



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

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

**“EL GENE 16S rDNA COMO BLANCO MOLECULAR PARA  
LA DETECCIÓN EN SANGRE DE LAS BACTERIAS  
PATÓGENAS COMÚNMENTE ASOCIADAS CON LA  
SEPSIS NEONATAL TEMPRANA”**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A :**

**ROSA ISELA GARCÍA GUDIÑO**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
DR. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS  
M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA  
Departamento de Infectología e Inmunología  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA**



**COTUTOR  
MÉDICO PEDIATRA ROLANDO MAIDA CLAROS.  
Subdirección de Neonatología  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA**

**MÉXICO, DF. 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## APROBACION DE LA TESIS

**“EL GENE 16S rDNA COMO BLANCO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN EN SANGRE DE LAS BACTERIAS PATÓGENAS COMÚNMENTE ASOCIADAS CON LA SEPSIS NEONATAL TEMPRANA”**

---

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

---

**DR. JAVIER MANCILLA RAMIREZ**  
PROFESOR TITULAR  
ESPECIALIDAD DE NEONATOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
“Isidro Espinosa De Los Reyes”

**DIRECTOR DE TESIS.**

---

**M en C HECTOR FLORES HERRERA**  
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
“Isidro Espinosa De Los Reyes”

*ABREVIATURAS*

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BH</b>	Biometría hemática
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gradientes de desnaturalización
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fracción inspirada de oxígeno
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>Gr</b>	Gramos
<b>IL</b>	Interleucina
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NPT</b>	Nutrición Parenteral Total
<b>PCT</b>	Procalcitonina
<b>PC-R</b>	Proteína de Fase aguda C-reactiva
<b>RN</b>	Recién nacido
<b>UCIREN</b>	Unidad cuidados intermedios neonatales
<b>SIRS</b>	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
<b>UCIN</b>	Unidad de cuidados intensivos neonatales

*INDICE GENERAL*

<b>DEDICATORIAS</b>	6
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	8
<b>RESUMEN</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
Tabla 1. Comparación en la sensibilidad entre el hemocultivo y la PCR	24
Tabla 2. Características clínicas maternas de la población de estudio	42
Tabla 3. Características clínicas del recién nacido de la población de estudio	43
Tabla 4. Comparación entre el cultivo bacteriológico y el 16S rDNA de los 29 casos son sepsis neonatal temprana	45
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
Figura 1. Diagrama en el que se señalan las diferentes muestras corporales para la búsqueda de agentes infecciosos	19
Figura 2. Etapas de la PCR	25
Figura 3. Esquema del gene 16S rDNA	26
Figura 4. Gel de DNA en gradiente desnaturizante (DGGE)	27
Figura 5. Diseño general del estudio	32
Figura 6. Amplificación del 16S rDNA de los 29 casos de sepsis neonatal	47
<b>1.0 MARCO TEÓRICO</b>	
1.1. Síntesis del proyecto	13
1.2. Planteamiento del problema	14
1.3. Antecedentes	15
1.3.1 Datos epidemiológicos de la sepsis neonatal	15
1.3.2. Clasificación	16
1.3.3 Manifestaciones clínicas	17
1.3.4. Pruebas clínicas para la determinación de la sepsis neonatal	18
<b>2.0 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	28
<b>3.0 OBJETIVOS</b>	30
<b>4.0 HIPÓTESIS</b>	30
<b>5.0 DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	31
<b>6.0 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
6.1 Universo de estudio	33
6.2 Tamaño de la muestra	33
6.2. Criterios de inclusión y exclusión	34
6.3. Definición de variables	35
6.3 Análisis estadístico	36

*INDICE GENERAL*

6.4 Método de recolección de información	36
6.5 Obtención de las muestras	36
6.6. Identificación de los microorganismos por el hemocultivo	37
6.7 Identificación de los microorganismos por el 16S rDNA	37
<b>7.0 RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>8.0 DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
<b>9.0 PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
<b>10.0 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>52</b>
<b>11.0 CONSIDERACIONES ÉTICAS</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 1. CRONOGRAMAS DE ACTIVIDADES</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 2. CARTA DE CONSETIMINETO INFOMADO</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 3. RECURSOS HUMANOS</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 4. RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS</b>	<b>59</b>

*DEDICATORIAS*

*A Dios*, por la vida y la salud para este proyecto, por sus señales de amor que permiten aquellos milagros de vida que día a día he presenciado, fortaleciendo mi fe, consolidando mi vocación de servicio, y especialmente por sentir que estas a mi lado siempre.

*A mi Familia única y maravillosa*, con la que comparto todas mis experiencias, que durante mi formación han sido testigos de mi crecimiento como profesionalista y ser humano, que han estado en momentos fundamentales, brindándome su apoyo incondicional. Reconocimiento especial a las dos maravillosas personas que me dieron la vida: mis padres, Esther y Baldomero quienes siempre me concedieron confianza, soporte e incluso sus sacrificios además me llenaron de amor, energía positiva y valores como: la justicia, la honestidad, respeto, responsabilidad, solidaridad, entre muchas más que me esfuerzo por vivir diariamente, tal y como me sirven ellos de ejemplo.

*A Miguel Madrigal* mi compañero de vida y mi mejor amigo, quien me brinda su amor y su apoyo incondicional, con quien también comparto mis experiencias y mis sueños, quien nunca ha soltado mi mano y ha estado en momentos fundamentales, brindándome una palabra de aliento, su consejo y su entusiasmo por mi realización personal, y lo más importante cuidando de mi.

*A mis pacientes*, los recién nacidos y su madres que a lo largo de esta formación me ha permitido consolidar el conocimiento científico de la neonatología, además que me han permitido entender la enorme responsabilidad de un pronóstico que se traduce en oportunidad de vida y desarrollo. Son mi inspiración, desde el momento que llegue al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” y que además se volvieron mi motivación. Durante tantas noches de cansancio y frustración; me he dedicado a ellos, pues son mi esperanza de un mundo mejor.



*A mis Profesores y Compañeros*, por la oportunidad de compartir estos años aprendiendo algo en cada situación, particularmente la importancia que tiene el trabajo en equipo con calidad.





