien, < 2 000/ uL en las primeras 24 horas de vida h) Relación de Neutrófilos inmaduros/neutrófilos maduros >0.2 i) Proteína C reactiva >8 mg/L	Cualitativa, dicotómica
Tratamiento antimicrobiano	Compuestos que tienen la capacidad de eliminar o reducir la proliferación de microbios	Antibióticos empleados en el recién nacido al momento de la sospecha de sepsis	Cualitativa, nominal