

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



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

**“DIAGNOSTICO DE SEPSIS NEONATAL, COMPARANDO
SEPTIFAST CON HEMOCULTIVO, EN LAS UNIDADES DE
CUIDADOS NEONATALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE
PERINATOLOGIA”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN:
INFECTOLOGIA**

PRESENTA: DR. PABLO DANIEL TREVIÑO VALDEZ

**TUTOR: DR. JESUS REYNA FIGUEROA
COTUTOR: DR. FEDERICO JAVIER ORTIZ IBARRA
COTUTOR: M.C. IYARI MORALES MENDEZ**

MÉXICO, DF. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

APROBACION DE TESIS

Dr Salvador Gaviño Ambriz
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

Dr Enrique Segura Cervantes
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

Dr. Jesús Reyna Figueroa
DIRECTOR DE TESIS

DEDICATORIA

Gracias a Dios por las bendiciones, que he recibido...

A mi esposa por su apoyo incondicional y sacrificio ejemplar.

A mis padres por el ejemplo de seres humanos que son.

A mis hermanos por estar siempre conmigo.

**En especial a mis hijas, Daniela y Fernanda por el tiempo que
no estuve a su lado .**

A mis Maestros y amigos del Instituto.

INDICE

1. INTRODUCCION	5
2. RESUMEN	6
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
4. MARCO TEORICO	8
5. JUSTIFICACION	11
6. OBJETIVO	12
7. HIPOTESIS	13
8. MATERIAL Y METODOS	14
9. RESULTADOS	19
10. DISCUSION	23
11. CONCLUSIONES	25
12. BIBLIOGRAFIA	26

INTRODUCCION

La sepsis es causa de muerte de 5000 neonatos al año, el 90% en países en vías de desarrollo, en quienes produce del 30 al 40% de las muertes. En México la tasa es de 4 a 15.4 casos por cada 1000 recién nacidos vivos.(6)

La sepsis neonatal se puede clasificar en temprana y tardía, la primera tiene gran relación con factores maternos, por lo tanto las bacterias aisladas con mayor frecuencia son las enterobacterias; y en la sepsis tardía es la que se adquiere posterior a 72 horas de vida con implicación de los factores, del huésped, medio ambiente y del agente, los factores del huésped que influyen son la prematuridad principalmente (lo cual implica mas días de estancia hospitalaria , además de invasión con catéteres intravasculares, cánulas endotraqueales, nutrición parenteral) y patologías asociadas (en relación a procedimientos quirúrgicos).

Los microorganismos relacionados con mas frecuencia en la sepsis neonatal tardía son los Staphylococcus coagulasa negativa (aislamientos en INPer del 62%), estas bacterias tenían la peculiaridad de haber sido consideradas hace algunos años como microorganismos colonizadores (los neonatos en 24 horas ya se encontraban con colonización en región umbilical) por lo tanto en su mayoría se asumían como contaminantes de cultivos de líquidos corporales y no se le daba la importancia clínica que merecía.

Posteriormente sobrevino el cambio en la epidemiología de los agentes etiológicos de la sepsis neonatal tardía donde los cocos Gram positivos se posicionaron de la causa principal, desplazando a los bacilos Gram negativos, esto puede deberse además por el incremento de sobrevida de los pacientes prematuros (vide supra).

Con la introducción de nuevas técnicas de Biología Molecular para la identificación de DNA de microorganismos, se esta revolucionando la medicina, para el diagnostico temprano y tratamiento oportuno en sepsis neonatal.

RESUMEN

INTRODUCCION:

La sepsis neonatal presenta una evolución fatal en un alto porcentaje de pacientes, motivo por el cual es de suma importancia implementar técnicas para diagnóstico temprano y por consiguiente tratamiento oportuno, la Biología Molecular es un área de oportunidad muy amplia en la realización de este tipo de diagnóstico, identificando material genético en regiones conservadas como 16S RNA, como lo hace la PCR en tiempo real, además de que el tiempo para la obtención de resultados prácticamente es en horas, con lo cual mejora la velocidad de identificación de microorganismos, comparado con el hemocultivo, para dirigir tratamientos con base a esta identificación.

OBJETIVO:

Comparar los parámetros diagnósticos de la técnica de SeptiFast contra hemocultivo, en recién nacidos con sospecha de sepsis, en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" de la Ciudad de México, Distrito Federal.