---

*AGRADECIMIENTOS*

*A mis padres*, por brindarme su apoyo, por vivir los desvelo, de angustias, alegrías, y alentarme por su permanente amor, sus el consejos y guiarme en mi camino permaneciendo a mi lado.

*A mis Hermanos Gilberto, Elizabeth, Sergio, Oscar y Hugo*, con los que pude compartir desde el simple juego de pelota hasta un problema o inquietud, recibiendo atinados consejos por años. Por su amor, apoyo incondicional y absoluta confianza en mis fortalezas personales.

*A mi cuñado y cuñadas*, quienes al integrarse a mi familia, siempre me brindaron momentos de cariño y apoyo.

*A mis sobrinos*, que me llenan de energía, diversión y esperanza. Recuerdos especiales utilizados en mis momentos de cansancio, que me impulsan con una linda sonrisa, haciendo que todo tenga un nuevo inicio. Además con su nacimiento han contribuido a apasionarme y comprometerme con la pediatría, y ahora particularmente con la neonatología.

*A ti Miguel*, que has sido compañero más de 14 años, con una amistad que se cultivo y transformó, ahora en principal actor dentro de mi proyecto de vida, gracias por tu sonrisa, amor, sueños y por esas palabras de aliento que a pesar de la lejanía y ausencia física han sido mis impulso importante en mis momentos difíciles.

*Mis tías Paz y Arcelia*, que son un modelo ejemplar en su género como mujeres y profesionistas con alta calidad humana, y que en momentos de dificultades han demostrado fortaleza física y espiritual, luchando cada día apoyándose en todo lo cultivado a lo largo de los años, que hoy se traduce en cosecha abundante de cariño y apoyos incondicionales.



*Al Dr. Ríos y el equipo de Neurología,* El profesionalismo, valores y compromiso social que los convierten en parte importante de mi formación como neonatóloga, la amistad que siempre se me manifestó como un invaluable apoyo, palabras de aliento o un profundo consejo nunca faltaron, así como su generosidad que ponían de manifiesto en cada sesión, visita a pacientes o interpretación clínica, y especialmente por mostrarme lo importante que es el cerebro ajeno y el propio como neonatólogos ante un pronóstico de vida y funcionalidad.

*Mtra. María del Pilar, Dra. Guido y todos en seguimiento Pediátrico,* Una bella manera de cuidar a los niños, un ejemplo del compromiso, sus enseñanzas como: mostrar que la detección y rehabilitación es responsabilidad de todos.

*A mis amigos Residentes y actores fundamentales de este Instituto,* especialmente a quienes estuvieron presentes en los momentos difíciles, que me tendieron la mano y ayudaron a mantenernos a flote, gracias por entrañables conversaciones y sonrisas que me alimentaban el alma.

*A mis profesores de áreas críticas de UCIN y UCIREN, Dra. Hernández, Dra. Romero, Dra. Cordero y Dra. Coronado* por la exigencia y enseñanzas en los procedimientos de urgencia, la importancia de los conocimientos médicos, ventilación mecánica, farmacología, fisiopatología, la templanza y fortaleza aprendida para afrontar la enorme responsabilidad ante la toma de decisiones que implican vida o muerte para nuestros pequeños pacientes.

*A mis Directores de tesis Mtro. Héctor Flores y su equipo de colaboradores, Dr. Maida,* Ejemplo de profesionalismo y compromiso, Héctor un investigador que me ha mostrado una visión diferente de la medicina, ha sembrado en mi esa inquietud por generar conocimiento de problemas cotidianos que se traducirán en beneficios para recién nacidos, su amistad y apoyo a través de esta convivencia fue creciendo.



Dra. Maida como Neonatólogo investigador fue medio para la realización de este proyecto y su acompañamiento para la identificación de problemas clínicos en el recién nacido durante sus primeras horas de vida.

*A Diana Soriano Becerril* por el análisis e identificación de las bacterias en las muestras de sangre de los recién nacidos.

*Al Dr. Fernández Carrocera Jefe de la División de Neonatología*, por ser eje, y personaje en el Instituto, con sus acciones y estrategias de atención médica ha dejado huella, escribiendo la Historia en este Instituto Nacional de Perinatología por más de veinte generaciones, reforzando los valores y conceptos fundamentales en la práctica médica, a través de su diario proceder. Su apertura ante nuestras necesidades y la preocupación por sus residentes ante cada circunstancia vivida, hoy solo reconocerle y agradecer su apoyo, con el compromiso de continuar en el camino de la formación integral aún como especialista.

*A la División de enfermería asignados al área de Neonatología*, que siempre mostraron compromiso en el servicio, la calidez del trato al paciente y la enorme importancia del trabajo en equipo con calidad, además fueron el consuelo y apoyo emocional en los momentos difíciles de nuestro andar.

*A la Institución*, que a lo largo de su historia ha sido responsable y formador de agentes de cambio para México, agradezco el otorgarnos condiciones para nuestra formación única y especial, atendiendo la importancia que ha adquirido la neonatología en el desarrollo social, por abrir puertas a la gente más sobresaliente del país para hacer de nosotros los mejores.

*A mis Pacientes los neonatos*, que en sus primeras horas de vida me brindaron las experiencias y conocimientos que me transformaban día a día en un Neonatólogo, consciente de las limitaciones que esta profesión tiene, entendiendo perfectamente que nuestros talentos se convierten en instrumentos de Dios.



## RESUMEN

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

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

**Material y Métodos:** Las muestras de sangre neonatal fueron obtenidas por punción de la vena en dos grupos de estudio: sin (control; n=15) y con evidencias de sepsis temprana (casos; n=29). El hemocultivo se desarrollo con 500µl de sangre para el crecimiento de gram-positivas y gram-negativas. El DNA bacteriano se aisló a partir de 50 µl de sangre mediante el reactivo de DNAzol. Los geles desnaturalizantes se prepararon con urea y formamida en un rango de 20-70%. La electroforesis se corrió a 60°C y 60V por 16 horas; posteriormente los geles fueron teñidos con SYBR-DNA. Las bandas fueron visualizadas en luz ultravioleta.

