



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios en Posgrado e Investigación

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIO SOCIALES DE LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO

“Identificación por PCR en tiempo real de patógenos más frecuentes  
asociados a sepsis en pacientes de las Terapias Intensivas del Hospital Regional  
Lic. Adolfo López Mateos.”

Trabajo de investigación que presenta:  
Dr. Miguel Eduardo Álvarez Caro.

Para obtener el Diploma de Subespecialidad en:  
MEDICINA CRITICA PEDIATRICA

Asesores de Tesis:

Dra. Jacqueline Solares Tlapehco  
Dr. Jorge Federico Robles Alarcón

No. De Registro de Protocolo:  
673.2018

Año:  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios en Posgrado e Investigación

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIO SOCIALES DE LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO

“Identificación por PCR en tiempo real de patógenos más frecuentes  
asociados a sepsis en pacientes de las Terapias Intensivas del  
Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos.”

Trabajo de investigación que presenta:  
Dr. Miguel Eduardo Álvarez Caro

Para obtener el Diploma de Subespecialidad en:  
MEDICINA CRÍTICA PEDIÁTRICA

Asesores de Tesis:  
Dra. Jacqueline Solares Tlapechco  
Dr. Jorge Federico Robles Alarcón

No. De Registro de Protocolo:  
673.3018

Año:  
2019



---

DR. DANIEL RODRIGUEZ ARAIZA  
COORDINADOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION



---

DRA. FLOR MARIA DE GUADALUPE AVILA FEMATT  
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

---

DRA. MARTHA EUNICE RODRIGUEZ ARELLANO  
JEFE DE INVESTIGACION

---

DR. JORGE FEDERICO ROBLES ALARCON  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO



---

DR. JORGE ROBLES ALARCON  
ASESOR DE TESIS

---

DRA. JACQUELINE SOLARES TLAPECHCO  
ASESOR METODOLOGICO

**Resumen:**

El paciente séptico representa una de las principales causas de ingreso a las unidades de cuidados intensivos pediátricos. La identificación de los patógenos mediante hemocultivo requiere tiempos prolongados, retrasando el inicio de antibioticoterapia específica con incremento de la morbimortalidad de los pacientes y de la resistencia antimicrobiana.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es herramienta diagnóstica rápida para la identificación de microorganismos. Su alta especificidad está determinada por la hibridación de oligonucleótidos que delimitan una región del genoma del patógeno implicado y su alta sensibilidad está dada por la amplificación de millones de copias de esta región, facilitan su detección.

El uso de la PCR aún no resulta cotidiano, ya que la mayoría del personal es inexperto en el manejo de esta metodología, lo que representa un área de oportunidad para el diagnóstico microbiológico de sepsis en la edad pediátrica. Actualmente no existen suficientes estudios que comparen la eficacia de la reacción en cadena de la polimerasa contra el hemocultivo en la identificación de microorganismos en pacientes sépticos en las unidades de cuidados intensivos pediátricos.

**Summary:**

The septic patient represents one of the main causes of admission to the pediatric intensive care units. The identification of pathogens by blood culture requires prolonged times, delaying the initiation of specific antibiotic therapy with increased morbidity and mortality of patients and antimicrobial resistance.

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a rapid diagnostic tool for the identification of microorganisms. Its high specificity is determined by the hybridization of oligonucleotides that delimit a region of the genome of the pathogen involved and its high sensitivity is given by the amplification of millions of copies of this region, facilitating its detection.

The use of PCR is not yet daily, since most of the staff is inexperienced in the management of this methodology, which represents an area of opportunity for the microbiological diagnosis of sepsis in the pediatric age. Currently there are not enough studies comparing the effectiveness of the polymerase chain reaction against blood culture in the identification of microorganisms in septic patients in pediatric intensive care units.

**Agradecimientos:**

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento de mi formación profesional.

A mis padres “Valentín Álvarez Quintana y Luz Marcela Caro González” y a toda mi familia, por darme siempre su amor y apoyo incondicional.

A mi esposa, “Sarahí Villa Jiménez “por sus consejos, sacrificios, paciencia y amor que me permitieron alcanzar este nuevo logro.

A mi hijo, “Miguel de Jesús Álvarez Villa “que desde tu nacimiento te convertiste en la principal motivación para seguir adelante “Te amo”.

A mis maestros por sus enseñanzas, dedicación y profesionalismo.

Y a todas aquellas personas que sin darse cuenta lo hicieron posible.

## INDICE DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| Antecedentes Históricos.....   | 1  |
| Epidemiología.....   | 1  |
| Generalidades y definiciones de sepsis.....                                    | 1  |
| Choque séptico.....  | 5  |
| Etiología.....   | 5  |
| Factores de riesgo para sepsis y choque séptico .....                          | 6  |
| Fisiopatología de la sepsis y choque séptico .....                             | 7  |
| Diagnóstico y tratamiento.....   | 9  |
| Marcadores biológicos asociados a la infección y a sepsis en niños graves..... | 13 |
| Diagnóstico microbiológico.....  | 14 |
| Hemocultivo.....   | 14 |
| Reacción en cadena de la polimerasa.....                                       | 15 |
| Definición del problema.....   | 17 |
| Justificación.....   | 18 |
| Hipótesis.....   | 19 |
| Objetivos.....   | 20 |
| Material y Métodos.....  | 21 |
| Criterios de selección de pacientes.....                                       | 23 |
| Discusión y Resultados.....  | 24 |
| Conclusiones.....  | 33 |
| Bibliografía .....   | 34 |
| Anexos.....  | 36 |

## MARCO TEÓRICO

### ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A través del tiempo, el término “sepsis” y su significado han ido cambiando. Sus primeros registros datan del siglo VIII a.C; proviene del griego (σηψις), vocablo que se utilizó para referirse a la carne en descomposición o putrefacción.

A mediados del siglo XVIII Anton Van Leeuwenhoek describió por primera vez a las bacterias y dos siglos después, microbiólogos como Louis Pasteur o Robert Koch identificaron su asociación con procesos infecciosos.

Hugo Schottmüller en 1914 acuñó el concepto moderno de sepsis y bacteremia, afirmando que las bacterias patógenas localizadas en un sitio del organismo poseen la capacidad de invadir constantemente el torrente sanguíneo causando síntomas subjetivos y objetivos en los pacientes.

En 1991, la American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine publicaron un consenso donde se definieron los términos sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y el choque séptico; En 1996, Fisher y Fanconi proponen la adecuación de aquellos parámetros diagnósticos para la edad pediátrica y en 2001 cobran importancia de los biomarcadores en el diagnóstico y seguimiento de procesos sépticos.

En 2008 se define a la sepsis como la respuesta inmunológica del huésped ante una infección, la cual en ocasiones podía ser desmesurada y provoca lesión hística del paciente.

En 2016 la European Society of Intensive Care Medicine y la Society of Critical Care Medicine actualizan el concepto de sepsis que actualmente se mantiene y se define como una disfunción orgánica causada por una respuesta anómala del huésped a la infección que supone una amenaza vital y que puede ser amplificada por factores endógenos. (1)

### EPIDEMIOLOGÍA.

La Organización Mundial de la Salud estima que afecta a más de 30 millones de personas en el mundo por año con una mortalidad que puede alcanzar el 5% de los casos. Un análisis de 7 estados de Estados Unidos publicado en 1995 afirma que se presentaron 75,000 casos de sepsis en niños en ese año. Para el año 2000 y 2005 hubo un incremento en la incidencia de sepsis en 0.56 y 0.89 por cada 1000 niños respectivamente. En nuestro país no existen estudios suficientes que nos permitan determinar su epidemiología con certeza. (2)

### GENERALIDADES Y DEFINICIONES DE SEPSIS

La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta descontrolada del huésped ante una infección. Su diagnóstico amerita la presencia de un proceso infeccioso sospechado o documentado que se acompañe de un incremento agudo de dos o más puntos en la escala de Evaluación de Fallo Orgánico Secuencial (SOFA: Sequential Organ Failure Assesment).(3)

La escala SOFA fue desarrollada por la European Society of Intensive Care Medicine en 1994. Originalmente fue desarrollada para evaluar el fallo multiorgánico en pacientes sépticos. Actualmente su uso se ha generalizado para pacientes críticos y se ha utilizado a su vez como factor pronóstico.

La escala SOFA evalúa seis parámetros calificados con un puntaje de 0 a 4. Su puntaje mínimo es 0 y el máximo 24 puntos, existiendo una relación directa entre el puntaje obtenido y el riesgo de mortalidad.

**Tabla 1. Escala de SOFA.**

|  | <b>0</b>   | <b>1</b>        | <b>2</b>   | <b>3</b>   | <b>4</b>   |
|--|------------|-----------------|--|--|--|
| <b>Respiración</b><br>PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub><br>SaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> | >400       | <400<br>221-301 | <300<br>142-220                                    | <200<br>67-141   | <100<br><67  |
| Coagulación<br>Plaquetas 10 <sup>3</sup><br>/mm <sup>3</sup>                                   | >150       | <150            | <100   | <50  | <20  |
| Hígado<br>Bilirrubina mg/dL  | <1.2       | 1.2-1.9         | 2-5.9  | 6-11   | >12  |
| Cardiovascular<br>Tensión arterial   | PAM<br>≥75 | PAM<br>≤70      | Dopamina < 5<br>o dobutamina<br>cualquier<br>dosis | Dopamina a<br>dosis de 5.1-15<br>o Epinefrina<br>≤0.1 o<br>Norepinefrina<br>≤0.1 | Dopamina a<br>dosis >15 o E<br>pinefrina >0.1<br>Norepinefrina<br>>0.1 |
| Sistema Nervioso<br>Central<br>Escala de coma de<br>Glasgow                                    | 15         | 13-14           | 10-12  | 6-9  | <6   |
| Renal<br>Creatinina (mg/dL)<br>o<br>Flujo urinario<br>(ml/dL)                                  | <1.2       | 1.2-1.9         | 2.0-3.4  | 3.5-4.9<br><500  | >5<br><200   |

(3)

**Tabla 2. Correlación pronóstica de la escala SOFA.**

| <b>Máxima puntuación SOFA</b> | <b>Mortalidad %</b> |
|-------------------------------|---------------------|
| 0-6                           | <10%                |
| 7-9                           | 15-20%              |
| 10-12                         | 40-50%              |
| 13-14                         | 50-60%              |
| 15                            | >80%                |
| 15-24                         | >90%                |

(4)

La escala SOFA se desarrolló para población adulta. En 2016 con la actualización del tercer consenso para la definición de sepsis y choque séptico (Sepsis-3), fue publicado por Society of Critical Care Medicine y The World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Medicine Societies una propuesta para validar la escala de Evaluación de Fallo Orgánico Secuencial Pediátrica (Pediatric Sequential Organ Failure Assesment) "pSOFA".

**Tabla3. Propuesta de la escala pSOFA.**

| Órgano                   | Variable   | 0  | 1   | 2   | 3  | 4   |
|--------------------------|--|--|---|---|--|---|
| Respiratorio             | PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>                       | >400                                     | <400 con oxigenoterapia   | <300 con ventilación no invasiva                  | <200 con ventilación mecánica                                    | <100 con ventilación mecánica                                     |
| Hematología              | Recuento plaquetario (x10 <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> ) | >150                                     | <150  | <100  | <50  | <20   |
| Hígado                   | Bilirrubinas (mg/dL)                                     | <1.2                                     | 1.2-1.9   | 2-5.9   | 6-11.9   | >12   |
| Cardiovascular           | Soporte Cardiovascular                                   |  | Tensión arterial sistólica < del percentil de corte para la edad mmHg | Dopamina <5µg/kg/min o dobutamina cualquier dosis | Dopamina >5µg/kg/min o adrenalina /norepinefrina ≤ 0.1 µg/kg/min | Dopamina >15µg/kg/min o adrenalina /norepinefrina ≥ 0.1 µg/kg/min |
| Sistema Nervioso Central | Escala de coma de Glasgow                                | 15                                       | 13-14   | 10-12   | 6-9  | <6  |
| Renal                    | Creatinina (mg/dL)                                       | <1 x basado en el percentil para la edad | 1-1.6x basado en el percentil para la edad                            | 1.7-2.8x basado en el percentil para la edad      | 2.9-4.1x basado en el percentil para la edad                     | >4.2 basado en el percentil para la edad del paciente             |

(5)

**Tabla 4. Valores utilizados para el cálculo de la falla orgánica y cardiovascular en pSOFA,**

| Grupo Etario     | Presión arterial sistólica mm/Hg | Creatinina Sérica(mg/dL) |
|------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 0 días -1 semana | 60                               | 0.8                      |
| 1 semana-1 mes   | 65                               | 0.3                      |
| 1 mes a 1 año    | 70                               | 0.4                      |
| 2 años a 5 año   | 75                               | 0.6                      |
| 6-12 horas       | 80                               | 0-7                      |
| 13-18 horas      | 90                               | 1                        |

(5)

En octubre de 2017 se validó y publicó la escala pSOFA adaptando la puntuación de la escala SOFA original a través de 2 enfoques.