MATERIAL Y METODOS: Se incluyeron 61 muestras de recién nacidos considerados sépticos de acuerdo a los criterios de la escala NOSEP-1. Se emplearon dos muestras de sangre por paciente, la primera fue recolectada en un tubo con EDTA (0.5-1.0mL; de acuerdo a estandarización previa), que se empleó para la detección molecular por el kit de PCR en tiempo real de la marca Roche (SeptiFast Test). La segunda muestra (0.5-1.0mL) se utilizó para inocular directamente una botella para hemocultivo empleando el equipo automatizado BacT/ALERT® 3D (BIOMERIEUX).

RESULTADOS: De un total de 61 pacientes, 5 (8.2%) fueron detectados como positivos por ambas técnicas identificándose el mismo microorganismo (concordancia microbiológica), del total, 16 pacientes (26.22%) fueron positivos para SeptiFast y 9 pacientes (14.7%) para el hemocultivo.

CONCLUSIONES: con septifast se obtuvo mejor porcentaje de identificación, que con el hemocultivo, resultados en mucho menor tiempo y menor cantidad de muestra.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Debido al impacto que tiene la sepsis neonatal como causa de morbilidad y mortalidad en las unidades de cuidados intensivos y el alto costo de la estancia hospitalaria, por la demora en la identificación del agente etiológico por metodologías tradicionales como el cultivo, es necesaria la búsqueda e implementación de otras técnicas alternativas de diagnóstico que permitan la identificación microbiana en un menor tiempo, como el caso de las técnicas de Biología Molecular, en las que el resultado es obtenido en cuestión de horas, permitiendo así, iniciar tratamientos oportunos, dirigidos, con el beneficio de menores estancias hospitalarias, menos costos y mejor calidad de vida de los pacientes.

Planteamiento para el desarrollo de esta investigación:

- 1) En el 60% de los pacientes sépticos no hay aislamiento microbiológico.
- 2) El hemocultivo tiene un porcentaje de aislamiento 40%.
- 3) Cuando se cuenta con aislamiento microbiológico, ya han pasado horas de oro, muy valiosas (72 horas).
- 4) Evitar el uso y abuso de antimicrobianos.

MARCO TEORICO

La sepsis es una importante causa de morbilidad y mortalidad en nuestro país, principalmente en el grupo neonatal, Siendo causa de muerte de 5000 neonatos al año, el 90% en países en vías de desarrollo, en estos es la causa del 30 al 40% de las muertes. En México la tasa es de 4 a 15.4 casos por cada 1000 recién nacidos vivos (3).

La sepsis neonatal se puede clasificar en temprana y tardía, la primera tiene gran relación con factores maternos por lo tanto las bacterias mas frecuentemente aisladas son las enterobacterias; (1) y la tardía es la que se adquiere posterior a 72 horas de vida con implicación de los factores del **medio** por el que nace, **huésped** y de los **agentes**, los factores del huésped que influyen son la prematuridad principalmente (lo cual implica mas días de estancia hospitalaria , además de invasión con catéteres intravasculares, cánulas endotraqueales, nutrición parenteral) y patologías asociadas (en relación a procedimientos quirúrgicos).

Los microorganismos relacionados con mas frecuencia en la sepsis neonatal tardía son los Staphylococcus coagulasa negativa (aislamientos en INPer del 62%), estas bacterias tenían la peculiaridad de haber sido consideradas hace algunos años como microorganismos colonizadores (los neonatos en 24 hrs ya se encontraban con colonización en región umbilical) por lo tanto en su mayoría se asumían como contaminantes de cultivos de líquidos corporales y no se le daba la importancia clínica que merecía (1.2.3) .