**Resultados:** En los casos con sepsis neonatal temprana, el hemocultivo aisló en el 21% y 7% de los casos, a una bacteria y dos bacterias respectivamente. Las bacterias que se identificaron fueron *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. La bacteria que tuvo una mayor frecuencia de aislamiento en el hemocultivo fue *Escherichia coli* 6.89% (dos pacientes). En relación con el método molecular obtuvimos en los 29 casos con sepsis neonatal temprana se logro el amplificado con un tamaño esperado de 233 pares de bases que corresponde con el dominio-3 del 16S rDNA. Sin embargo, al evaluar el corrimiento electroforético en gradiente observamos ninguna banda que pudiéramos asociar con alguna bacteria patógena.

**Conclusiones:** El hemocultivo corroboró en el 21% de los casos el proceso de sepsis; sin embargo, la prueba molecular PCR-DGGE no logró corroborar en ninguno de los 29 casos el proceso de infección. La baja sensibilidad del análisis molecular de PCR-DGGE puede deberse al prolongado almacenamiento de las muestras antes de su análisis electroforético. En éste sentido proponemos nuevas condiciones para el manejo del DNA bacteriano.

**Palabras C lave:** *Sepsis Neonatal Temprana; Hemocultivo; Gene 16S rDNA; Electroforesis en Gradiente Desnaturalizante.*



## ABSTRACT

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

**Objetive:** The objective main of this study was detected the bacterial involved in the development of early neonatal sepsis by the 16S rDNA gene amplification.

**Materials and Methods:** Blood-samples of newborns without (control group, n=15) and with clinical early neonatal sepsis evidences (cases, n=29) was admitted to the neonatal intensive care unit of National Institute of Perinatology, México City. In the cases of early sepsis blood samples were obtained before beginning any of the therapeutic treatment. In all the cases the blood was obtained by punction of the vein. Five hundred microliters of blood was used for the microbial analysis of gram-positive and gram-negative bacteria. Fifty microlites of blood was used for the extraction of the DNA which was analysis for the PCR-DGGE. The specific primers to PCR amplified of variable-3 region of 16S rDNA was used. The analysis for DGGE consisted in 8% acrilamide/bis-acrilamide electrophoresis plus urea and formamide range 20-70% by the denaturing electrophoretic conditions for 16 hours to temperature and constant voltage.

**Results:** In cases with early neonatal sepsis, blood culture was isolated in 21% and 7% one and two bacteria, respectively. The bacteria identified were *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. The bacteria had a higher frequency of isolation was *Escherichia coli* 6.89% (two patients). In relation to the molecular method obtained in the 29 cases with early neonatal sepsis was successfully amplified with the expected size of 233 bp corresponding to the domain-3 of the 16S rDNA. However, in assessing the denaturing gradient electrophoretic shift did not observe any band that we associate with some pathogenic bacteria.

**Conclusions:** The blood culture confirmed in 21% of cases the process of sepsis, however, the PCR-DGGE molecular test failed to corroborate any of the 29 cases the infection process. The low sensitivity of molecular analysis of PCR-DGGE may be due to prolonged storage of samples before electrophoretic analysis. In this sense, we propose new conditions for management of bacterial DNA.

**Keywords:** Neonatal sepsis; Hemocultive; Gene 16S rDNA; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.



## 1.0 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Síntesis del Proyecto.

La sepsis neonatal es un problema de salud pública a nivel mundial, su incidencia se presenta en 1 a 8 casos por cada 1,000 nacimientos; sin embargo, el desarrollo clínico de ésta patología produce hasta el 40% de la mortalidad y morbilidad registradas anualmente en las unidades neonatales de cuidados intensivos [1-7]. En el Hospital General de México la tasa es de 4 a 15.4 casos por cada 1000 recién nacidos vivos [5-7].

El cuadro clínico inicial de la sepsis neonatal presenta signos y síntomas inespecíficos, son poco intensos y puede ser confundidos como manifestaciones transitorias de adaptación del recién nacido. La evolución del proceso clínico-infeccioso puede ser fulminante, llevando a la muerte al neonato en cuestión de horas después de su detección clínica; esta condición se complica en neonatos prematuros con menos de 32 semanas de gestación y menores de 1000 gramos, en los cuales el diagnóstico oportuno representa un reto [7-13,26].

La corroboración clínica de la sepsis neonatal se realiza mediante el hemocultivo, el cual es considerado el “estándar de oro” y constituye una importante herramienta de diagnóstico; sin embargo, esta técnica tiene diversas limitaciones relacionadas con: 1) el volumen de sangre que se obtiene del recién nacido, 2) la viabilidad de los microorganismos para su crecimiento, 3) se requieren de micronutrientes específicos para el crecimiento bacteriano, 4) solo se detectan ciertos microorganismos específicos, 5) se requieren de por lo menos cinco días para el reporte bacteriológico y 6) menos del 40% de las muestras analizadas se logra identificar a algunas bacteria patógenas [26]. Por lo anterior es importante que el cuerpo médico neonatal cuente con métodos confiables de detección que apoyen la toma de decisiones para el manejo terapéutico en aquellos casos con evidencias clínicas de sepsis neonatal.

Actualmente en nuestro grupo de investigación se está comenzando a explorar la biota bacteriana patógena contenida en sangre neonatal mediante la amplificación del gene 16S

rDNA en combinación con la electroforesis en gradiente desnaturizante (PCR-DGGE) [23]. En el presente estudio se analizará en sangre a las bacterias involucradas en el desarrollo de la sepsis neonatal temprana mediante la prueba molecular de PCR-DGGE.

## 1.2 Planteamiento del Problema

La sangre es la muestra biológica, en la cual se identifican a las bacterias responsables de la sepsis neonatal. A diferencia del volumen de sangre que se obtiene de un adulto en los recién nacidos éste es menor a 1.0 mililitro y se ha estimado que en ésta se encuentran aproximadamente 500 bacterias o unidades formadoras de colonias, de las cuales no todas son viables para su desarrollo en condiciones *in vitro*, estas condiciones reducen la sensibilidad y especificidad del hemocultivo como prueba de diagnóstico [3,4]. Del total de las muestras analizadas mediante el hemocultivo solo en el 39.0% de los casos se da un reporte positivo para la identificación de las bacterias patógenas asociadas con la sepsis neonatal temprana, el resto de los casos se mantiene la incertidumbre si el resultado negativo es debido a la baja sensibilidad y especificidad del hemocultivo como prueba de diagnóstico [26].