1. Los parámetros cardiovasculares y renales se adaptaron de la escala "PELOD 2" (Pediatric Logistic Organ Dysfunction Score), que es una escala pronóstica ya validada en la edad pediátrica.
2. Se incluyó el índice SpO<sub>2</sub> (saturación de oxígeno): FiO<sub>2</sub> (fracción inspirada de oxígeno) como una alternativa más para la valoración y estadificación de la lesión pulmonar.

**Tabla 5. Escala pSOFA**

| <b>VARIABLES</b>  | <b>0</b>   | <b>1</b>   | <b>2</b>   | <b>3</b>  | <b>4</b>  |
|---|--|--|--|---|---|
| Respiratorio<br>PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub><br>SaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>  | >400<br>>292   | 300-399<br>264-291   | 200-299<br>221-264   | <200<br>148-220<br>con<br>ventilación<br>mecánica   | <100<br><148<br>con<br>ventilación<br>mecánica                                    |
| Recuento<br>plaquetario(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )   | >150   | 100-149  | 50-99  | 20-40   | <20   |
| Bilirrubinas (mg/dL)  | <1.2   | 1.2-1.9  | 2-5.9  | 6-11.9  | >12   |
| Soporte Cardiovascular<br>Tensión arterial media<br>por grupo etario o<br>infusión de fármacos<br>vasoactivos<br>(mmHg/μg/kg/min) | <1 mes >46<br>1-11<br>meses>55<br>12-23<br>meses≥60<br>24-59<br>meses≥62<br>60-143<br>meses≥65<br>144-216<br>mese≥67<br>>216<br>meses≥70 | <1 mes <46<br>1-11<br>meses<55<br>12-23<br>meses<60<br>24-59<br>meses<62<br>60-143<br>meses<65<br>144-216<br>mese<67<br>>216<br>meses<70 | Dopami<br>na o<br><5μg/kg<br>/min o<br>dobuta<br>mina<br>cualquie<br>r dosis | Dopamina<br>o<br>>5μg/kg/mi<br>n o<br>adrenalina<br>/norepinefri<br>na ≤ 0.1<br>μg/kg/min | Dopamina><br>15μg/kg/min<br>o adrenalina<br>/norepinefri<br>na ≥ 0.1<br>μg/kg/min |
| Escala de coma de<br>Glasgow  | 15   | 13-14  | 10-12  | 6-9   | <6  |
| <1 mes<br>1-11 meses<br>12-23 meses<br>24-59 meses<br>60-143 meses<br>144-216 meses<br>>216 meses                                 | <0.8<br><0.3<br><0.4<br><0.6<br><0.7<br><1.0<br><1.2   | 0.8-0.9<br>0.3-0.4<br>0.4-0.5<br>0.6-0.8<br>0.1-1.0<br>1.0-1.6<br>1.2-1.9  | 1.0-1.1<br>0.5-0.7<br>0.6-1.0<br>0.9-1.5<br>1.1-1.7<br>1.7-2.8<br>2.0-3.4    | 1.2-1.5<br>0.8-1-1<br>1.1-1-4<br>1.6-2.2<br>1.8-2.5<br>2.9-4.1<br>3.5-4.9                 | ≥1.6<br>≥1.2<br>≥1.5<br>≥2.3<br>≥2.6<br>≥4.2<br>≥5                                |

(6)

## CHOQUE SEPTICO.

Estado evolutivo dentro del espectro de la sepsis que incluye trastornos circulatorios, celulares y metabólicos. Se caracteriza por la necesidad de terapia vasopresora derivada de la incapacidad para mantener una presión arterial media > 65 mmHg y un lactato sérico < de 2 mmol/L a pesar de una reanimación hídrica adecuada.

La mortalidad por choque séptico alcanza hasta un 40%, mientras que por sepsis representa sólo un 10%.<sup>(3)</sup>

## ETIOLOGÍA.

La principal causa de sepsis y choque séptico en la infancia es la infección bacteriana por gérmenes Gram positivos. Los virus, parásitos y hongos se encuentran menormente implicados en la génesis de procesos sépticos. Las bacterias Gram negativas son más frecuentes en el periodo neonatal, en infecciones nosocomiales y en pacientes neutropénicos.

La afectación del aparato respiratorio es la causa más frecuente de sepsis seguida en orden decreciente del sistema hematológico, genitourinario, gastrointestinal, tejidos blandos y sistema nervioso central. Cabe destacar que hasta en un 75% de los casos no se logra identificar al agente desencadenante del proceso infeccioso.<sup>(8)</sup>

La etiología de la sepsis se ve influenciada por la edad, la microbiota hospitalaria, las comorbilidades del paciente, entre muchas otras variables.

En el periodo neonatal los patógenos más frecuentes son el *Streptococcus agalactiae* y bacilos Gram negativos. En la edad pediátrica exceptuando el periodo neonatal las bacterias más frecuentes son *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y en los niños mayores *Streptococo del grupo A* y *Staphylococcus epidermidis* en portadores de dispositivos (sondas y catéteres), *Haemophilus influenzae* tipo B en pacientes no vacunados, y enterobacterias gram negativas.

Con menor frecuencia, se presentan casos asociados a hongos (*Candida albicans*), *rikettsias* y virus que también tienen la capacidad de provocar sepsis grave, shock y muerte del paciente. La infección fúngica produce alrededor del 10% de las sepsis graves y choque séptico, particularmente en pacientes inmunocomprometidos con neutropenia prolongada (>4-7 días) o tratados recientemente con antibióticos de amplio espectro. Los virus *Influenzae*, *Parainfluenzae*, *VRS*, *adenovirus*, *metaneumovirus* y *dengue* pueden producir un cuadro indistinguible de la sepsis bacteriana.

Múltiples virus (*citomegalovirus*, *virus de Epstein-Barr*, *herpes simple* y *herpesvirus humano 6*) con frecuencia se reactivan durante el curso de la enfermedad. La linfopenia que aparece cuatro días después del diagnóstico de sepsis se asocia con infección bacteriana secundaria y es factor de mal pronóstico.

Los polimorfismos en el TLR4 y TLR1 (toll like receptor) se asocian con mayor susceptibilidad para padecer shock séptico por gérmenes gramnegativos, candidemia y aspergilosis invasivas. Los genes que codifican citocinas (TNF, IL-10, IL-8, antagonista del receptor IL-1, IL-6 e interferón gamma), receptores de superficies celulares (CD-14, TLR-2, TLR-4 y receptores Tc-gamma) ligados a polisacáridos se asocian a mayor susceptibilidad y a peor pronóstico.<sup>(10)</sup>

## FACTORES DE RIESGO PARA SEPSIS Y CHOQUE SÉPTICO

1. Deficiencia inmunitaria.
  - Congénita o adquirida.
  - Humoral o celular.
  - Pacientes malnutridos, oncológicos, neonatos prematuros.
  - Niños tratados con inmunosupresores o corticoides.
2. Anormalidad del tracto urinario.
3. Portadores de catéteres.
4. Infecciones locales: especialmente, abdominales, urológicas y meníngeas.
5. Pacientes con pérdida de barrera cutánea (quemados, politraumatizados).
6. Niños con pérdida de barrera intestinal.
  - Enterocolitis necrotizante.
  - Colitis ulcerosa.
  - Isquemia intestinal.
  - Episodio de hipoperfusión arterial previa o hemorragia grave (riesgo de translocación bacteriana).
7. Portadores de sondas de drenaje (abdominal, urológico, pleural, cerebral).
8. Postoperatorio del paciente quirúrgico ingresado en UCIP.
9. Cualquier niño ingresado en cuidados médicos, quirúrgicos o neonatales.
10. Paciente colonizado por bacterias patógenas.
11. Contactos cercanos de infección fácilmente transmisible (meningococemia, enfermedad invasiva por *H. influenzae*...), especialmente si son menores de 2 años.

El shock séptico puede aparecer en niños previamente sanos, de forma súbita (p. ej., meningococemia) incluso de tipo refractario, con disfunción multiorgánica y muerte en tan solo unas horas. Es importante comentar que la sepsis que cursa sin fiebre o con hipotermia se asocia, a mayor gravedad y mortalidad al igual que aquellos pacientes que cursan con leucopenia (<4.000 leucocitos/mm<sup>3</sup>), probablemente por falta de una respuesta adecuada del huésped frente al proceso infeccioso. <sup>(11)</sup>

## **FISIOPATOLOGIA DE LA SEPSIS Y CHOQUE SEPTICO**

### **TEORÍA DE LEWIS THOMAS " LA RESPUESTA INFLAMATORIA EXAGERADA".**

Esta teoría dice que el aumento de la morbimortalidad deriva de una respuesta inflamatoria sistémica exagerada por parte del huésped ante una infección. Las células inmunitarias reconocen patrones moleculares a través de los TRL cuya función es distinguir entre microorganismos patógenos y daño tisular, iniciándose una respuesta proinflamatoria descontrolada "tormenta de citoquinas" que se acompaña de un incremento en la producción y señalización de citoquinas inflamatorias.

#### **Reclutamiento leucocitario**

Se produce en el sitio de infección y representa una de las características iniciales de una respuesta inmune exitosa. Su importancia se aprecia en la deficiencia de la adhesión de leucocitos tipo I (LAD I), donde la pérdida funcional de las integrinas  $\beta 2$  causa el deterioro en la movilización de neutrófilos a sitios extracelulares, cursando con infecciones recurrentes y severas de tejidos blandos (p. ej: periodontitis crónica). En la LAD tipo II, el ligando de la selectina es deficiente, generando mayor susceptibilidad a las infecciones, aunque con menor severidad que la LAD I.

En pacientes sépticos, la quimiotaxis y el reclutamiento leucocitario en los sitios de infección están disminuidos debido su activación sistémica acompañándose de secuestro leucocitario alejado del sitio de infección, con lo que disminuye el reclutamiento leucocitario en el sitio de la infección.

La respuesta inmunológica mediada por hormonas, enzimas y citocinas inicialmente combaten la infección, sin embargo al perpetuarse los mecanismos proinflamatorios causan lesión tisular y en ocasiones pueden no ser detenidos por el organismo.<sup>(12)</sup>

#### **Cambios a nivel orgánico**

La lesión endotelial genera liberación de especies reactivas de oxígeno como el hidroxilo y el óxido nítrico (nocivos para el ADN, proteínas y lípidos celulares) alterando la función mitocondrial, favoreciendo la adhesión leucocitaria, el estado procoagulante, la vasodilatación y la pérdida de la función de barrera del endotelio. La activación del complemento potencia la liberación de especies reactivas de oxígeno, la liberación enzimática de granulocitos, el incremento de la permeabilidad vascular y la expresión del factor tisular causando lesión de celular en la médula suprarrenal.

La disfunción endotelial se traduce nivel pulmonar con edema intersticial y alveolar cuya máxima expresión es el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). La lesión del epitelio intestinal favorece la traslocación bacteriana, la auto digestión por acumulación luminal enzimática (enzimas pancreáticas) pudiendo perpetuar la disfunción orgánica múltiple. A nivel hepático existe una incapacidad de depuración de bilirrubina por los hepatocitos entre otras múltiples alteraciones. La lesión renal aguda se presenta por disfunción microvascular y tubular mediada por citocinas. La disfunción hepática y renal incrementa la concentración de toxinas a nivel del SNC, producen a su vez coagulopatía, alteración de la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral (riesgo de isquemia y/o hemorragia). El sistema nervioso central inicia una función antiinflamatoria, a través de quimiorreceptores sensibles a citocinas enviando señales al tronco encefálico donde para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias a nivel intestinal, esplénico y otros sitios. La encefalopatía es un hallazgo frecuente y temprano en sepsis grave. Cuando se producen alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, las citocinas inflamatorias alcanzan el cerebro y producen edema perivascular, estrés oxidativo, leucoencefalopatía.

A nivel microcirculatorio disminuye la respuesta a estímulos locales como la obstrucción luminal de los pequeños vasos por microtrombos. Existe expresión generalizada del factor tisular, depósito de fibrina y la alteración de los mecanismos anticoagulantes favoreciendo la aparición de coagulación intravascular diseminada (CID).