La sepsis neonatal es una enfermedad de alto riesgo para mortalidad y su diagnóstico es muy difícil y tardado debido a los signos y síntomas que se presentan son inespecíficos, insidiosos y frecuentemente se confunden con otras manifestaciones clínicas en el recién nacido incluyendo; prematuridad extrema, con inmadurez del sistema nervioso central, (centro respiratorio), hipoglucemia, desequilibrio en electrolitos y alteraciones propias de la inmadurez en el desarrollo pulmonar (2). El cultivo de sangre (hemocultivo) se considera como el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones bacterianas o de hongos en el torrente sanguíneo y se requiere aproximadamente de 24-48 horas de incubación para microorganismos, (bacterias, hongos) con un tiempo adicional de 24-48 horas para la identificación definitiva y evaluación de la sensibilidad a los antibióticos, lo cual implica un tiempo en las mejores condiciones, para la identificación del agente etiológico de 72 horas (2). Sin embargo, todos los sistemas de cultivo en sangre sufren de varias limitaciones que influyen en la recuperación del agente infeccioso, algunas de estas son; baja sensibilidad, una baja carga bacteriana en la muestra, volúmenes pequeños de sangre, pacientes que reciben tratamiento antimicrobiano profiláctico y la presencia de microorganismo insidiosos. La necesidad de una técnica para detección oportuna y tratamiento adecuado del microorganismo causal dentro de las seis primeras horas es vital para el pronóstico del paciente. Al respecto se han implementado varias técnicas de Biología Molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de secuencias conservadas de los genes bacterianos del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) 16S, 23S y regiones intermedias entre ambos. Así mismo, la PCR se ha empleado para el diagnóstico de bacterias especie-específicas y también se ha adaptado para la búsqueda de múltiples bacterias (PCR multiplex) que comúnmente se detectan en muy baja frecuencia o cuando si se conoce el agente causal (13). Sin embargo, el empleo de muestras sanguíneas para el diagnóstico de sepsis presenta algunos inconvenientes, ya que pueden estar presentes inhibidores de la PCR, y/o la dificultad de tener una técnica que sea capaz de detectar un amplio número de bacterias como agentes etiológicos (14).

La prueba ideal, para el diagnóstico de sepsis neonatal, continúa siendo difícil de alcanzar. Aunque los cultivos de sangre actualmente, son el criterio aceptado estándar, que generalmente tardan de 48 a 72 horas en reportarse, y cuando hay una exposición previa a antibióticos, interfieren con el crecimiento en el cultivo de sangre, la prueba de reacción en cadena de polimerasa, usando primers universales bacterianos y de hongos, en las que conservan las regiones de 16S rRNA, genes que son comunes en todas las bacterias y no se encuentran en otros microorganismos, además esta prueba sepiFast, contiene para su identificación 25 microorganismos, que son las especies que en más del 90% se presentan en las unidades de cuidados intensivos (19).

Hay pocos estudios, con el uso de primers universales PCR, para el diagnóstico de neonatos con sospecha de sepsis. Y algunos han demostrado resultados prometedores (20).

El hemocultivo es la prueba "gold standard" para la detección de bacteriemia y fungemia, pero presenta muchas limitaciones, en el sentido de, falsos positivos, resultado de no realizar una técnica de recolección de muestra adecuada, como contaminación, y falsos negativos, como resultados de la utilización previa de antibióticos, es por esto que esta nueva alternativa, juega un papel importante para el diagnóstico de infecciones, en la etapa neonatal (8).

Se ha venido utilizando desde hace unos años a la fecha, la biología molecular, utilizando reacción en cadena a polimerasa, regiones 16s rRNA, para tratar de mejorar, porcentajes de aislamiento en diferentes patologías como son; Endocarditis Infecciosa, Sepsis en pacientes neutropénicos con neoplasias hematológicas, bacteriemias o fungemias, con resultados muy alentadores(20).

Existe poca bibliografía, para diagnóstico de sepsis neonatal utilizando, métodos de biología molecular.

JUSTIFICACION

Si mejoramos los tiempos en la identificación de microorganismos, presentes en sangre de los neonatos con sepsis, sería de vital importancia iniciar y a la vez dirigir terapias con antimicrobianos y así evitar la evolución natural de este padecimiento en estos pacientes, con la seguridad, en menor tiempo, de la eficacia de nuestra decisión terapéutica, mediante la identificación precisa del material genético del microorganismo identificado.

La utilización de biología molecular, para identificar microorganismos en sangre, requiere menor cantidad de muestra, el reporte de resultados es en menor tiempo, comparado con hemocultivo, lo cual nos favorece para iniciar tratamiento antimicrobiano dirigido, siendo la Biología Molecular un campo relativamente nuevo y poco estudiado en sepsis neonatal, con lo que proponemos la utilización de esta nueva tecnología, ya que contamos con ella en el Instituto Nacional de Perinatología.

OBJETIVO GENERAL

1. Comparar los parámetros diagnósticos de la técnica de SeptiFast contra hemocultivo, en recién nacidos con sospecha de sepsis, en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” de la Ciudad de México, Distrito Federal.

OBJETIVO PARTICULAR

1. Describir las identificaciones microbiológicas por Septifast, obtenidos de recién nacidos con sospecha de sepsis.
2. Describir los aislamientos microbiológicos por Hemocultivo, obtenidos de recién nacidos con sospecha de sepsis.

HIPOTESIS

Septifast es una prueba diagnostica de Biología Molecular, con mejores parámetros diagnósticos en comparación con el Hemocultivo para el diagnostico de sepsis neonatal.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Prospectivo y transversal

CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes de edad neonatal.