Actualmente existen diversas estrategias moleculares que no dependen del cultivo bacteriológico y permiten la identificación de diversos microorganismos. Estas estrategias se basan en el análisis del DNA bacteriano [31]. Uno de los blancos moleculares actualmente utilizados es la amplificación de la región variable del gene 16S rDNA lo que ha permitido la identificación en sangre de diversas bacterias patógenas tanto cultivables como las no-cultivables [26-30]. El 16S rDNA ofrece grandes ventajas con respecto al hemocultivo 1) requiere de pequeñas cantidades de sangre neonatal, 2) no se requiere de la viabilidad celular bacteriana, 3) es capaz de detectar diversas bacterias, 4) tiene mayor sensibilidad y especificidad con respecto al hemocultivo, y 5) requiere de 24 horas para la identificación de las bacterias causantes de la infección [26-30].

Recientemente Zavala-Díaz de la Serna y cols (2009) analizaron en 15 neonatos con evidencias clínicas de sepsis la detección bacteriana en 14 (93.3%) del total de las muestras analizadas. En este estudio se reportó la detección simultánea de dos bacterias en 12 casos (85.7%) y en 2 casos solo se detectó una bacteria (14.3%). La prueba molecular de PCR-DGGE logro identificar 2.3 veces más casos clínicos con respecto al obtenido por el hemocultivo, corroborando la decisión medica. En el presente estudio se tiene como objetivo la detección de las bacterias en los neonatos con evidencias clínicas de sepsis neonatal temprana [34].

### 1.3 Antecedentes

La sepsis neonatal es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas evidentes de infección sistémica. Las bacterias al entrar en contacto con la sangre, pueden diseminarse e infectar diferentes órganos y tejidos en los que se encuentran meningitis, neumonía, artritis, osteomielitis e infecciones del tracto urinario [1].

La identificación y corroboración de la sepsis neonatal temprana es un reto para el cuerpo médico encargado de las unidades de terapia intensiva, con el fin de unificar, facilitar y brindar herramientas diagnósticas en materia de sepsis, en el 2001 y 2005 en el Consenso Internacional de Sepsis en Pediatría, se reunieron 20 expertos en investigación clínica provenientes de 5 países, quienes plantearon definiciones, criterios y conceptos para el diagnóstico de sepsis.

#### 1.3.1 Datos Epidemiológicos de la Sepsis Neonatal.

La incidencia de sepsis neonatal de acuerdo a la bibliografía internacional varía entre 1-8 por mil nacidos vivos [2, 3, 24, 25]. En México, en el Instituto de Perinatología, se reporta una incidencia de hasta 19 casos por cada 1,000 recién nacidos vivos, incidencia muy por encima de lo reportado por Velazco Murillo y cols (2003). La incidencia de sepsis neonatal de acuerdo a los datos del National Neonatal Perinatal Database 2002 en la India es de 30



por cada 1000 nacidos vivos [1,4]. La tasa de mortalidad varía de acuerdo a la bibliografía consultada entre un 30-40% [1-7] y se observan tasas más altas en recién nacidos prematuros y de bajo peso al nacimiento.

### 1.3.2 Clasificación

De acuerdo al intervalo de tiempo en el cual son evidentes y sostenidas las manifestaciones clínicas de sepsis en el neonato, ésta es clasificada como: 1) sepsis neonatal temprana y 2) sepsis neonatal tardía.

#### Sepsis neonatal temprana.

Inicia cuando el neonato desarrolla los signos y síntomas en las primeras 72 horas de vida extrauterina, las vías por la cual el neonato adquiere y desarrolla sepsis temprana son 1) durante su desarrollo gestacional, como producto de un proceso materno-infeccioso (corioamnionitis y vaginosis bacteriana) estos factores son considerados factores de riesgo para el posible desarrollo de sepsis neonatal temprana, aunado a estos se tiene taquicardia fetal (mayor 16 latidos por minuto), fiebre materna ( $<38^{\circ}\text{C}$ ), infecciones urinarias y vaginales maternas; y 2) al momento del nacimiento cuando el neonato contacta a las bacterias del tracto cérvico-vaginal. Las bacterias comúnmente asociadas a la sepsis neonatal temprana son *Streptococo agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, y *Enterococcus sp*.

#### Sepsis neonatal tardía.

Es el proceso infeccioso que aparece a partir de las 72 horas de vida extrauterina, el origen más frecuente es nosocomial o la adquirida en la comunidad, siendo las formas de presentación, vía respiratoria (neumonía), septicemia o meningitis, las más frecuentes. Las bacterias asociadas a la sepsis tardía son *Staphylococcus coagulasa* negativo, *S. aureus*, *Enterococcus sp*, *E coli*, *Klebsiella sp*, *Pseudomona spp*, *Streptococcus agalctiae* y *Listeria monocytogenes*.



La sepsis nosocomial, tiene una incidencia del 2 a 5% de todos los recién nacidos hospitalizados y hasta un 15% de los recién nacidos ingresados en la unidad de cuidados intensivos por más de 48 horas.

Varios factores predisponen el incremento de eventos de sepsis en el recién nacido como son: el bajo peso al nacimiento y la prematurez ocupan los primeros lugares, admisión a unidades de cuidados intensivos, uso de ventilación mecánica, procedimientos invasivos y administración de líquidos parenterales.

Los prematuros son los más afectados, desarrollando sepsis nosocomial un 25-50% de los menores de 29 semanas de gestación al nacimiento y un 50 a 80% en los menores de 25 semanas. Factores que incrementan el riesgo de sepsis neonatal tardía adquirida en el entorno familiar incluye una inadecuada higiene del cordón umbilical, biberones y alimentos prelácteos. En contraste la alimentación por pecho materno ayuda a prevenir infecciones [1]. Por otra parte, las tasas de mortalidad en recién nacidos podrían ser aún tan altas como de un 30 a 50%.