La disfunción orgánica séptica puede perpetuarse a través de varias vías:

- El SDRA a menudo requiere ventilación mecánica que puede lesionar aún más los pulmones incrementar la respuesta inflamatoria sistémica.
- Los sedantes pueden empeorar la encefalopatía, generan reducción de la movilidad, aumento del catabolismo y debilidad neuromuscular.
- La disfunción de la barrera intestinal causa la translocación bacteriana y la alteración del estado nutricional.
- La disfunción del sistema inmunitario deja al huésped- susceptible a infecciones nosocomiales y microorganismos oportunistas derivado del uso de dispositivos que se utilizan para el soporte vital de los pacientes sépticos (tubo endotraqueal, catéteres intravasculares, vesicales).

### **Cambios a nivel celular y molecular**

Los macrófagos reconocen productos microbianos asociados a factores liberados por células dañadas (ATP, ADN mitocondrial, entre otros) a través de varias vías que actúan como señalizadores de invasión microbiana, poniendo en marcha la inmunidad adaptativa a través del sistema inflamatorio.

La cascada inflamatoria Se activa por la presencia del lipopolisacárido (LPS) capsular (presente en bacterias Gram negativas), ácido teicoico (presente en bacterias Gram positivas) o por otros componentes menos conocidos de hongos o virus, estas sustancias se unen a receptores específicos (CD-14) presentes en la membrana de los macrófagos y los activan.

Los macrófagos liberan citocinas, factores de coagulación y otros factores inflamatorios. El (TNF) y la IL 1 son responsables de gran parte de las manifestaciones del paciente séptico (fiebre, alteraciones cardiovasculares, leucocitosis, trastornos de coagulación, aumento de la permeabilidad vascular, aumento de hormonas de estrés, gluconeogénesis y lipólisis e inducción de IL6 e IL 8.

Actualmente se conocen 18 diferentes interleucinas, algunas proinflamatorias (TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6) y otras con efectos antiinflamatorios (IL-10, IL-13) cuyo objetivo es controlar los procesos inflamatorios.

Entre las múltiples funciones de las citocinas proinflamatorias se encuentran: aumentar la expresión de las moléculas de adhesión y de las quimiocinas por el endotelio, inducir proteínas hepáticas de fase aguda (complemento y fibrinógeno), favorecer la activación plaquetaria, liberación del factor tisular (producir inmutrombosis), la angiopoyetina y factor de von Willebrand.

La endotoxina estimula el endotelio vascular, liberando óxido nítrico (responsable último de la vasodilatación e hipotensión arterial), activando directamente la cascada de la coagulación (coagulopatía de consumo) y el ácido araquidónico, que produce la liberación de sustancias tóxicas con efectos cardiovasculares y sobre la coagulación (leucotrienos, tromboxano). Los productos microbianos (LPS) activan también el complemento, útil para la lisis y fagocitosis bacteriana, pero la activación excesiva es contraproducente. C5a y C3a provocan la liberación de histamina aumentando la permeabilidad capilar y generando hipotensión.<sup>(10)</sup>

### **Cambios a nivel metabólico.**

Los pacientes sépticos tienen mitocondrias dañadas y disfuncionales. Aunado a los efectos tóxicos de los antibióticos a nivel mitocondrial, las cifras de ATP disminuyen y para prevenir un descenso letal las células pueden entrar en un estado de hibernación. Se produce reducción generalizada del gasto energético a nivel celular, que empeora la disfunción renal, la depresión miocárdica, la disfunción hepática, la encefalopatía, la lesión pulmonar aguda y la lesión intestinal.

El catabolismo genera la pérdida rápida y considerable de la masa muscular. El dolor, los corticoides, y la inmovilidad favorecen la degradación muscular, liberando aminoácidos para la gluconeogénesis que sirven de sustrato para la proliferación de las células inmunitarias innatas.

### **Resolución del proceso séptico**

El balance entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios regula el proceso inflamatorio que incluye adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y eliminación de los detritus de los tejidos lesionados. Si en el balance de los mediadores implicados en la respuesta inflamatoria predomina la respuesta proinflamatoria se produce lesión celular que terminará en disfunción o fracaso multiorgánico, mientras que, si predomina la respuesta antiinflamatoria, se producirá la reparación tisular y muy probablemente la recuperación.

En los pacientes sépticos, las vías antiinflamatorias desde las primeras horas del inicio del cuadro. La IL-10 suprime la producción de IL-6 e interferón gamma y estimula la producción del receptor soluble de TNF y el antagonista del receptor de IL-1, en un intento por neutralizar las señales de TNF- $\alpha$  e IL-1. A nivel subcelular, la autofagia (empaquetar patógenos, organelas y proteínas dañadas en vesículas destinadas a la degradación lisosómica) ayuda a reducir la activación de los inflamasomas. <sup>(10)</sup>

Una vez eliminados los microorganismos, las células dañadas sufren apoptosis y los leucocitos infiltrantes son eliminados por los macrófagos.

Recientemente se descubrieron familias de lípidos bioactivos llamados lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas, que disminuyen los ERO, la permeabilidad endotelial y el reclutamiento de leucocitos. Las células T reguladoras y las células supresoras también pueden ser importantes para la eliminación de las células citotóxicas y la producción de citocinas antiinflamatorias. <sup>(10)</sup>

## **DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**

Se deberá hemocultivar al paciente idealmente antes del inicio de la terapia antimicrobiana con al menos 1 extracción percutánea y 1 a través del acceso vascular central, a menos que el dispositivo se haya insertado recientemente (<48 h), siempre y cuando no exista un retraso significativo (> 45 minutos) en el inicio de los antimicrobianos. Se deben tomar cultivos para gérmenes anaerobios y aerobios; es recomendable el uso de 1,3 beta-D-glucano, anticuerpos contra mananos y antimanos si están disponibles, y si la candidiasis invasiva se encuentra en el diagnóstico diferencial. Deberán utilizarse estudios de imagen en la búsqueda de una posible fuente de infección o para confirmarla. <sup>(18)</sup>

## **ANTIMICROBIANOS**

Su uso es efectivo si se administra dentro de la primera hora, iniciando la terapia empírica contra los microorganismos más probablemente implicados; para la suspensión de antibióticos en pacientes que inicialmente se pensó en sepsis pero posteriormente no presentan evidencia de infección se deberán utilizar biomarcadores como procalcitonina. La terapia empírica no deberá prolongarse por más de 5 días y se ajustará el manejo dependiendo de la susceptibilidad del germen.

Se deberá utilizar terapia combinada en situaciones de sepsis grave, neutropenia y resistencia bacteriana (*Acinetobacter* y *Pseudomonas*). Se recomienda el uso de un betalactámico y un aminoglucósido o una fluoroquinolona en infecciones graves con insuficiencia respiratoria para cobertura de *P. aeruginosa*. La combinación de betalactámicos y macrólidos se utiliza para *Streptococcus pneumoniae*.

Habitualmente la duración de los antibióticos será de 7 a 10 días; siendo meritoria la extensión del tratamiento en aquellos con respuesta lenta, focos de infección no curables, bacteriemia con *S. aureus* y en algunas infecciones fúngicas y virales e inmunodeficiencias. <sup>(13)</sup>

## **CONTROL DEL FOCO INFECCIOSO**

Se deberá excluir un sitio específico de infección y deberá realizarse una intervención para su control en las primeras 12 horas del diagnóstico. Por ejemplo: Si el acceso vascular se considera una posible fuente de infección, deberá retirarse inmediatamente después de conseguir un nuevo acceso.

En sepsis severa, se debe realizar una intervención efectiva con el menor daño fisiológico (por ejemplo, drenaje percutáneo en lugar de quirúrgico de un absceso). En pacientes con necrosis peripancreática infectada, la intervención definitiva se retrasa hasta que se produzca una adecuada demarcación de los tejidos viables y no viables.

La clorhexidina oral se usa para reducir el riesgo de neumonía asociada al ventilador en pacientes con sepsis grave. <sup>(13)</sup>

## **FLUIDOTERAPIA**

El líquido de elección en la reanimación inicial son los cristaloides, pudiendo usar albúmina en aquellos pacientes que requieren grandes cantidades de cristaloides. Mientras exista mejoría hemodinámica objetiva deberá continuarse la fluidoterapia. La reanimación hídrica se realizará con 30 ml / kg de solución cristaloide por vía intravenosa en las primeras 3 h. Existen algunas evidencias de que los balances hídricos positivos en las unidades de cuidados intensivos pueden resultar perjudiciales por lo que deberá evaluarse a los pacientes que responderán a esta medida. <sup>(13)</sup>

## **MEDICIÓN SERIADA DEL LACTATO**

Se ha demostrado que su medición seriada disminuye la mortalidad; debe medirse dentro de las primeras 2-4 horas para dirigir la reanimación para normalizar los niveles en pacientes con hiperlactatemia (hipoperfusión tisular). <sup>(13)</sup>

## **VASOPRESORES**

Si la presión de perfusión no logra restaurarse con la reanimación hídrica, deberá iniciarse vasopresores e inotrópicos dentro de la primera hora. El fármaco de primera línea es la norepinefrina, puede agregarse epinefrina si no es posible el adecuado mantenimiento de la presión arterial.

La vasopresina 0.03 unidades/ minuto puede agregarse a la norepinefrina con la intención de aumentar la presión arterial media o disminuir la dosis de norepinefrina. No se recomienda como vasopresor inicial y dosis superiores a 0.04 unidades / minuto deben reservarse para aquellos casos en que no se puede alcanzar una presión arterial media con otros vasopresores.

La dopamina puede ser una alternativa a la norepinefrina en pacientes con bajo riesgo de taquiarritmias y bradicardia absoluta o relativa. Puede utilizarse dobutamina hasta 20 microgramos / kg / min en presencia de disfunción miocárdica (presiones de llenado elevadas y gasto cardíaco o signos continuos de hipoperfusión, a pesar de lograr un volumen intravascular adecuado y una presión arterial media adecuada.<sup>(13)</sup>

## **ESTEROIDES**

Deberá reservarse su uso para pacientes con fallo tras manejo con fluidoterapia y vasopresores para restaurar la estabilidad hemodinámica. Se sugiere el uso hidrocortisona intravenosa en una dosis de 200 mg por día y deberá disminuirse cuando ya no se requieren fármacos vasoactivos.<sup>(13)</sup>

## **HEMODERIVADOS**

La transfusión de hematíes se reserva cuando la hemoglobina disminuya a <7.0 g / dL para alcanzar una concentración entre 7,0 a 9,0 g / dL. No se debe usar plasma fresco congelado para corregir anomalías de coagulación en ausencia de sangrado o procedimientos invasivos planificados. Deberán administrarse plaquetas con recuentos <10,000 / mm<sup>3</sup> aún en ausencia de sangrado, con <20,000 / mm<sup>3</sup> si existe riesgo de sangrado. Se recomiendan recuentos ≥50,000 / mm<sup>3</sup> para sangrado activo, cirugía o procedimientos invasivos<sup>(13)</sup>

## **INMUNOGLOBULINA**

No se recomienda su uso en sepsis grave o shock séptico.<sup>(13)</sup>

## **VENTILACIÓN MECÁNICA**

Deberá de manejarse volumen tidal de 6 ml / kg de peso en SDRA inducido por sepsis La presión meseta deberá ser ≤30 cm H<sub>2</sub>O. Se deberá aplicar presión positiva al final de la espiración (PEEP) para evitar el colapso alveolar (atelectotrauma). Se deben utilizar maniobras de reclutamiento en pacientes con hipoxemia refractaria grave (el decúbito prono debe usarse en Pao<sub>2</sub> / Fio<sub>2</sub> ≤ 100 mm Hg) La cabecera de la cama deberá estar elevada a 30-45 grados para minimizar el riesgo de aspiración y para prevenir la neumonía asociada al ventilador.

Para valorar el destete ventilatorio el paciente debe estar despierto, hemodinámicamente estable (sin vasopresores), ausencia de condiciones potencialmente graves; parámetros ventilatorios mínimos con FiO<sub>2</sub> que se pueda cumplir de forma segura con ventilación no invasiva.