Ambos géneros.

Cualquier peso y edad gestacional.

Nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología, con sospecha de sepsis, sin la utilización previa de antimicrobianos.

Definición: pacientes con sepsis: puntuación en la escala NOSEP-1 mayor a 8.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes sin datos de sepsis ó con antimicrobianos, debido a la realización de algún procedimiento quirúrgico.

SITIO DE REALIZACION

Instituto Nacional de Perinatología en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales y de Cuidados Intermedios, Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS:

Este estudio fue realizado en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” de la Secretaría de Salud, en el periodo comprendido del 7 de octubre de 2008 al 18 de febrero de 2009. Se incluyeron pacientes recién nacidos considerados sépticos de acuerdo a los criterios de la escala NOSEP-1, (cuadro 1) que evalúa las siguientes variables:

Cuadro 1. Variables y puntuaciones de la escala NOSEP -I

Variables	Puntuación
PCR > 14 mg/L	5
Neutrófilos > 50%	3
Trombocitopenia < $150 \times 10^9/L$	5
NPT > 14 días	6
Fiebre > 38.2 °C	5
Calificación (para diagnóstico de sepsis)	>8

Límite de 0- 24 puntos

Procedimiento:

Se emplearon dos muestras de sangre por paciente, la primera fue recolectada en un tubo con EDTA (0.5-1.0mL; de acuerdo a estandarización previa), que se empleó para la detección molecular por el kit de PCR en tiempo real de la marca Roche (SeptiFast Test). La segunda muestra (1-1.5mL) se utilizó para inocular directamente una botella para hemocultivo empleando el equipo automatizado BacT/ALERT® 3D (BIOMERIEUX). El DNA fue extraído realizando la lisis mecánica de la muestra sanguínea, empleando el Kit SeptiFast Lys MGrade y el equipo MagNa Lyser® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Se utilizó el SeptiFast Prep Kit MGrade para la extracción de DNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon sondas de hibridación para la detección de los amplicones. Fueron introducidos a cada muestra controles internos, que consistían de una mezcla de moléculas de DNA sintético de doble cadena con sitios de reconocimiento para primers idénticos a las secuencias blanco, pero diferentes en los sitios de unión las sondas. Se empleó un control negativo para cada serie procesada. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), usando el LightCycler SeptiFast Kit MGrade. Fueron empleadas 3 mezclas diferentes de enzimas para la amplificación de los blancos (Gram negativos, Gram positivos y hongos). Los controles de reactivo se emplearon como controles positivos de reacción de PCR. La fluorescencia emitida fue medida en cada uno de los cuatro canales de detección (610, 640, 670 y 705nm). Para la identificación de especies se hace un análisis de las temperaturas melting de las muestras y controles en cada uno de los cuatro canales y el reporte es generado por un software conocido como SeptiFast identification software (SIS) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Los microorganismos que son detectados por este kit se resumen en la tabla I.