### 1.3.3 Manifestaciones Clínicas

Los signos y síntomas de la sepsis temprana son inespecíficos y pueden atribuirse a otras causas transitorias en el recién nacido; sin embargo, debido a la rapidez del deterioro de los neonatos con verdadera sepsis y al éxito demostrado del tratamiento temprano, los médicos que se enfrentan al manejo de un recién nacido con datos clínicos sugestivos, deben realizar rápidamente una sospecha diagnóstica, y a su vez llevar a cabo pruebas diagnósticas auxiliares para el inicio oportuno de la terapia antimicrobiana .

Síntomas inespecíficos: alteraciones en la termorregulación, apneas y bradicardia, distrés respiratorio o quejido, letargia o irritabilidad, fiebre o hipotermia, hipo o hiperglicemia, acidosis, hipotonía, vómito, o intolerancia de la vía oral episodios de cianosis,



convulsiones, hipertensión pulmonar persistente, hipoperfusión, piel marmorea, acidosis metabólica, petequias o púrpura, ictericia inexplicada y datos clínicos de choque.

Las manifestaciones clínicas es el pilar del diagnóstico. Pero el aislamiento de un microorganismo (bacterias, virus, hongos) en sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, otros líquidos (peritoneal, articular, etc.) o en diferentes órganos, como pulmón o hígado, constituye el método de diagnóstico de sepsis más exacto y confirmatorio.

Se considera conveniente la realización de diversos estudios de laboratorio que nos permiten valorar la respuesta inflamatoria sistémica a la cual está siendo sujeta el recién nacido.

#### 1.3.4 Pruebas Clínicas para la Determinación de la Sepsis Neonatal.

Después de que se ha determinado clínicamente la sepsis neonatal, se inicia el tratamiento terapéutico el cual está enfocado a la eliminación de la sintomatología infecciosa y normalizar los signos vitales del recién nacido. Dependiendo de las características clínicas, el neonatólogo decide que muestras biológicas deberán de tomarse para el análisis bioquímico de laboratorio. La figura 1 indica los diferentes sitios que se realizan para la toma de las muestras biológicas para la corroboración de la sepsis neonatal.

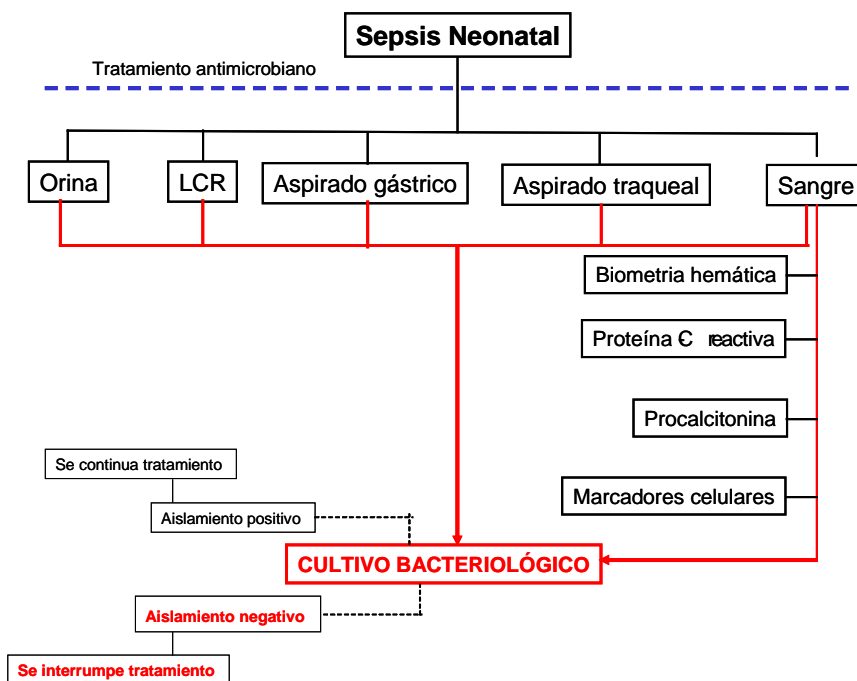


Figura 1. Diagrama en el que se señalan las diferentes muestras corporales para la búsqueda de agentes infecciosos. Líquido cefalorraquídeo (LCR).

### Orina.

La orina se obtiene por punción vesical supra-púbica o por caterización de la uretra. El urocultivo en neonatos antes de las 72 horas de vida tiene baja sensibilidad y en ausencia de anomalías anatómicas conocidas (ecografía fetal) no está recomendado. Sin embargo, su realización es obligada en todos los recién nacidos evaluados por sepsis tardía.

### Líquido cefalorraquídeo (LCR).

El análisis del LCR logra predecir entre el 20 al 25% de las sepsis neonatales asociada a meningitis. Este procedimiento no debe aplicarse si existe inestabilidad hemodinámica o diátesis hemorrágica. Es importante determinar si existe o no afección meníngea en relación a la dosis y tipo de antibiótico a emplear y la duración del tratamiento, por lo que



debe de practicarse una punción lumbar en cuanto lo permitan las condiciones clínicas del neonato. La prueba de LCR, es útil para la identificación de meningitis, ya que éste padecimiento complica un número importante de los casos de sepsis. Se ha reportado que los neonatos con meningitis pueden tener hemocultivos negativos y que la selección y duración del tratamiento antimicrobiano es diferentes en presencia de infección del sistema nervioso central.

#### *Aspirado gástrico.*

La toma de la muestra gástrica tiene la finalidad de demostrar la presencia de un número anormal de polimorfonucleares (más de 5 por campo), lo cual indica un proceso infeccioso. La sensibilidad y especificidad de éste procedimiento es muy baja y no se recomienda como una medida diagnóstica de rutina.

#### *Aspirado traqueal.*

En las fases tempranas de la sepsis neonatal los microorganismos patógenos pueden llegar al pulmón. Sólo hasta en el 30% de los casos existe el aislamiento del agente infeccioso y hasta del 40% en el caso del aspirado endotraqueal el cual se practica en los niños con intubaciones prolongadas.