En ausencia de indicaciones específicas como broncoespasmo, no usar agonistas beta 2 para el tratamiento del SDRA inducido por sepsis (grado 1B).<sup>(13)</sup>

## **SEDACIÓN, ANALGESIA Y BLOQUEO NEUROMUSCULAR**

La sedación continua o intermitente debe minimizarse en pacientes con sepsis ventilada mecánicamente, apuntando a puntos finales de valoración específicos. Se deben evitar los bloqueadores neuromusculares en pacientes sin SDRA por el riesgo de bloqueo prolongado tras la interrupción. Si deben mantenerse se preferirán los bolos intermitente a la infusión continua con monitoreo del tren de cuatro pasos de la profundidad del bloqueo. Se debe utilizar un ciclo corto de

bloqueadores neuromusculares por no más de 48 horas para pacientes con SDRA temprano inducido por sepsis y una Pao<sub>2</sub> / Fio<sub>2</sub> <150 mm Hg (grado 2C).<sup>(13)</sup>

## **GLUCOSA**

Deberá emplearse terapia con insulina cuando se obtengan 2 niveles consecutivos 180 mg / dL, deberán monitorizarse los niveles cada 1 o 2 horas hasta que los valores de glucosa y las tasas de infusión de insulina son estables posteriormente se pueden espaciar cada 4 horas.<sup>(13)</sup>

## **TERAPIA DE REEMPLAZO RENAL**

Las terapias de reemplazo renal continuo y la hemodiálisis son equivalentes en pacientes con sepsis grave e insuficiencia renal aguda. Deberán de utilizarse terapias continuas para facilitar el manejo del balance de líquidos en pacientes hemodinamicamente inestables.<sup>(13)</sup>

## **BICARBONATO**

Restringir su uso para mejorar la hemodinámica o los requerimientos de vasopresores en pacientes con acidosis láctica secundaria a hipoperfusión con pH <7.15.<sup>(13)</sup>

## **PROFILAXIS DE TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA**

La farmacoprofilaxis diaria se realizará con heparina subcutánea de bajo peso molecular. Si la depuración de creatinina es <30 ml / min, se deberá usar dalteparina.

Los pacientes con contraindicación para el uso de heparina deben utilizar medias de compresión graduadas o dispositivos de compresión intermitente.<sup>(13)</sup>

## **PROFILAXIS DE ÚLCERAS POR ESTRÉS**

Deberá realizarse con bloqueadores H<sub>2</sub> o inhibidor de la bomba de protones.<sup>(13)</sup>

## **NUTRICIÓN**

Se debe de iniciar la alimentación enteral en lugar de un ayuno completo en las primeras 48 horas después del diagnóstico. Se deberá de evitar la administración calórica completa en la primera semana (por ejemplo, hasta 500 calorías por día), avanzando solo según lo tolerado.

Deberá combinarse un aporte de glucosa intravenosa y nutrición enteral en lugar de la nutrición parenteral total sola los primeros 7 días después del diagnóstico<sup>(13)</sup>

## **DIRECTRICES ACTUALES**

En la última actualización de la campana de sobrevivir a la sepsis basado en las guías 2016, el cambio más importante es que las directrices de 3 horas y 6 horas se han combinado en una directriz de 1 hora que se enfoca principalmente en :

- Medición seriada de lactato si el inicial es > de 2 mmol
- Obtención de cultivos previo al inicio de antibióticos
- Administración de antibióticos de amplio espectro
- Inicio de cargas de solución cristalinoide 30ml/kg en caso de hipotensión o lactato >4 mmol
- Inicio de vasopresores si el paciente permanece hipotenso durante o después de la reanimación hídrica para mantener presión arterial media mayor de 65mmHg

Objetivos durante las primeras 6 horas:

- Presión venosa central (CVP) 8–12 mm Hg
- Presión arterial media (MAP)  $\geq$  65 mm Hg c)
- Uresis  $\geq$  0.5 ml / kg / h)
- Saturación Venosa central de 70% o saturación venosa mixta de 65%
- Mediciones seriadas de lactato para guiar la reanimación.<sup>(13)</sup>

## **MARCADORES BIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA INFECCIÓN Y A SEPSIS EN LOS NIÑOS GRAVES**

### **Alteración leucocitaria**

La determinación del recuento leucocitario y neutrófilos es la prueba más accesible aunque con baja sensibilidad y especificidad. Si la etiología bacteriana, el recuento leucocitario puede ser normal, alto o bajo. Un paciente con leucopenia menor de 5.000 mm<sup>3</sup> puede presentar una infección de origen viral o bacteriana grave; es un factor de gravedad al igual que la neutropenia. La leucocitosis (>20.000 mm<sup>3</sup>) y neutrofilia (>10.000 mm<sup>3</sup>) se asocian con infección bacteriana. En menores de 1-2 años, la relación banda neutrófilo es inferior a 0,12 y 0,20 respectivamente, denotando también una infección bacteriana.<sup>(17)</sup>

### **Velocidad de sedimentación globular**

La velocidad de eritrosedimentación (VSG) es una prueba barata y con baja especificidad. Un paciente con fiebre y VSG elevada (mayor de 30 mm/h) probablemente tiene una infección, la infección bacteriana tiende a incrementar más la VSG que la infección viral. Sin embargo algunas situaciones en particular, elevan muy intensamente la VSG (>100 mm/h), como tuberculosis, pielonefritis, conectivopatías autoinmunes y cáncer.<sup>(17)</sup>

### **Proteína C reactiva**

Proteína plasmática sintetizada por el hepatocito, que después de una la injuria su concentración plasmática comienza a elevarse a las 6 horas, con un pico máximo a las 50 horas del estímulo (infeccioso, trauma, cirugía, quemaduras, etcétera). La sensibilidad y especificidad de la PCR como marcador de infección bacteriana es tanto mayor cuanto más altos son los niveles plasmáticos, valores  $\geq$ 8 mg/dl son muy específicos (98%) pero poco sensibles (63%), PCR bajas suelen acompañar a procesos virales.

La PCR es útil para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones bacterianas invasoras, las determinaciones seriadas se utilizan para monitorización de la respuesta al tratamiento. La caída del 25% de los valores de PCR tiene una alta sensibilidad (97%) y especificidad (96%) para el diagnóstico de resolución de la sepsis.<sup>(17)</sup>

### **Lactato**

Su nivel se correlaciona con la evolución de la sepsis y sirve para valorar la respuesta al tratamiento.

### **Coagulación**

Toda sepsis tiene repercusión en el sistema de la coagulación. Los hallazgos pueden variar desde mínimas alteraciones en los parámetros básicos de laboratorio hasta una coagulación intravascular diseminada (CID), que es un signo de mal pronóstico.<sup>(14)</sup>

## **Procalcitonina**

La PCT es la prohormona de la calcitonina y se describió como un nuevo e innovador parámetro de infección en adultos en 1993. En individuos sanos las concentraciones séricas son muy bajas (< 0,5 ng/ml) y en infecciones graves asciende hasta 1.000 ng/ml, presenta una rápida inducción a las 3 h del contacto con la endotoxina, con un pico a las 6 h y una vida media de 25-30 h .

La PCT tiene mayor utilidad que la PCR para el diagnóstico de la infección siendo más precoz y más sensible. La PCT disminuye a los valores normales cuando el tratamiento es eficaz a los 2-3 días, mientras que la PCR lo hace a los 3-7 días. <sup>(17)</sup>

## **Citocinas**

Las citocinas se liberan por los macrófagos y otras células como respuesta a una agresión, su principal función modular la respuesta inflamatoria. En la sepsis aumenta la concentración de citocinas proinflamatorias, (IL-1a, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-) y se reducen las antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13). Las citocinas proinflamatorias son las responsables de la clínica infecciosa, fiebre, vasodilatación, shock, alteración del recuento leucocitario y elevación de reactantes de fase aguda.

Por ello se ha utilizado la determinación de diversas citocinas como marcador biológico de infección, siendo las más empleadas han sido IL-6, IL-8 y TNF. <sup>(9)</sup>

## **Marcadores en choque séptico**

Aunque Sepsis-3 recomienda el uso de hiperlactatemia para identificar "anomalías metabólicas celulares" en adultos, el grupo de trabajo reconoció que es poco probable que los niveles de lactato en la sangre capturen la imagen completa de los trastornos metabólicos en pacientes con shock. Sin embargo, el lactato elevado representa incapacidad de las células para utilizar eficazmente el oxígeno para producir energía (ATP) a través del metabolismo aeróbico mitocondrial evidenciando que las anomalías metabólicas celulares están presentes en el shock séptico pediátrico. <sup>(13)</sup>

# **DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO**

## **HEMOCULTIVO**

La presencia de microorganismos en la sangre de un paciente supone un hecho de máxima trascendencia diagnóstica y pronóstica, realizándose a través de hemocultivos. A pesar del paso de los años y los avances tecnológicos el Hemocultivo constituye el método de elección (gold standard) para el diagnóstico infeccioso y permite la identificación de microorganismos patógenos y la susceptibilidad de éstos a los distintos antimicrobianos. <sup>(16)</sup>

La bacteriemia y fungemia se asocian a una elevada morbilidad y una mortalidad que oscila entre el 20 y el 50% y aparecen cuando se supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos. Esta invasión puede producirse desde un foco infeccioso extravascular o endovascular. El origen más frecuente de bacteriemia/fungemia son infecciones en dispositivos intravasculares (19%), tracto genitourinario (17%) y el tracto respiratorio (12%). <sup>(17)</sup>

## **Indicaciones**

Se indica su obtención siempre que haya sospecha clínica de sepsis o fiebre de origen desconocido, infecciones invasivas (meningitis, pielonefritis, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos o neumonía), que con frecuencia cursan con bacteriemia y hemocultivos positivos. <sup>(18)</sup>

## Identificación microbiológica

En los últimos años los sistemas automáticos de incubación y seguimiento de hemocultivo eliminan la manipulación, realizan una lectura continua de los frascos de cultivo, y notifican inmediatamente los resultados positivos mediante la detección del dióxido de carbono producido por los microorganismos los datos obtenidos pasan a un ordenador donde se analizan y determinan cuándo se produce crecimiento bacteriano, disminuyendo el número de falsos positivos y negativos.

## Interpretación de los resultados

Se debe realizar la distinción entre bacteriemias verdadera y falsa. Microorganismos como *S. aureus*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *estreptococos betahemolíticos*, son la causa de bacteriemias verdaderas en más del 90% de los casos.

Por el contrario, los *estafilococos coagulasa negativa*, *Streptococcus del grupo viridans*, *Corynebacterium spp.*, *P. acnes*, *Bacillus spp.* y algunas especies de *Clostridium* que, en conjunto, suponen menos del 5% de las bacteriemias verdaderas. Cabe resaltar que en determinadas situaciones los estafilococos coagulasa negativos y los estreptococos del grupo viridans, (bacteriemia asociada a catéter, bacteriemia en inmunodeprimidos), son la causa de auténticas bacteriemias Otro factor que también indica contaminación es el tiempo en que el hemocultivo se detecta como positivo. Los cultivos en los que crece un microorganismo contaminante, se presentan a 3 días de incubación.

Todos los hemocultivos positivos deben ser informados inmediatamente y el resultado obtenido debe valorarse de forma conjunta por microbiólogos y clínicos.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los tiempos largos en el diagnóstico de patógenos causantes de sepsis retrasa el tratamiento a los pacientes y aumenta de forma considerable la mortalidad, por lo que la batalla contra las enfermedades infecciosas, ha hecho necesario el desarrollo de nuevas técnicas eficaces que apoyen al diagnóstico clínico, y dentro de estas, se han generado técnicas de laboratorio con fundamento en biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR o Polymerase Chain Reaction).

La PCR sirve para amplificar in vitro secuencias específicas de ADN a partir de cantidades mínimas (picogramos). Aprovecha propiedades físico-químicas del ADN: desnaturalización mediante calor y renaturalización con bajas temperaturas, y replicación en presencia de la enzima ADN polimerasa y nucleótidos.

Para realizarla es necesario tener: El ADN que se quiere amplificar; enzima ADN polimerasa; nucleótidos adenina, citosina, guanina y timina; par de oligonucleótidos o cebadores (pequeños fragmentos de aproximadamente 20 nucleótidos de ADN, complementarios a cada uno de los extremos del fragmento que se desea amplificar).

La técnica consiste en múltiples ciclos repetitivos en los cuales ocurren tres reacciones simples, facilitadas por cambios en la temperatura de incubación de las muestras.

Estas tres fases son:

- 1.- Desnaturalización, durante la cual, una elevada temperatura (superior a 90°C) produce la separación, por rotura de los puentes de hidrógeno, de ambas cadenas complementarias del ADN
2. Fase de alineamiento o unión de los cebadores a cada una de las hebras del ADN desnaturalizado. En esta etapa, el descenso de la temperatura hace que las hebras tiendan a

renaturalizarse, pero la presencia de los cebadores provoca que este proceso tenga lugar entre las dos cadenas de ADN y cada uno de los dos cebador (cada cadena con su cebador respectivo). La temperatura óptima de alineamiento es propia de cada oligonucleótido, y su puesta a punto es fundamental para obtener una amplificación específica (sólo del fragmento que nos interesa) y eficaz (gran número de copias del mismo).

3. Amplificación: ocurre la síntesis de la nueva cadena mediante la unión de nucleótidos complementarios a la cadena molde por la enzima ADN polimerasa. La enzima más utilizada, llamada Taq polimerasa, se aisló de una bacteria que vive en aguas termales y resiste bien las elevadas temperaturas de la PCR.