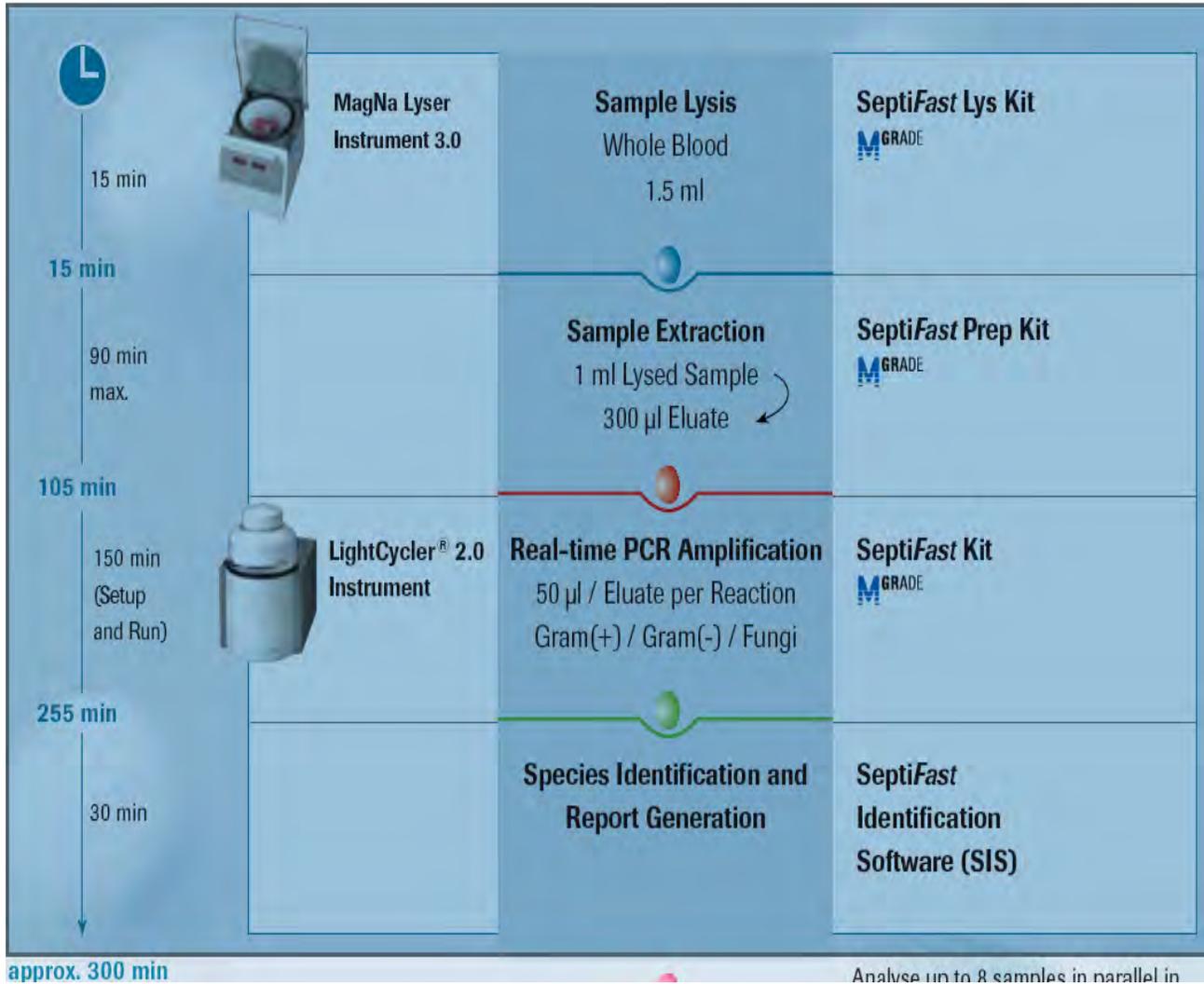
Para el procesamiento de los hemocultivos, las botellas inoculadas se incuban en el módulo de incubación del BacT/ALERT 3D por un periodo no mayor de 12 días, si después de 5 días de incubación no hay crecimiento, se reporta como negativo. Cuando hay un cultivo positivo, se procede a inocular en medios específicos, incubándolos por 24 a 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ y se hace una extensión en laminilla para tinción de Gram. Se realizan pruebas de oxidasa y catalasa y se inoculan paneles de identificación y sensibilidad MicroScan[®] (Dade Behring Inc.) específicos y se incuban por 18 a 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂. Se adicionan reactivos reveladores a ciertas posiciones del panel y se lee en el equipo AutoScan-4[®] (Dade Behring Inc.), generándose un reporte de identificación y sensibilidad del microorganismo encontrado.

Por la técnica de Biología Molecular para Septifast se pueden identificar 25 microorganismos, los cuales se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Lista de microorganismos que se pueden detectar por SeptiFast.

Gram (-)	Gram (+)	Hongos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	Estafilococos coagulasa negativa	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

Los tiempos de procesamiento de las muestras se ejemplifican en el siguiente diagrama:



ANALISIS ESTADISTICO:

Através de parámetros diagnósticos.

RESULTADOS

De un total de 61 muestras, 5 (8.2%) fueron detectados como positivos por ambas técnicas identificándose el mismo microorganismo (concordancia microbiológica). Del total de muestra, 16 (26.22%) fueron positivos para SeptiFast y 9 (14.7%) para hemocultivo, 41 (67.2%) muestras fueron negativas por ambos métodos **Tabla II**.

En la **Tabla III** se reportan los parámetros diagnósticos de Septifast con relación al hemocultivo.

En la **Tabla IV** se describen la concordancia de resultados entre Septifast y la escala clínica de sepsis neonatal Nosep-1., el 100% de estos pacientes con concordancia microbiológica presentaron una calificación mayor a 8 en escala NOSEP-1., El reporte de los parámetros diagnósticos de Septifast con relación a la escala NOSEP-1 se muestran en la **Tabla V**.