#### *Sangre*

La sangre, es la muestra biológica por la cual se analiza y se confirma si en el neonato están presentes diferentes marcadores de infección, variaciones en la cuenta inmunológica celular (biometría hemática), incremento de proteínas secretadas en fase aguda de infección (proteína C-reactiva y procalcitonina) y marcadores de superficie de la respuesta inmunológica innata (CD11-b y CD 64) así como la identificación de las bacterias patógenas los agentes etiológicos de la sepsis.

*a) Biometría hemática.*

En la Biometría hemática se busca el incremento ( $>20,000$  células/ mL) o la disminución ( $<5,000$  células/mL) de la cuenta leucocitaria total. Estas variaciones sugieren el desarrollo de un proceso infeccioso. La relación entre los neutrófilos inmaduros y totales (I/T;  $x>0.16$ ) deben ser tomadas en cuenta. La cantidad de plaquetas por debajo de lo normal (100,000 células/mL) es un importante indicador de la fase tardía de la infección. Otras alteraciones como los neutrófilos vacuolados o la aparición de granulaciones tóxicas en su interior, deben alertar al clínico sobre la posibilidad de un proceso infeccioso activo. <sup>(14,15-17)</sup> Este análisis tiene una sensibilidad del 38% [15-17].

*b) Proteína de fase aguda C-reactiva (PC-R).*

Esta proteína es la inmunoglobulina producida por el hígado en respuesta a un proceso inflamatorio en fase aguda. Su concentración en suero comienza a aumentar en el transcurso de 6 a 8 horas después del estímulo inflamatorio. Su pico máximo se tiene entre las 12-24 horas, aumentando su concentración hasta 1,000 veces durante la fase aguda de la infección, siendo su sensibilidad de 60% [(12)]. Las mediciones seriadas a las 24 y 48 horas aumenta la sensibilidad (82%) y especificidad (84%). Los valores normales de la PC-R son de 1.6 mg/dl en los primeros dos días de vida y de 1.0 mg/dl a partir de esa edad. Se han encontrado valores superiores hasta en 80% de los recién nacidos con infección bacteriana. Esta prueba llega a dar falsos positivo ante eventos de hemorragias intraventriculares, aspiración de meconio, enterocolitis necrosante, asfixia primaria, neumotórax, cirugía e inmunización, ruptura prolongada de la membranas fetales, pueden causar elevación de los valores de la PC-R [13].

*c) Procalcitonina (PCT).*

La PCT es una proteína de 116 aminoácidos y es producida principalmente en las células “C” de la glándula tiroideas y por monocitos y las células hepáticas inducida por las endotoxinas bacterianas [10]. Tiene una concentración máximas 6 – 8 horas y permanecen elevados durante 24 horas. La vida media de la PCT es de 25 a 30 horas y las



concentraciones séricas no parecen afectarse por la edad gestacional, su sensibilidad y especificidad que varían de 87 – 100%, concentración asociada con la neurotransmisión, inmunomodulación y control vascular durante la infección y en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

*d) Marcadores celulares de superficie.*

Involucrados en la detección temprana de sepsis neonatal. Se sabe que antígenos de superficie específicos de los leucocitos se expresan en cantidades sustanciales después de que las células inflamatorias son activadas por bacterias o sus productos celulares, entre los que destacan interleucina IL-6, IL-8, Factor de necrosis tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), marcadores de superficie CD11-b y CD64 [9,20-22].

*e) Cultivo bacteriológico.*

La detección de las bacterias patógenas causantes de las infecciones se realiza mediante el cultivo bacteriológico de la sangre (hemocultivo), el cual ha sido empleado en la clínica como el estándar de oro para la identificación, aislamiento y permite determinar la susceptibilidad bacteriana a diferentes antibióticos. El hemocultivo requiere de dos condiciones necesarias para el desarrollo y crecimiento de las bacterias [3,4]. La primera, está en relación con la calidad propia del inóculo, es decir, que las bacterias sean viables para que se desarrollen en los medios condicionados, además se requiere que la muestra contenga la cantidad mínima de unidades formadoras de colonias (UFC) para que el analista observe un crecimiento en los tiempos estimados para cada tipo de bacteria. Se ha determinado que en condiciones óptimas se requieren de aproximadamente  $10^5$  UFC para ser detectadas mediante el cultivo bacteriológico [15]. A diferencia del volumen que obtienen de los adultos, en los neonatos es menor a 0.5 mL de sangre y se ha estimado en éste un contenido de aproximadamente 200 UFC, de las cuales no todas son viables para su desarrollo. Esta situación reduce considerablemente la sensibilidad para la detección de las bacterias por el cultivo bacteriológico [4,16].

La segunda condición, está determinada por los requerimientos diferenciales del medio de cultivo (nutrientes esenciales y pH óptimo) así como de las condiciones de incubación (temperatura, presión de CO<sub>2</sub>) las cuales están desarrolladas y dirigidas para cada tipo de bacteria.

Del total de las muestras analizadas sólo el 40% se logra el crecimiento de las bacterias y sólo son detectadas aquellas para los cuales está dirigido el cultivo. El 60% de las muestras analizadas no se detecta el crecimiento de las bacterias causantes de la sepsis neonatal, más aún en estas muestras existe un porcentaje de resultados falsos negativos; es decir, aunque estén presentes las bacterias no se observa su crecimiento.

Finalmente, el cultivo bacteriológico, no logra analizar el contenido total de las bacterias que pudieran ser de interés para el entendimiento etiológico de la enfermedad [15,16].

En las unidades especializadas en el cuidado del recién nacido se requieren de métodos confiables que apoyen la toma de decisiones para el manejo terapéutico de aquellos casos con evidencias clínicas y subclínicas de sepsis neonatal. Recientemente la región variable ribosomal del 16S rDNA ha sido utilizada como blanco molecular bacteriano para la exploración e identificación de las bacterias contenidas en muestras biológicas de interés humana [5,6].

#### *f) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

La amplificación del ácido nucleico (DNA) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una metodología que si bien tiene su impacto en áreas de investigación básica, está comenzando a ser aplicada en los laboratorios de microbiología clínica y biomédicos de la salud humana [27].

La PCR tiene mayor sensibilidad y especificidad para la detección de las bacterias patógenas en muestra de sangre neonatal en comparación con el hemocultivo (Tabla 1).