Finalizada la amplificación, vuelve a producirse la desnaturalización, dando comienzo el segundo ciclo. En el primer ciclo partimos de una molécula de ADN con dos cadenas complementarias, que actúan de molde para la formación de dos nuevas cadenas complementarias, (dando lugar a 2 moléculas de ADN). En el segundo ciclo disponemos 4 cadenas de las que se producen otras 4. En el tercero, se comienza con 8 cadenas produciéndose otras 8, y así progresivamente, ocurriendo una multiplicación geométrica en cada ciclo. De este modo, al final del experimento, que normalmente se prolonga entre 30 a 40 ciclos y tiene una duración de 3 a 5 horas, se obtienen millones de copias del gen que nos interesa estudiar.<sup>(19)</sup>

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las técnicas de biología molecular con alta especificidad dado por la hibridación de oligonucleótidos que delimitan una región del genoma del patógeno de interés, y elevada sensibilidad al amplificar millones de copias de esta región, lo que permite su detección, estas técnicas han mostrado una sensibilidad media del 90% y una especificidad del 96% en comparación con los hemocultivos <sup>(20)</sup>.

Sin embargo a pesar del gran alcance que tienen las técnicas de Biología Molecular su implementación como auxiliar en el apoyo al diagnóstico sigue siendo limitado en los centros de salud mexicanos, debido al desconocimiento de estas nuevas metodologías.

En el presente proyecto se propone al arreglo Microbiano de sepsis por PCR en tiempo real, como una herramienta útil para detectar bacterias patógenas y hongos asociados a infecciones del torrente sanguíneo. Esta matriz contiene ensayos para la detección de 89 patógenos bacterianos gram-negativos, gram-positivos y algunas especies fúngicas como lo son *Aspergillus* y *Candida*. Esta matriz también contiene ensayos de resistencia a antibióticos. Este ensayo usa oligonucleótidos para la amplificación de una región de interés y la detección se realiza a través de sondas de hidrolisis, que aumentan su especificidad.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El manejo de los pacientes con sepsis es uno de los retos más importantes de la medicina intensiva. Los tiempos largos en el diagnóstico de patógenos causantes de sepsis retrasa el tratamiento a los pacientes y aumenta de forma considerable la mortalidad. Las técnicas de Biología Molecular constituyen una poderosa herramienta para el diagnóstico microbiológico, idealmente con una alta sensibilidad y especificidad que pueda ser accesible a la población y que se puede obtener en periodos mucho menores que el hemocultivo.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las técnicas de Biología Molecular con alta especificidad dado por la hibridación de oligonucleótidos que delimitan una región del genoma del patógeno de interés, y elevada sensibilidad al amplificar millones de copias de esta región, lo que permite su detección. Sin embargo a pesar del gran alcance que tienen las técnicas de Biología Molecular su implementación como auxiliar en el apoyo al diagnóstico sigue siendo limitado, debido al desconocimiento de estas nuevas metodologías.

## **JUSTIFICACIÓN**

La prueba confirmatoria de septicemia es la identificación del agente etiológico, siendo el hemocultivo el estándar de oro, sin embargo factores como los tiempos largos de identificación, el difícil cultivo de algunos microorganismos y la conservación de la muestra contribuyen a que más del 50 % de los cultivos resulten negativos. El arreglo de PCR en tiempo real de patógenos asociados a sepsis es una buena alternativa para la identificación en menor tiempo de los agentes etiológicos más comunes en pacientes con un proceso de sepsis, que tendrá en la toma de decisiones del médico tratante.

## **HIPÓTESIS**

La reacción en cadena de la polimerasa identifica con mayor especificidad los microorganismos más comunes en pacientes con sepsis en las diferentes terapias comparado con los resultados de hemocultivo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Implementar la detección de microorganismos asociados a sepsis por PCR tiempo real y evaluar los resultados positivos y negativos obtenidos.

### **Objetivos específicos**

- I. Implementar la detección de microorganismos asociados a sepsis por PCR tiempo real.
- II. Evaluar el porcentaje de resultados positivos a microorganismo asociados a sepsis por PCR tiempo real vs hemocultivo.
- III. Evaluar el porcentaje de resultados negativos a microorganismo asociados a sepsis por PCR tiempo real vs hemocultivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio observacional, descriptivo. Donde se incluirán 30 participantes con cuadro clínico de sepsis de la Terapia Intensiva Pediátrica, y que estén por iniciar tratamiento con fármacos. A estos participantes se les tomará dos muestras de sangre venosa en condiciones de asepsia y al mismo tiempo. Una de las muestra de sangre será utilizada para la identificación del patógeno causal de sepsis por hemocultivo de acuerdo a las prácticas clínicas establecidas en el hospital.

Se realiza asepsia de la piel antes de la extracción de hemocultivos para evitar la contaminación con flora saprofita de la piel. Se realiza con antisépticos cutáneos, como compuestos yodados (tintura de yodo al 1-2% o povidona yodada al 10%) o con clorhexidina. Si se necesita palpar la vena antes de la extracción, el dedo enguantado debe limpiarse con antiséptico antes de la palpación; se obtiene sangre de una única venopunción inoculada en dos frascos diferentes, (aerobios y anaerobios).

Se considera ideal para el diagnóstico de cualquier bacteriemia/fungemia la realización de 3 hemocultivos tomados con el menor intervalo de tiempo posible después de la aparición de los signos compatibles con bacteriemia (fiebre, escalofríos, etc.). Cada extracción debe realizarse en lugares de venopunción diferentes de los miembros superiores. Debe evitarse la extracción de sangre a través de catéteres, salvo en casos de sospecha de infección relacionada con el catéter.

La extracción de sangre se realizará siempre con guantes y se procederá de la siguiente forma:

1. Limpiar los tapones de los frascos de hemocultivos con solución antiséptica.
2. Colocar el compresor al paciente tras elegir la vena a pinchar.
3. Pintar ampliamente con solución antiséptica la piel de la zona a pinchar (al menos en un diámetro de 5 cm). A continuación se pintarán las yemas de los dedos índice, medio y pulgar de la mano utilizada para la palpación de la vena.
4. Extraer la mayor cantidad posible en los niños, a ser posible una cantidad mínima de 2 ml (1 ml por frasco).

En niños de corta edad no existe problema en utilizar los mismos frascos que en adultos, aunque la cantidad de sangre introducida sea menor.

El volumen de sangre óptimo en neonatos y niños no está definido con total certeza. Los datos de la literatura sí establecen que, al igual que en los adultos, a mayor volumen de sangre cultivada mayor porcentaje de bacteriemias/fungemias detectadas. En neonatos hasta un año (< 4 kg) se recomiendan volúmenes mínimos siempre que sea posible de 0,5 a 1,5 ml por cada frasco.

Los frascos de cultivo, con su debida identificación, deben transportarse al laboratorio inmediatamente. Si no pueden enviarse inmediatamente al laboratorio, se incubarán en una estufa a 35-37 °C hasta ese momento. Los hemocultivos que van a procesarse en sistemas automáticos pueden mantenerse a temperatura ambiente o a 35-37 °C.

Una segunda muestra se tomara en un tubo con EDTA con una cantidad mínima de 1 mL para el caso de neonatos y pediátricos, esta muestra será enviada inmediatamente al laboratorio de Medicina Genómica para su procesamiento y búsqueda del patógeno causante de sepsis por medio de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

A partir de la sangre total se extraerá el ADN genómico con el kit de extracción QIAamp UCP Pathogen Mini kit (Qiagen), se cuantificara el ADN en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific). Del ADN extraído se preparara una mezcla de reacción y se colocara en el carril de tubos del kit Microbial DNA qPCR Array- sepsis: Cat. no. 330261 BAID-1903ZRA (Qiagen).

El Kit con las muestras cargadas se llevara al termociclador Rotor Gene para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa de acuerdo con las condiciones establecidas por el fabricante, y finalmente los resultados se analizaran en el programa Baid-1903 sepsis microbial id data analysis (Qiagen) para identificar al patógeno presente en la muestra, el cual utiliza los valores importados del Ct generados por el termociclador.

## **CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE PACIENTES**

### **Criterios de Inclusión**

Pacientes ingresados en la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica que cumplan con criterios diagnósticos de sepsis y que cuenten con hemocultivo, citometría hemática, proteína C reactiva obtenidas de sangre venosa.

### **Criterios de Exclusión**

Muestras que no cumplan con el cuadro clínico de sepsis.  
Muestras que no provienen de sangre venosa.  
Muestras que no hayan considerado la muestra paralela para la identificación por hemocultivo.

### **Criterios de eliminación**

Muestras insuficientes para la extracción del material genético.  
Muestras que no se cuente con las variables de observación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de los pacientes ingresados en la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos, se realizó una evaluación clínica y paraclínica de los mismos para valorar que pacientes cumplieran con los requisitos para la inclusión al presente trabajo de investigación.

Sin embargo, con la definición más reciente sepsis que incluye una infección sospechada o documentada asociada a disfunción orgánica con incremento agudo de dos o más puntos en la escala de pSOFA, la inclusión de pacientes se reduce de forma significativa.

Lo anterior deriva de un mayor acceso a los servicios de salud de la población general, con la mejora de programas de prevención y atención oportuna de infecciones en el primer nivel de atención, aunado de una serie de medidas, programas y barreras en el segundo y tercer nivel de atención médica cuyo objetivo final es la disminución de infecciones nosocomiales. Particularmente en la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica se implementa el lavado de manos en los 5 momentos correspondientes, los programas “No te pases de la raya”, “Neumonía cero”, el uso preferente de ventilación no invasiva, la aplicación baños con clorhexidina previo a la realización de cirugías cardíacas, la capacitación constante del personal, el uso de antibioticoterapia profiláctica en procedimientos programados, entre otras han disminuido de forma significativa la incidencia de infecciones intrahospitalarias y sepsis.

Aunado a lo anterior el empleo de guías internacionales para la prevención y manejo de sepsis y choque séptico han disminuido su presentación debido a que ante la sospecha de cualquier proceso infeccioso se administra dentro de la primera hora tratamiento antimicrobiano empírico de amplio espectro debido a que se ha demostrado que disminuye la morbimortalidad de los pacientes, con lo que la presentación de disfunción orgánica o el incremento agudo de los valores en la escala de pSOFA se puede ver modificada o incluso revertida antes de cumplir los criterios de sepsis o choque séptico.

Por todo lo previamente comentado aunado a la disminución de la cantidad de pacientes que ameritan soporte intensivo en la edad pediátrica existieron muchas limitantes para completar el tamaño de la muestra esperado.

En la tabla 6 y 7 se muestran los datos clínicos de los participantes del estudio.

**Tabla 6 Características generales de las muestras**

| <b>Id de muestra*</b>                         | <b>2-TTPR</b> | <b>6-LYMA</b> | <b>7-HGA</b> | <b>8-RMI</b> | <b>9-BVM</b> |
|---|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Genero</b>                                 | Femenino      | Masculino     | Masculino    | Masculino    | Femenino     |
| <b>Edad</b>                                   | 9 meses       | 1 mes         | 1 año        | 3 años       | 2 meses      |
| <b>Recuento leucocitario (mg/dL)</b>          | 13            | 16.7          | 16.5         | 17,2         | 12.7         |
| <b>Proteína C Reactiva (mg/dL)</b>            | 1.06          | 13.8          | 10.9         | 4,1          | 0.72         |
| <b>pSOFA</b>                                  | 8             | 3             | 2            | 2            | 2            |
| <b>Hemocultivo</b>                            | Negativo      | Positivo      | Negativo     | Negativo     | Positivo     |
| <b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>    | Negativo **   | Negativo **   | Negativo **  | Positivo     | Negativo **  |
| <b>Días con tratamiento farmacológico ***</b> | 5 días        | 4 días        | 7 días       | 4 días       | 8 días       |

\*El ID de la muestra corresponde al número de muestra procesada y a las iniciales del nombre y apellidos del paciente.

\*\*Del panel de muestras no se amplificó material genético de algún de los microorganismos analizados en el panel.