Por géneros con septifast positivo, 11 pacientes (68.7%) fueron masculinos y 5 pacientes (31.2%) femeninos, por peso, con septifast positivo mayores de 1500 gramos fueron 7 pacientes (43.7%) y menores de 1500 gramos fueron 9 pacientes (56.2%)., De acuerdo a la edad gestacional, con septifast positivo mayor a 35 semanas de gestación fueron 7 pacientes (43.7%) y menores de 35 semanas de edad gestacional fueron 9 pacientes (56.2%)., En el 100% de los pacientes con concordancia microbiológica, se identificaron datos de respuesta inflamatoria sistémica, 3 pacientes (60%), presentaron sepsis temprana y 2 pacientes (40%) sepsis tardía **Tabla VI**.

Tabla II. Cuadro comparativo de 2 x 2 entre SeptiFast y Hemocultivo.

		Hemocultivo	
		+	-
SeptiFast	+	5	11
	-	4	41

Kappa=0.46

Tabla III. Parametros diagnosticos, Septifast con Hemocultivo.	
Sensibilidad	56%
Especificidad	79%
Valor predictivo positivo	31%
Valor predictivo negativo	91%

Tabla IV. Resultados de concordancia entre Septifast y NOSEP-1.			
SEPTIFAST	NOSEP-1 (+)	NOSEP-1 (-)	
(+) 16	10	6	
(-) 41	6	39	

Kappa=0.42

Tabla V. Parametros diagnosticos, de Septifast comparado contra la escala clinica de NOSEP -1	
Sensibilidad:	62%
Especificidad:	87%
VPP:	62%
VPN:	86%

Variables encontradas Tabla VI.

VARIABLES	SEPTIFAST (+) total : 16	SEPTIFAST (-) total: 45
Hemocultivo positivo	5	4
Hemocultivo negativo	11	41
NOSEP -1 mayor a 8	10	6
NOSEP -1 menor a 8	6	39
Sepsis temprana	3	---
Sepsis tardía	13	---
Genero Masculino	11	18
Genero Femenino	5	27
Edad gestacional mayor 35 sdg	7	14
Edad gestacional menor 35 sdg	9	31
Peso mayor a 1500 grs	7	15
Peso menor a 1500 grs	9	30
Concordancia con hemocultivo (mismo-microorganismo)	5	----
Discordancia con hemocultivo (diferente - microorganismo)	0	----
SIRS	10	7

En la **Tabla VII** se comparan los microorganismos identificados mediante las técnicas de Septifast y Hemocultivo.

Tabla VII comparación de microorganismos identificados mediante las técnicas de Septifast y Hemocultivo.

		HEMOCULTIVO	
		+	-
SEPTIFAST	+	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus bovis</i>	SCN <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SCN SCN y <i>E. faecalis</i> SCN <i>E.coli</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>K. pneumoniae/oxytoca</i> <i>Streptococcus sp</i> y <i>E. coli</i> SCN
	-	<i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Streptococcus mutans</i>	41

DISCUSION

En este estudio nos damos cuenta de que la tecnología viene creciendo a pasos agigantados, ya que el poder identificar en las muestras de sangre, previamente preparadas para extraer el DNA de los microorganismos, se lleva un valor importante, la prueba septifast, por el porcentaje mayor en la identificación, que en este rubro el gold standar hemocultivo, continua siendo la herramienta mas infalible, por sus pruebas in vitro, que se traducen en una menor falla, en cuanto a las decisiones en el tratamiento antimicrobiano, sin dejar pasar y reconocer que el tiempo en estos pacientes como en todos los demás con sepsis en una condición que marca la evolución, en el desenlace que en la mayoría de las veces es fatal, cuando no se es asertivo, en el inicio temprano del manejo antimicrobiano.

En un estudio realizado en Zhejiang, China, en 2007 (8), reportan sus resultados, con porcentajes de aislamiento, positividad 8.33% en PCR y hemocultivo 5.67% de aislamiento y en nuestro estudio tenemos mayor porcentaje de aislamiento de PCR (**Tabla II**) en lo que reportamos aislamiento en PCR 26.22 % y en Hemocultivo 14 %, con lo cual concluimos en nuestro estudio en el Instituto Nacional de Perinatología, en México Distrito Federal.

En otro estudio realizado en Chandigarh, India, en el año 2009, en el que diagnostican sepsis neonatal usando la PCR con primers de regiones conservadas 16S rRNA, antes y después del inicio de antibióticos, comparándolo con Hemocultivo, en 242 pacientes estudiados, reportando Hemocultivo positivo en 52 pacientes (21.4%) y reportan identificación por PCR en 57 pacientes de los 242 (23.5%), con lo cual en los estudios publicados en la literatura mundial, estamos en acuerdo que con la Biología Molecular se están obteniendo mejores resultados en la identificación de microorganismos en la sepsis neonatal (9).