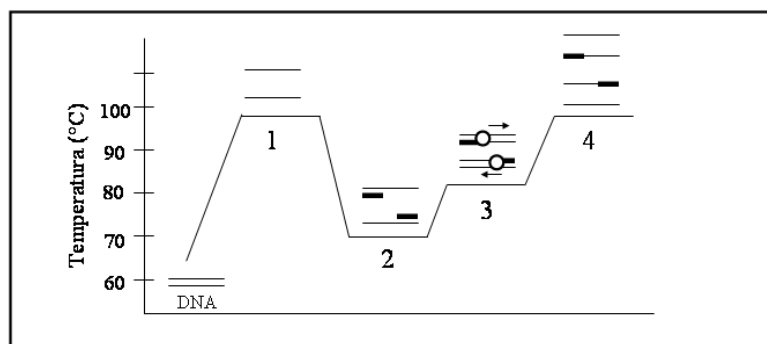
**Tabla 1.** Comparación en la sensibilidad y especificidad entre el hemocultivo y la amplificación molecular del DNA bacteriano por PCR.

	<b>Hemocultivo</b>	<b>PCR</b>
Sensibilidad	<b>&lt; 40 %</b>	<b>100 %</b>
Especificidad	<b>&lt; 60 %</b>	<b>97 %</b>
Cantidad de células requeridas	~200	1
Viabilidad celular	Requerida	NR
Medios de crecimiento	Requeridos	NR
Volumen de sangre requerida	600 a 800 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Días para el reporte	2 a 4	1

No requerido (NR), microlitros ( $\mu$ l)

A diferencia del hemocultivo, la PCR no requiere 1) viabilidad bacteriana para la detección; 2) crecimiento bacteriano previo; 3) 1 mL de sangre neonatal. Sin embargo, el método molecular por PCR requiere 1) termociclador; 2) la enzima catalítica de la reacción (Taq DNA polimerasa); 3) nucleótidos (adenina, timina, citocina y guanina); 4) iniciadores específicos y 5) un día para dar el reporte bacteriológico. La PCR ha identificado una amplia gama de microorganismos en los que se incluyen hongos, virus, protozoarios y bacterias [26-30]. Estas características favorecen a la PCR para ser empleada como herramienta de diagnóstico clínico.

El principio de la PCR, está determinada por diferentes etapas las cuales consisten en variaciones simultáneas de temperaturas las cuales son automatizadas en el termociclador (Figura 2).

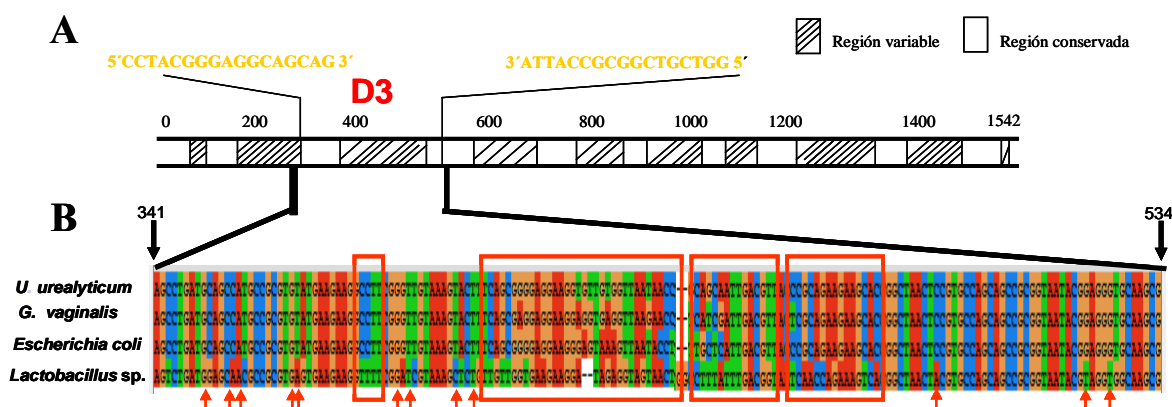


**Figura 2. Muestra las cuatro etapas de la PCR.** Separación de la doble cadena de DNA (etapa 1), alineación de los iniciadores (etapa 2), activación y extensión de la DNA polimerasa (etapa 3), y inicio del ciclo nuevamente (etapa 4). La amplificación del DNA es exponencial con respecto a la concentración de DNA inicial. La línea negra, indica el posicionamiento de los iniciadores en el DNA y el círculo indica la activación de la DNA polimerasa, las flechas indican la dirección en la extensión del DNA.

La primer etapa es el incremento en la temperatura a 92°C (45 segundos) lo que produce que la cadena doble de DNA se separe en dos cadenas sencillas; cada una de éstas, servirá de moldes. La segunda etapa, consiste en la disminución de la temperatura a 55°C (30 seg.) permitiendo que los iniciadores, se unan a regiones específicas en la cadena sencilla del DNA. Estos iniciadores son necesarios para que la Taq DNA polimerasa comience a unir bloques de nucleótidos a la cadena en formación. El tercer paso, consiste en la activación de la Taq DNA polimerasa a 72°C (45 seg), la cual adiciona las bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina y timina) de acuerdo a la secuencia específica del DNA molde. En ésta etapa se produce la extensión del DNA y se da por terminado el ciclo de amplificación e inicia nuevamente hasta finalizar con el total de los ciclos programados (entre 20 a 35 repeticiones de la etapa 1 a la 4). En la última fase, se da una extensión a 72°C (7 minutos) en la cual la Taq DNA polimerasa concluirá las extensiones de aquellos amplificados inconclusos durante el proceso de amplificación. El resultado, de la amplificación es incrementar exponencialmente el número de copias del DNA inicial.

La PCR ha detectado *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. neumoniae*, *Listeria monocytogenes*, y *Ureaplasma urealyticum* en más casos de sepsis con respecto al hemocultivo [9,33]; sin embargo, este tipo de PCR tiene la limitante de ser específico para la detección de la bacteria que se buscan y por lo tanto no analiza a otras bacterias que pudieran estar contenidas en la muestra de sangre. Una alternativa es mediante la amplificación del gen 16S ribosomal (16S rDNA).