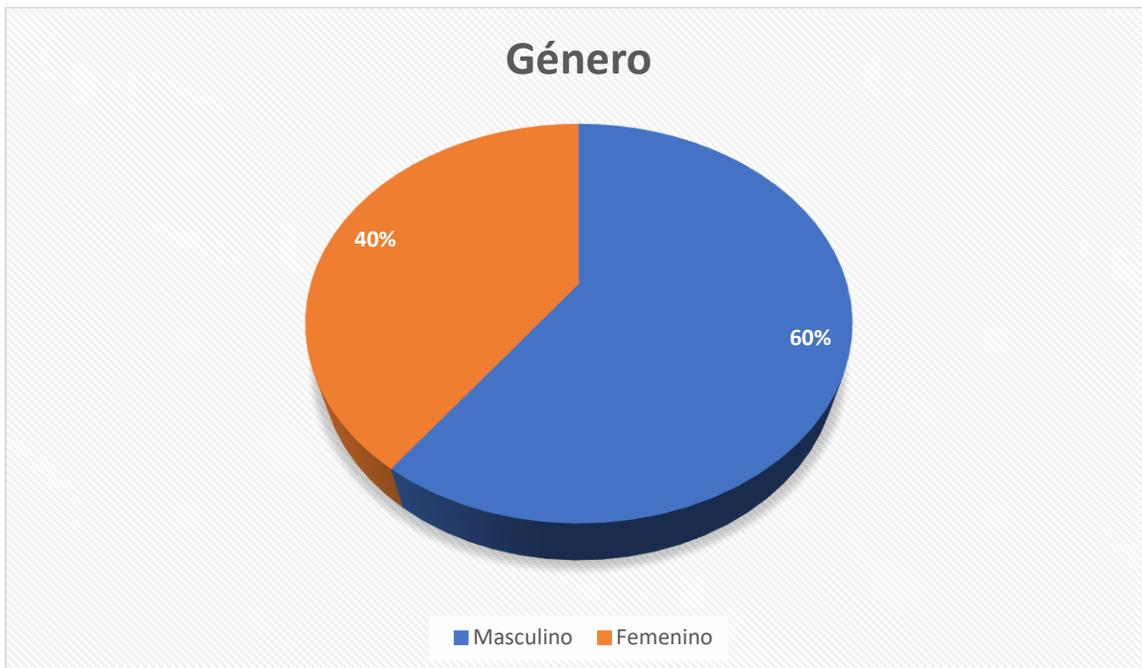
\*\* \*Días con tratamiento al momento de la toma de muestra.

- El ID de la muestra corresponde al número de muestra procesada y a las iniciales del nombre y apellidos del paciente.

| <b>Tabla 7 Escala pSOFA de participantes</b> |               |               |              |              |              |
|--|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Id muestra</b>                            | <b>2-TTPR</b> | <b>6-LYMA</b> | <b>7-HGA</b> | <b>8-RMI</b> | <b>9-BVM</b> |
| <b>pSOFA</b>                                 | 8             | 3             | 2            | 2            | 2            |
| <b>Respiratorio</b>                          | 3             | 2             | 2            | 0            | 1            |
| <b>Hematología</b>                           | 2             | 0             | 0            | 0            | 0            |
| <b>Hígado</b>                                | 0             | 0             | 0            | 0            | 0            |
| <b>Cardiovascular</b>                        | 3             | 0             | 0            | 0            | 0            |
| <b>Sistema Nervioso Central</b>              | 0             | 0             | 0            | 0            | 0            |
| <b>Renal</b>                                 | 0             | 1             | 0            | 0            | 1            |

Del total de las muestras procesadas podemos identificar que 3 de los pacientes corresponden al sexo masculino y 2 pertenecen al sexo femenino, el periodo de mayor presentación de sepsis en la edad pediátrica corresponde a los lactantes con un 80% de la población estudiada, con un 20% correspondiente a los preescolares, siendo la edad media de presentación de 12 meses.

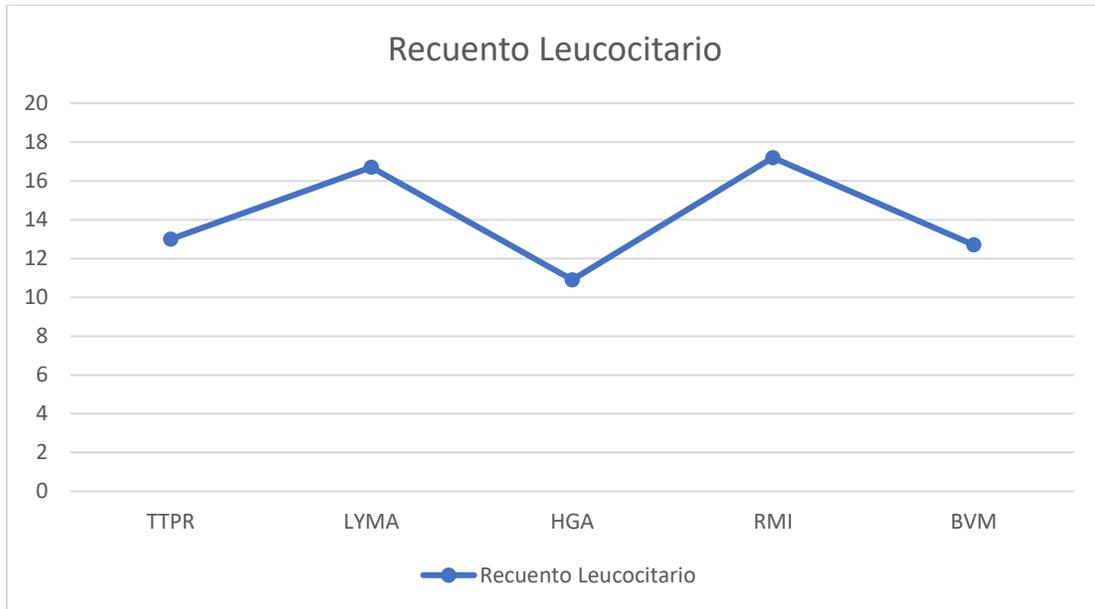
#### **GRAFICA 1 UNIVERSO DE TRABAJO**



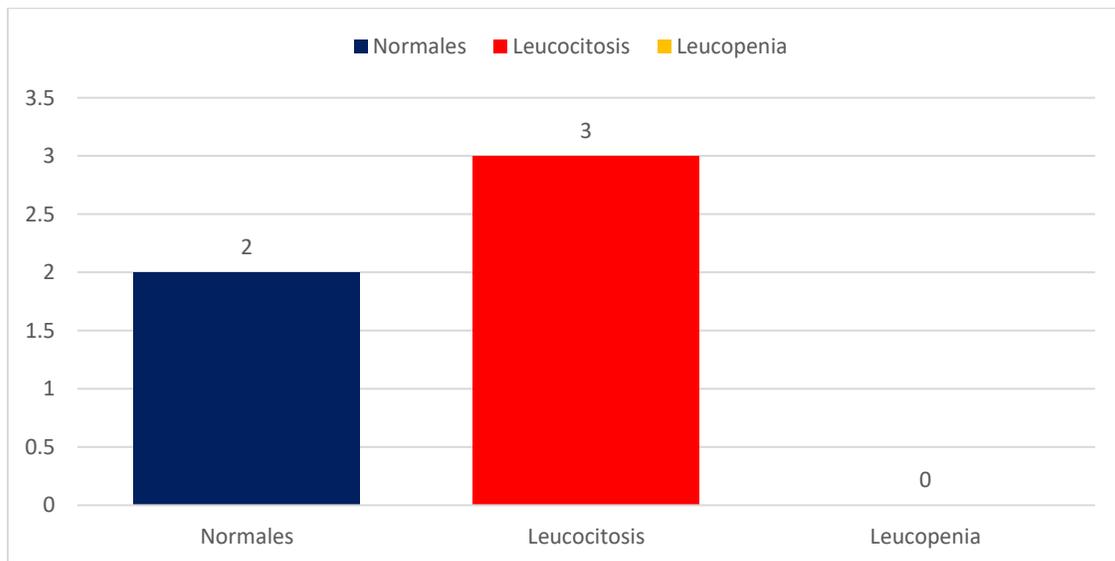
Con respecto al recuento leucocitario se puede apreciar que un 60% de los pacientes presentan leucocitosis mientras que el 40% restante presentaron cifras leucocitarias normales al momento de la toma de la muestra. Lo anterior es de llamar la atención debido a que uno de los criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que anteriormente se utilizaba para la inclusión de

sepsis es la presencia de leucocitosis y/o leucopenia y a pesar de su ausencia se cuenta con un hemocultivo positivo en un 20% de los pacientes con recuento leucocitario normal.

**GRAFICA 2 RECUENTO LEUCOCITARIO**

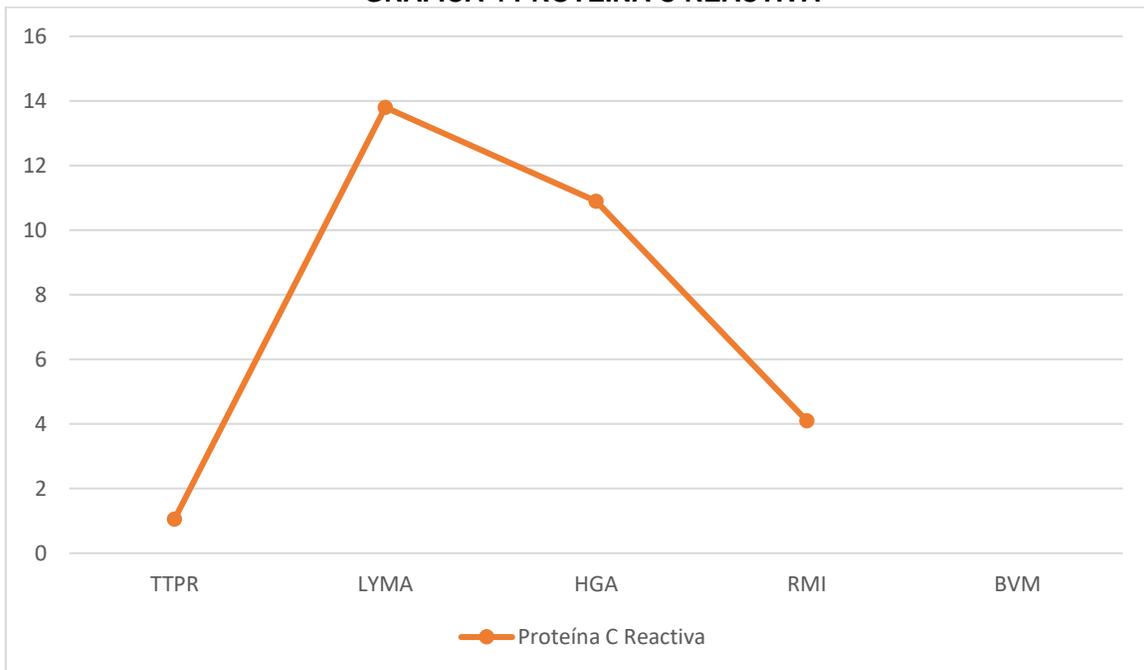


**GRAFICA 3 ANORMALIDADES DEL RECUENTO LEUCOCITARIO**

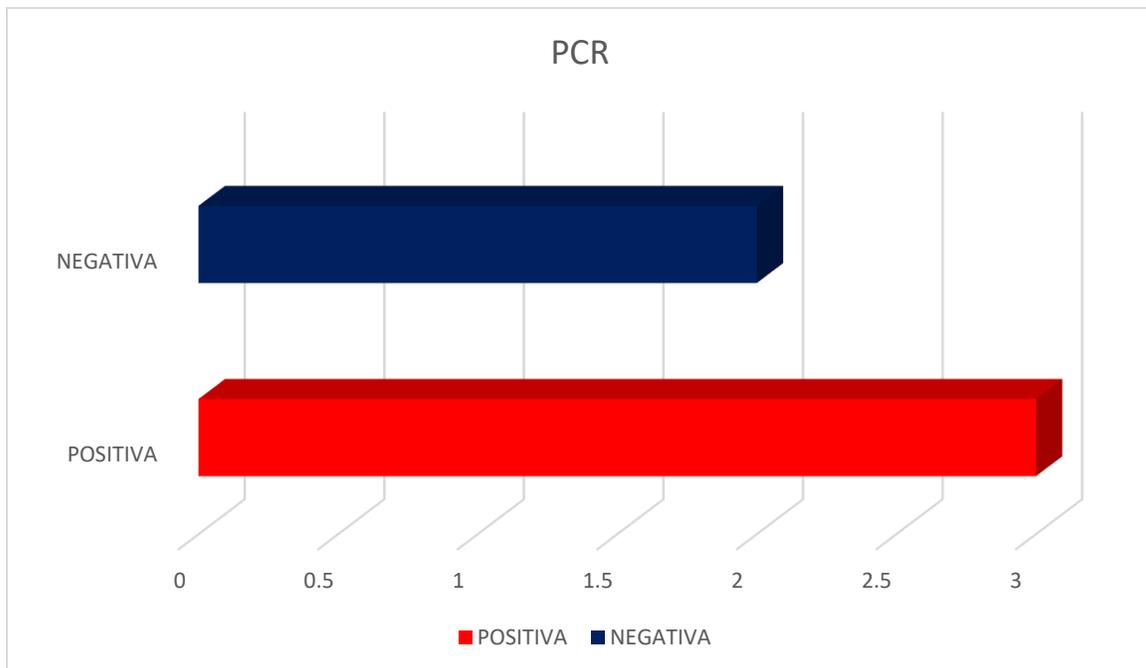


En lo que respecta a la proteína C reactiva un 60% de los pacientes presentaron incremento de este biomarcador y sólo un 20% de los pacientes con proteína C reactiva dentro de rangos de normalidad presentó un aislamiento microbiológico por Hemocultivo lo que nos demuestra que la negatividad de este reactante de fase aguda no traduce ausencia de bacteremia, sepsis o choque séptico.