En las variables encontradas, una que representa, un reporte universal, es la edad gestacional, ya que a menor edad gestacional, es directamente proporcional con sepsis neonatal, además del peso del neonato, que directamente proporcional a la frecuencia de sepsis, (menor peso mayor probabilidad de sepsis).

En la identificación de microorganismos aislados, representa un mismo valor, tanto bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*), Gram positivas (*Staphylococcus coagulasa negativa*) las cuales representan en los reportes de sepsis neonatal, las mas importantes, además de lo reportado en nuestro estudio, ya que estos microorganismos forman parte de mas del 90-95 %, siendo estos los que producen sepsis y son parte del kit de septifast con el cual trabajamos, quedando dentro de lo reportado en la literatura mundial.

Una de las desventajas, es que aun se esta trabajando en algunos Kits para realizar antibiogramas en las identificaciones microbiológicas.

Proponemos continuar, en la investigación de esta herramienta diagnostica, para contar con mayor universo de pacientes y posteriormente tener material para realizar antibiogramas, para darle mayor valor a estas identificaciones.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo mayor porcentaje de aislamiento con Septifast, que con el gold estándar hemocultivo,
2. El reporte en tiempos es una ventaja muy grande por septifast ya que en transcurso de 6 horas y no días se entrega el reporte del microorganismo aislado, nos abre la puerta a nuevas áreas de oportunidad, para el diagnóstico de la sepsis neonatal.
3. La limitante de que no se reporta el perfil de sensibilidad, de modo que aun se prefiere el hemocultivo.
4. La limitante en el costo de esta prueba septifast, no permite que tome ventaja en contra del hemocultivo, hasta el momento, a pesar de que en este estudio concluimos tener mejor porcentaje de identificación microbiológica y en tiempos muy valiosos, para la evolución de los pacientes.
5. La sensibilidad y especificidad, sumados los valores predictivos nos orientan a que esta herramienta diagnóstica, representa un nuevo campo en el diagnóstico temprano de la sepsis neonatal, además de superar el porcentaje de identificaciones microbiológicas, con la limitante de carecer de antibiograma.

BIBLIOGRAFIA

1. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades infecciosas Principios y práctica. 6ª edición. España 2006, Editorial Elsevier, 2352-2359.
2. Remington J, Klein J, Wilson B, Baker C. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infants. 6a edición. United States of América 2006, Editorial Elsevier, 513- 544.
3. Saltigeral P, Valenzuela F, Avendaño B, Plascencia I, Martínez N. Agentes causales de sepsis neonatal temprana y tardía: una revisión de diez años en el “Hospital Infantil Privado” Revista de Enfermedades Infecciosas 2007, 20 :99- 105.
4. Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Journal Of Clinical Microbiology, 1995; 33: 2233–2239.
5. Mahieu M, de Muynck OA, de Dooy J, Laroche MS, Van Acker J. Prediction of nosocomial sepsis in neonatos by means of a computer weighted bedside scoring system (NOSEP score). Crit Care Med 2000; 28: 2026- 33.
6. Reyna F Jesús, Ortiz I Federico, Navarro G Sujey, Pérez A Beatriz, Recién nacidos pretermino con sepsis nosocomial: comparación de dos consensos y una escala clínica, utilizados en la identificación de sepsis mediante un estudio de evaluación de pruebas diagnosticas Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría Vol. XXI Num. 85
7. Raúl Villegas Silva, Raúl Muro Flores, Juan Garduño Espinoza, María Luisa Cuevas, Diagnóstico etiológico de sepsis neonatal basado en factores de riesgo e índices hematológicos, ENF INF MICROBIOL 2008 28 (2): 51-59
8. Yi-dong W, Lihua C, Xiu-jing Wu, et al. Gram-specific probes based real time PCR for detection and discrimination of bacterial neonatal sepsis. J Clin Microbiol JCM 2008: 02237-07v1.