**GRAFICA 4 PROTEINA C REACTIVA**



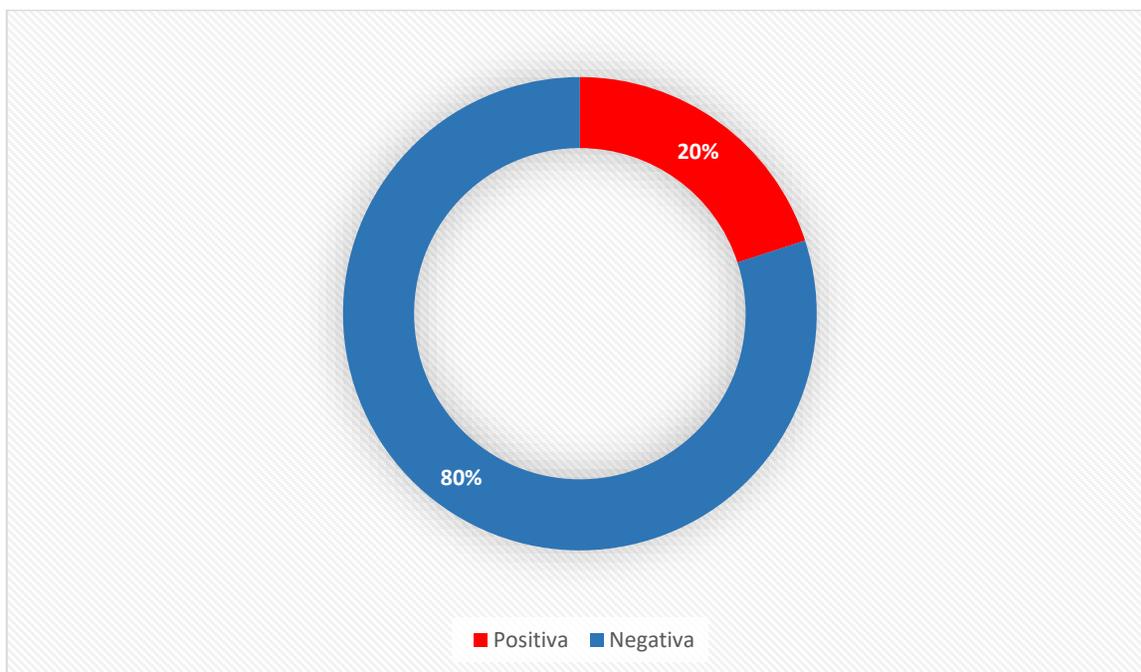
**GRAFICA 5 POSITIVIDAD DE LA PROTEINA C REACTIVA**



El incremento agudo de 2 puntos en la escala de pSOFA se encontró en el 100% de los pacientes siendo el puntaje máximo obtenido de 8 puntos y el puntaje mínimo de 2 puntos; sin embargo puntuaciones más altas o más bajas no traducen ni se correlacionan con un mayor aislamiento microbiológico.

La reacción en cadena de la polimerasa arrojo resultados positivos en el 20% de los pacientes, llamando la atención que existió una mayor positividad a un mayor recuento leucocitario y a un menor día de uso de manejo antimicrobiano.

**GRAFICA 7 POSITIVIDAD DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA**



Dentro del manejo antimicrobiano establecido previo a la toma de la muestra para hemocultivo y PCR un 60% de los pacientes se encontraban bajo tratamiento médico a base de un carbapenémico y un 80% de los pacientes tenían un régimen antibiótico combinado de al menos 2 antibióticos, y sólo un 20% se encontraba en monoterapia; la combinación de antibióticos más utilizada fue meropenem-vancomicina en 40% de los pacientes.

Lo anterior toma relevancia clínica y paraclínica debido a que los antibióticos de amplio espectro pueden disminuir la sensibilidad para la detección de microorganismo en sangre por cualquiera de los métodos diagnósticos utilizados.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el arreglo Microbiano de sepsis por PCR en tiempo real, esta matriz contiene ensayos para la detección de 89 patógenos bacterianos gram-negativos, gram-positivos y algunas especies fúngicas como lo son *Aspergillus* y *Candida*. Además contiene ensayos de resistencia a antibióticos como se muestra en la tabla 8.

|                                    |                                       |                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Achromobacter xylosoxidans</i>  | <i>Enterococcus faecalis</i>          | <i>Prevotella intermedia</i>      |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>     | <i>Enterococcus faecium</i>           | <i>Prevotella melaninogenica</i>  |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>   | <i>Propionibacterium acnes</i>    |
| <i>Aerococcus viridans</i>         | <i>Escherichia coli</i>               | <i>Proteus mirabilis</i>          |
| <i>Aeromonas enteropelogenes</i>   | <i>Exiguobacterium aurantiacum</i>    | <i>Proteus vulgaris</i>           |
| <i>Aeromonas veronii</i>           | <i>Fusobacterium mortiferum</i>       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     |
| <i>Alcaligenes faecalis</i>        | <i>Fusobacterium necrophorum</i>      | <i>Streptococcus agalactiae</i>   |
| <i>Aspergillus flavus</i>          | <i>Fusobacterium nucleatum</i>        | <i>Staphylococcus arlettae</i>    |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>       | <i>Fusobacterium varium</i>           | <i>Streptococcus anginosus</i>    |
| <i>Bacillus anthracis</i>          | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | <i>Streptococcus mitis</i>        |
| <i>Bacillus cereus</i>             | <i>Haemophilus influenzae</i>         | <i>Streptococcus mutans</i>       |
| <i>Bacillus sonorensis</i>         | <i>Hafnia alvei</i>                   | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   |
| <i>Bacteroides fragilis</i>        | <i>Helicobacter pylori</i>            | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   |
| <i>Bifidobacterium longum</i>      | <i>Kocuria kristinae</i>              | <i>Streptococcus pyogenes</i>     |
| <i>Brevibacterium casei</i>        | <i>Leifsonia aquatica</i>             | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| <i>Brevundimonas diminuta</i>      | <i>Methylobacterium fujisawaense</i>  | <i>Streptococcus sanguinis</i>    |
| <i>Brevundimonas vesicularis</i>   | <i>Methylobacterium zatmanii</i>      | <i>Streptomyces bikiniensis</i>   |
| <i>Burkholderia vietnamiensis</i>  | <i>Micrococcus luteus</i>             | <i>Streptomyces mediolani</i>     |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i>   | <i>Morganella morganii</i>            | <i>Vibrio cholerae</i>            |
| <i>Candida albicans</i>            | <i>Neisseria meningitidis</i>         | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>    |
| <i>Candida glabrata</i>            | <i>Nocardia farcinica</i>             | <i>Vibrio vulnificus</i>          |
| <i>Candida krusei</i>              | <i>Ochrobactrum tritici</i>           | <i>Weissella confusa</i>          |
| <i>Candida parapsilosis</i>        | <i>Paenibacillus larvae</i>           | <i>Yersinia enterocolitica</i>    |
| <i>Candida tropicalis</i>          | <i>Paenibacillus macerans</i>         | <i>Yersinia pestis</i>            |
| <i>Citrobacter freundii</i>        | <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>  | <i>Staphylococcus aureus</i>      |
| <i>Clostridium perfringens</i>     | <i>Pediococcus acidilactici</i>       | <i>Resistencia Beta-lactamasa</i> |
| <i>Clostridium sordellii</i>       | <i>Plesiomonas shigelloides</i>       | <i>Aspergillus</i>                |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> |                                       | <i>Candida</i>                    |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> |                                       |                                   |
| <i>Enterobacter cloacae</i>        |                                       |                                   |

La metodología utilizada; una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa posee una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la región de interés, sin embargo este kit solo ha sido utilizado con fines de investigación, este en el sentido ha sido probado en cultivos bacterianos, pero hasta el momento no ha sido validado o utilizado en muestras de pacientes.

El reto de este tipo de nuevas metodologías de biología molecular lo representa la ruta crítica que va desde la toma de muestra, el transporte y procesamiento de la misma. Factores que pueden afectar el resultado de la determinación. Una mala asepsia en la toma de muestra puede contribuir a una contaminación cruzada y si el kit contiene los reactivos necesarios para su detección, los resultados que obtendremos serán un falso positivo. Esto también podría ocurrir si hay un mal manejo de la muestra o manipulación durante el transporte o procesamiento, la alta sensibilidad de la prueba nos puede generar falsos positivos.

Como se muestra en la tabla 10 una de las muestras fue tomada de catéter en la cual se detectaron 2 patógenos diferentes. Las demás fueron tomadas por venopunción.

Por otro lado tiempos prolongados desde la toma de muestra y el procesamiento generaran que el DNA de los patógenos se degrade y no se pueda dar la amplificación de la secuencia genómica de interés, obteniendo un resultado negativo (falso negativo).

Como ya se mencionó el tratamiento farmacológico puede disminuir la sensibilidad de las pruebas, de inicio se había planteado que los participantes a incluirse en este proyecto no tuvieran tratamiento, pero la gran mayoría ya vienen referidos de otros centros de salud y con varios días de tratamiento. Este es el reto de las nuevas pruebas, adecuarse a la realidad de las condiciones existentes.

En la tabla 9 se muestran los resultados de la detección del patógeno por PCR en tiempo real, esta técnica se realizan ciclos exponenciales de amplificación de la secuencia de ADN, para este kit se utilizaron 40 ciclos. Las secuencias que se llegan a detectar antes de un ciclo de amplificación menor a un ct 34, el software las considera positivas o detectables (+), sin embargo las secuencias que amplifican o se detectan a partir del ct 34 al 37 el software arroja un valor indeterminado (+/-) y para estos se tendría que volver a correr la prueba con más material genético para poder saber si es positivo o negativo para este patógeno, en los ct >38 el software nos da un resultado no detectable (-), ver tabla 9 y 10.

| Tabla 9. Resultados de detección de patógenos por PCR tiempo real                                  |        |        |       |       |       |
|--|--------|--------|-------|-------|-------|
| Especies/ Id muestras  | 2-TTPR | 6-LYMA | 7-HGA | 8-RMI | 9-BVM |
| Brevundimonas diminuta   | -      | -      | -     | +/-   | -     |
| Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia pyrocinia, Burkholderia cenocepacia, Burkholderia cepacia | -      | +/-    | -     | +/-   | -     |
| Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae   | +/-    | +/-    | +/-   | -     | -     |
| Methylobacterium zatmanii  | -      | -      | -     | +/-   | -     |
| Prevotella intermedia  | +/-    | -      | -     | -     | -     |
| Propionibacterium acnes  | +/-    | -      | +/-   | +     | -     |
| Pseudomonas aeruginosa   | -      | -      | -     | -     | +/-   |
| Staphylococcus epidermidis   | -      | -      | -     | +/-   | -     |
| Streptococcus pneumoniae, Streptococcus infantis, Streptococcus oralis                             | -      | -      | -     | +     | -     |
| mecA   | -      | -      | -     | +/-   | -     |
| Pan Aspergillus/Candida  | +/-    | +/-    | +/-   | +/-   | +/-   |
| Pan Bacteria 1   | +      | +      | +     | +     | +     |
| Pan Bacteria 3   | -      | -      | -     | -     | +/-   |
| <b>Simbología</b>  |        |        |       |       |       |
| -No detectable   |        |        |       |       |       |
| +/- indeterminado  |        |        |       |       |       |
| + Detectado  |        |        |       |       |       |

Los ct que se dan mayores a 34 requieren una evaluación más profunda para poder saber si es una amplificación errónea o es debido a que se partió de una cantidad mínima de secuencias de ADN de los patógenos presentes en la muestra.