9. Sourabh Dutta. MD, PhD; Anil Narang, MD; Anuradha Chakraborty, PhD; Pallab Ray, MD. Diagnosis of Neonatal Sepsis Using Universal Primer Polymerase Chain Reaction Before and After Starting Antibiotic Drug Therapy, ARCH PEDIATR ADOLESC MED/ VOL 163(No. 1) JAN 2009.
10. Emrich, T.; Moczko, M.; Lohmann, S.; Mayr, J.; Stockinger, H.; Haberhausen, G. LightCycler(R) SeptiFast Test: rapid detection of nosocomial pathogens by real-time PCR: P962, Clinical Microbiology & Infection, Volume 12 Supplement 4, April 2006.
11. I. Pachiadakis, V. Karavassilis, A. Vasdeki, A. Melidou, A. Goudouva, P. Lisgara, E. Petinaki, A. Maniatis (Larissa, GR), Molecular detection of microbes, Clinical Microbiology and Infection, Volume 12, Supplement 4, 2006
12. Michela Paolucci, Maria Grazia Capretti, Paola Dal Monte, Luigi Corvaglia, Maria Paola Landini, Stefania Varani, Andrea Pession, Giacomo Faldella and Vittorio Sambri, Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR, DOI 10.1099/jmm.0.003848-0 G 2009 SGM
13. Mancini, N., Clerici, D., Diotti, R., Perotti, M., Ghidoli, N., De Marco, D., Pizzorno, B., Emrich, T., Burioni, R. & other authors (2008). Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. JMed Microbiol 57, 601–604.
14. Lehmann, L. E., Hunfeld, K.-P., Emrich, T., Haberhausen, G., Wissing, H., Hoefl, A. & Stübner, F. (2007). A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. Med Microbiol Immunol (Berl) 197, 313–324.
15. Fraser, N., Davies, B. W. & Cusack, J. (2006). Neonatal omphalitis: a review of its serious complications. Acta Paediatr 95, 519–522.
16. G. Lisby, H. Westh (Hvidovre, DK) Evaluation of SeptiFast – a new commercially available broad-range real-time PCR assay for detection of bacteria and fungi in blood. Clinical Microbiology and Infection, Volume 12, Supplement 4, 2006.

17. F. Lamothe, K. Jaton-Ogay, J. Bille, G. Prodrom, L. Senn, T. Calandra, O. Marchetti (Lausanne, CH) Clinical utility of Septifast PCR in neutropenic cancer patients with persistent fever despite antibacterial therapy, (EORTC-MSG criteria, CID, 2001).
18. Landt O. Rapid detection and identification: combination of LightCycler real-time PCR and arrays, TIB MOLBIOL, Berlin, Germany, Clin Chem Lab Med 2008; 46(4):45–A66 © 2008
19. J. Steinmann, J. Buer, P.-M. Rath, A. Paul, F. Saner. Invasive aspergillosis in two liver transplant recipients: diagnosis by SeptiFast , Transpl Infect Dis 2009; 11: 175-178. All rights reserved
20. Alvarez, M.; Parra, J.; Pena, A.; Carlos, S.; Chueca, N.; Torres, M.; Perez-Lopez, J. A.; Piedrola, G.; Maroto, M. C.; Garcia, F. SeptiFast for the investigation of bacterial and fungal DNA in sterile fluids: Clinical Microbiology & Infection, Volume 14 Supplement 7, May 2008, p S578
21. Varani, S.; Stanzani, M.; Nardi, L.; Paolucci, M.; Vianelli, N.; Baccarani, M.; Landini, M.; Monte, P. Dal; Cavrini, F.; Giannini, B.; Melchionda, F.; Pession, A.; Sambri, V. Comparison of real-time PCR and blood culture for the diagnosis of bloodstream infections in onco-haematologic patients: microbiological and clinical assessment: Clinical Microbiology & Infection, Volume 13 Supplement 1, April 2007, p S393.
22. Abdul-Redha, R. J., Balslew, U., Christensen, J. J. & Kemp, M. (2007). *Globicatella sanguinis* bacteraemia identified by partial 16S rRNA gene sequencing. Scand J Infect Dis 39, 745–748.
23. Breikopf, C., Hammel, D., Scheld, H. H., Peters, G. & Becker, K. (2005). Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnostics of infective heart valve endocarditis. Circulation 111, 1415–1421.
24. Dombrovskiy, V. Y., Martin, A. A., Sunderram, J. & Paz, H. L. (2007). Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993–2003. Crit Care Med 35, 1244–1250.

25. Raghavan, M. & Marik, P. E. (2006). Management of sepsis during the early “golden hours”. *J Emerg Med* 31, 185–199.
26. Adriana Vince, Snjezana Zidovec Lepej, Bruno Barsic, Davorka Dusek, Zdravko Mitrovic , Ranka Serventi-Seiwerth and Boris Labar, LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy, DOI 10.1099/jmm.0.47797-0 G 2008 SGM.