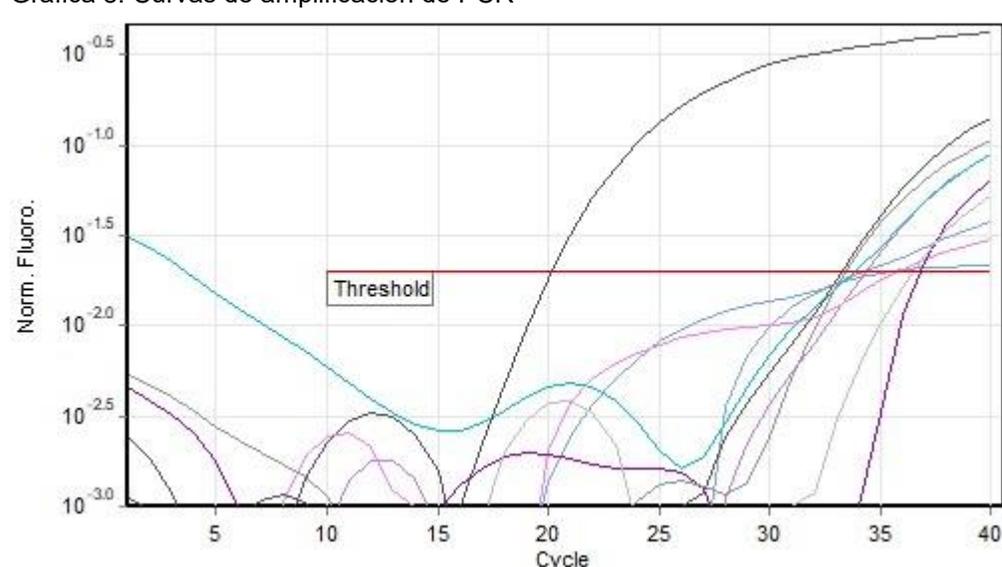
En la tabla 10 se muestran los valores de ct de los patógenos analizados, solo en la muestra 8-RMI se amplifico: *Propionibacterium acnés*, *Streptococcus pneumonia*, sin embargo esta muestra de sangre fue tomada de catéter, por lo que no se descarta contaminación cruzada.

| Tabla 10 Valores de Ct de muestras amplificadas por PCR tiempo real  |        |        |       |       |       |
|--|--------|--------|-------|-------|-------|
| Especies/ Id muestras  | 2-TTPR | 6-LYMA | 7-HGA | 8-RMI | 9-BVM |
| <i>Brevundimonas diminuta</i>  |        |        |       | 36.84 |       |
| <i>Burkholderia vietnamiensis</i> , <i>Burkholderia pyrrocinia</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> |        | 35.65  |       | 34.32 |       |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>  | 36.73  | 34.89  | 36.67 | -     | -     |
| <i>Methylobacterium zatmanii</i>   |        |        |       | 34.36 |       |
| <i>Prevotella intermedia</i>   | 35.69  |        |       |       |       |
| <i>Propionibacterium acnes</i>   | 34.87  |        | 36.48 | 33.22 |       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  |        |        |       | 38.81 | 36.87 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>  |        |        |       | 35.75 |       |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus infantis</i> , <i>Streptococcus oralis</i>                                      |        |        |       | 33.83 |       |
| <i>mecA</i>  |        |        |       | 36.78 |       |
| <i>Pan Aspergillus/Candida</i>   | 35.51  | 35.84  | 35.34 | 36.47 | 36.09 |
| <i>Pan Bacteria 1</i> ****   | 33.90  | 33.10  | 32.83 | 33.37 | 32.15 |
| <i>Pan Bacteria 3</i> ****   | 38.57  |        | 38.89 |       | 36.15 |

\*\*\*\* Diseñados para detectar la colección más amplia posible de bacterias involucradas en la biología humana.

A continuación se presenta un ejemplo de las gráficas de amplificación que nos da el equipo para su posterior análisis en un software.

Grafica 8. Curvas de amplificación de PCR



| No. | Color   | Name   | Ct    |
|-----|---|--|-------|
| 16  |  | <u><i>Brevundimonas diminuta</i></u>   | 35.30 |
| 18  |  | <u><i>Burkholderia vietnamiensis</i></u> , <u><i>Burkholderia pyrrocinia</i></u> , <u><i>Burkholderia cenocepacia</i></u> , <u><i>Burkholderia cepacia</i></u> | 34.32 |
| 48  |  | <u><i>Methylobacterium zatmanii</i></u>  | 34.36 |
| 64  |  | <u><i>Propionibacterium acnes</i></u>  | 33.22 |
| 69  |  | <u><i>Staphylococcus epidermidis</i></u>   | 35.75 |
| 76  |  | <u><i>Streptococcus pneumoniae</i></u> , <u><i>Streptococcus infantis</i></u> , <u><i>Streptococcus oralis</i></u>   | 33.83 |
| 90  |  | <u><i>mecA</i></u>   | 36.78 |
| 93  |  | <u>Pan Aspergillus/Candida</u>   | 36.47 |
| 94  |  | <u>Pan Bacteria 1</u>  | 33.37 |
| 96  |  | <u>Control positivo</u>  | 20.16 |

## CONCLUSIONES

Derivado del análisis de los datos previamente expuestos, podemos observar que los métodos de identificación microbiológica utilizados en el Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos se ven afectados por diferentes situaciones clínicas asociadas al entorno del paciente que van desde las medidas instituidas para minimizar las infecciones nosocomiales hasta el empleo de antibióticos de amplio espectro previo a la toma de las muestras sanguíneas para el análisis microbiológico.

La incidencia de sepsis en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos ha ido disminuyendo considerablemente con respecto a años anteriores.

Los gérmenes más comúnmente implicados en la génesis de sepsis y choque séptico en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos de la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos son los gérmenes gram negativos, seguidos de los gérmenes gram positivos y con mucho menor frecuencia algunas especies de hongos.

Sólo el 20% de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa logró la identificación del microorganismo causal de sepsis y choque séptico en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.

Con respecto al uso de antimicrobianos en sepsis y choque séptico podemos apreciar que los antimicrobianos más utilizados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos son los carbapenémicos en asociación con glucopéptidos.

El hemocultivo pediátrico sigue siendo la herramienta con mayor rendimiento en la identificación y tipificación de patógenos en la sepsis y choque séptico en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos. Sin embargo, cabe resaltar que los resultados obtenidos deben de tomarse con mesura debido a que existieron múltiples factores que pudieron afectar directamente el rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa.

Por todo lo anterior podemos concluir que se requiere la realización de más estudios para poder determinar la utilidad y el rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa contra el hemocultivo en la identificación de microorganismos de pacientes sépticos en las Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos.

## Bibliografía

1. Baique-Sánchez, P. M. (2017). Sepsis en pediatría: nuevos conceptos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 78(3), 333. doi:10.15381/anales.v78i3.13769
2. Prout, A. J., Talisa, V. B., Carcillo, J. A., Mayr, F. B., Angus, D. C., Seymour, C. W., ... Yende, S. (2018). Children with Chronic Disease Bear the Highest Burden of Pediatric Sepsis. *The Journal of Pediatrics*, 199, 194–199.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2018.03.056
3. Napolitano, L. M. (2018). Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surgical Infections*, 19(2), 117–125. doi:10.1089/sur.2017.278
4. Raith, E. P., Udy, A. A., Bailey, M., McGloughlin, S., MacIsaac, C., ... Bellomo, R. (2017). Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA*, 317(3), 290. doi:10.1001/jama.2016.20328
5. Shime, N., Kawasaki, T., & Nakagawa, S. (2017). Proposal of a New Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score for Possible Validation. *Pediatric Critical Care Medicine*, 18(1), 98–99. doi:10.1097/pcc.0000000000001009
6. Matics, T. J., & Sanchez-Pinto, L. N. (2017). Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Children. *JAMA Pediatrics*, 171(10), e172352. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.2352
7. Diagnóstico y tratamiento de sepsis y choque séptico en pacientes de 1 mes a 18 años de edad en los 3 niveles de atención. *Guía de Referencia Rápida*. México. CENETEC. 2017. Disponible en <http://cenetec.salud.gob.mx/contenidos/gpc/MaestroGPC.html>
8. Shaffner, D. (2017). *Rogers. Manual de cuidados intensivos pediátricos*, 5.<sup>a</sup> (5th ed., pp. 430-431). Madrid: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Casado Flores, J., & Serrano, A. (2014). *Urgencias y tratamiento del niño grave* (3rd ed., pp. 108-114). Madrid: Ergón.
10. Gotts, J. E., & Matthay, M. A. (2016). Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*, i1585. doi:10.1136/bmj.i1585
11. Sepsis: the recognition, diagnosis and management of sepsis. (2016). Retrieved from <https://www.nice.org.uk/guidance/NG51/documents/guideline-appendix-5>
12. Sepsis Pathophysiology and Anesthetic Consideration Koichi Yuki\* and Naoka Murakami
13. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update Mitchell M. Levy, MD, MCCM1; Laura E. Evans, MD, MSc, FCCM2; Andrew Rhodes, MBBS, FRCA, FRCP, FFICM, MD (res)3
14. Casado Flores, J., & Serrano, A. (2016). Urgencias y Emergencias Pediátricas. Retrieved from: [http://oceanodigital.oceano.com/sru/view.do?producto=Eleven&iddoc=General/unificado/01500621.XML&tipo=Referencia&key=http://data-produc:80/ocenet/contenidos/&xslt=http://data-produc:80/xslt/view/&urldata=RWxldmVvJmIkZG9jPUdlbmVvYWwvdW5pZmliYWVvLzAxNTAxMzM3LlhnNTCMYnTYwODE4I2M2Nzk2MTQyZmIxZTQyNmQ2MjRjODgzYWNlZjM3YTdi](http://oceanodigital.oceano.com/sru/view.do?producto=Eleven&iddoc=General/unificado/01500621.XML&tipo=Referencia&key=http://data-produc:80/ocenet/contenidos/&xslt=http://data-produc:80/xslt/view/&urldata=RWxldmVuJmIkZG9jPUdlbmVvYWwvdW5pZmliYWVvLzAxNTAxMzM3LlhnNTCMYnTYwODE4I2M2Nzk2MTQyZmIxZTQyNmQ2MjRjODgzYWNlZjM3YTdi)
15. 2016 Update for the Rogers' Textbook of Pediatric Intensive Care: Recognition and Initial Management of Shock. *Pediatr Crit Care Med*. 2016; 17(11):1073-1079 (ISSN: 1529-7535) Fitzgerald JC; Weiss SL; Kissoon N

16. Danae, L. (2017). Eficacia de PCR-RFLP contra hemocultivo para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana. (ISSN 2007-2953). Miranda De la Sierra Torre R; Soto Vargas J.
17. Casado Flores, J., & Serrano, A. (2016). Urgencias y Emergencias Pediátricas. Retrieved from: [http://oceanodigital.oceano.com/sru/view.do?producto=Eleven&iddoc=General/unificado/01500626.XML&tipo=Referencia&key=http://data-produc:80/ocenet/contenidos/&xslt=http://data-produc:80/xslt/view/&urldata=RWxldmV...](http://oceanodigital.oceano.com/sru/view.do?producto=Eleven&iddoc=General/unificado/01500626.XML&tipo=Referencia&key=http://data-produc:80/ocenet/contenidos/&xslt=http://data-produc:80/xslt/view/&urldata=RWxldmVuJmlkZG9jPUdlbmVYwvdW5pZmljYWRvLzAxNTAxMzM3LlhNTCMYNTYwODE4IzRjOTBiOWYxYmI5NTIhMDE1MzBhZmM3NTUxYTc0OTgx)
18. Hernández Bou, S. (2015). Hemocultivos en urgencias pediátricas. Guía práctica de recomendaciones: indicaciones, técnica de extracción, procesamiento e interpretación. Retrieved from <https://www.analesdepediatria.org/es-pdf-S169540331500243X>
19. Castaño L, (1997). Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (3): Enzimas de restricción. Reacción en cadena de la polimerasa. Formas de estudio de mutaciones Retrieved from <https://www.aeped.es/sites/default/files/anales/46-1-24.pdf>
20. Pammi, M., Flores, A., Leeflang, M., Versalovic, J., 2011. Molecular assays in the diagnosis of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. Pediatrics 128 (4), e973–e985.



## CÉDULA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA VS HEMOCULTIVO EN PACIENTES CON SEPSIS EN LA TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA



Nombre del paciente:

RFC:

Fecha de ingreso:

Fecha de egreso UCIP:

Fecha de toma de la muestra

Tratamiento antibiótico previo:

Tratamiento posterior a la muestra:

Días de tratamiento:

Recuento leucocitario (mg/dL):

Proteína C Reactiva (mg/dL):

pSOFA al momento de la toma

Resultado de Hemocultivo:

Microorganismo identificado en Hemocultivo

Resultado de Reacción en cadena de la polimerasa  
(PCR):

Microorganismo identificado en PCR