La figura 3 muestra un esquema estructural del gene 16S rDNA señalando a los 1542 aminoácidos organizados en 9 dominios estructurales cada uno con las regiones conservadas y variables (lo que permite diferenciarlas entre sí). El 16S rDNA, ésta presente tanto en las bacterias cultivables como las no cultivables [26-30]. La identidad bacteriana del 16S rDNA se realiza en combinación con otras estrategias moleculares como la clonación bacteriana, secuenciación o mediante el análisis de la electroforesis en gradientes desnaturalizantes (DGGE).



**Figura 3.** Esquema que representa los 1542 nucleótidos de la subunidad ribosomal del 16S con los 10 dominios conservados y 10 dominios variables (A). El dominio-3 inicia en el aminoácido 341 y termina en el 534 y se señalan (cajas rojas) el dominio variable de identidad molecular bacteriano para algunas de las bacterias (B).

El principio físico-químico de la electroforesis, es la migración diferencial de biomoléculas (proteínas, ácido ribonucleico y desoxibonucleico) a través de una matriz inerte, (acrilamida o agarosa) y es sometido a un campo eléctrico. La separación de las biomoléculas depende de su tamaño a mayor volumen el cual está directamente relacionada a la movilidad electroforética sobre la matriz. En el caso de la electroforesis por DGGE utilizado para el análisis de los amplificadores de la PCR-DNA bacteriana, la matriz de acrilamida contiene dos agentes desnaturizantes (urea y formamida) en gradiente que van de 0 a 100 % de concentración. El producto de PCR-DNA al migrar por la matriz desnaturizante se irán rompiendo los enlaces débiles de hidrógeno del DNA que se forman entre las bases nitrogenadas (Adenina-Timina y Citosina-Guanina). Entre mayor sea el porcentaje de CG (forma tres enlaces de hidrógeno) contenida en la secuencia amplificada, se requerirá de mayor concentración de urea-formamida para abrir la cadena de DNA por lo que esta secuencia migrará más en la matriz de acrilamida [27]. Al término de la electroforesis, el gel es teñido con bromuro de etidio y éste es visualizado en un analizador de imágenes con luz ultravioleta. La identificación inicial de las muestras de interés se realiza con respecto a la movilidad de referencia de las bacterias conocidas usadas como marcador de especies (Figura 2).

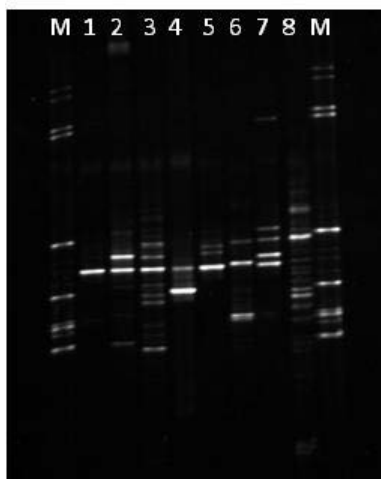


Figura 4. Gel de DNA en gradiente desnaturizante DGGE. Marcador de especies bacteriana (M); carril 1-8 muestras de pacientes.

Diversas evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la PCR-DGGE, es una metodología que permite la identificación de diversas bacterias cultivables y no-cultivables *Atopobium vaginae*, *Eggertella*, *Bacteroides fragilis*, *Faecalibacterium prauznitzii*, *Tanerellaforsythensis* y *Deferribacter*, las cuales no han sido identificadas por el cultivo bacteriológico convencional [28].

Burton y colaboradores (2004), han demostrado mediante la PCR-DGGE la presencia de bacterias como *Atopobium vaginae* y *Eggertella*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Slackia exigua* y *Prevotella bivia* en exudados cérvico-vaginales. Estas bacterias tienen alta resistencia a los tratamientos antibacterianos usados en la vaginosis bacteriana. La detección de estas bacterias está permitiendo conocer y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en reducir la incidencia de las infecciones vaginales ocasionadas por éste tipo de patógenos [28-32].

## 2.0 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La sepsis neonatal temprana tiene la mortalidad más alta registrada en las unidades de cuidados intensivos, por lo que es necesaria una herramienta independiente del hemocultivo que corrobore el diagnóstico clínico/terapéutico antes de las 72 horas y que posea alta sensibilidad y especificidad reduciendo los resultados falsos negativos, lo que reduciría posibles trastornos fisiológico en el neonato, resistencia bacteriana, reduzca los días de estancia intrahospitalaria, y a su vez disminuya los trastornos económicos y psicológicos que esto ocasiona en los padres del neonato.

La PCR-DGGE, es una herramienta rápida y efectiva que puede identificar a las bacterias patógenas involucradas en sintomatología de la sepsis neonatal. Con una propuesta innovadora como la PCR-DGGE con mayor sensibilidad que los marcadores actuales pretendemos ofrecer mejores tratamientos terapéuticos oportunos dirigidos a la salud neonatal.



En nuestro grupo de investigación, estamos proponiendo a la PCR-DGGE como una herramienta molecular para la detección de las bacterias contenidas en muestras de sangre neonatal con sospecha clínica evidente de sepsis neonatal temprana. En el presente estudio se explorará la biota bacteriana total en casos con sepsis neonatal temprana.



### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

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

#### 3.2. Objetivos particulares

1. Detectar en sangre neonatal a *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus*, *Eschericia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Listeria monocytogenes* mediante el hemocultivo.
2. Detectar en sangre neonatal a *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus*, *Eschericia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Listeria monocytogenes* mediante la amplificación por PCR-DGGE.
3. Analizar y comparar mediante un cuadro descriptivo el resultado obtenido entre el hemocultivo y el análisis molecular de PCR-DGGE del 16S rDNA.

### 4.0 HIPÓTESIS

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



## 5.0 DISEÑO DEL ESTUDIO.

### 5.1. TIPO DE INVESTIGACION.

Observacional y descriptivo.

### 5.2. TIPOS DE DISEÑOS.

Investigación Biomédica

### 5.3. CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO.

En relación al método de observación: Transversal.

En relación al tipo de análisis: Analítico

En relación a la temporalidad: Prospectivo

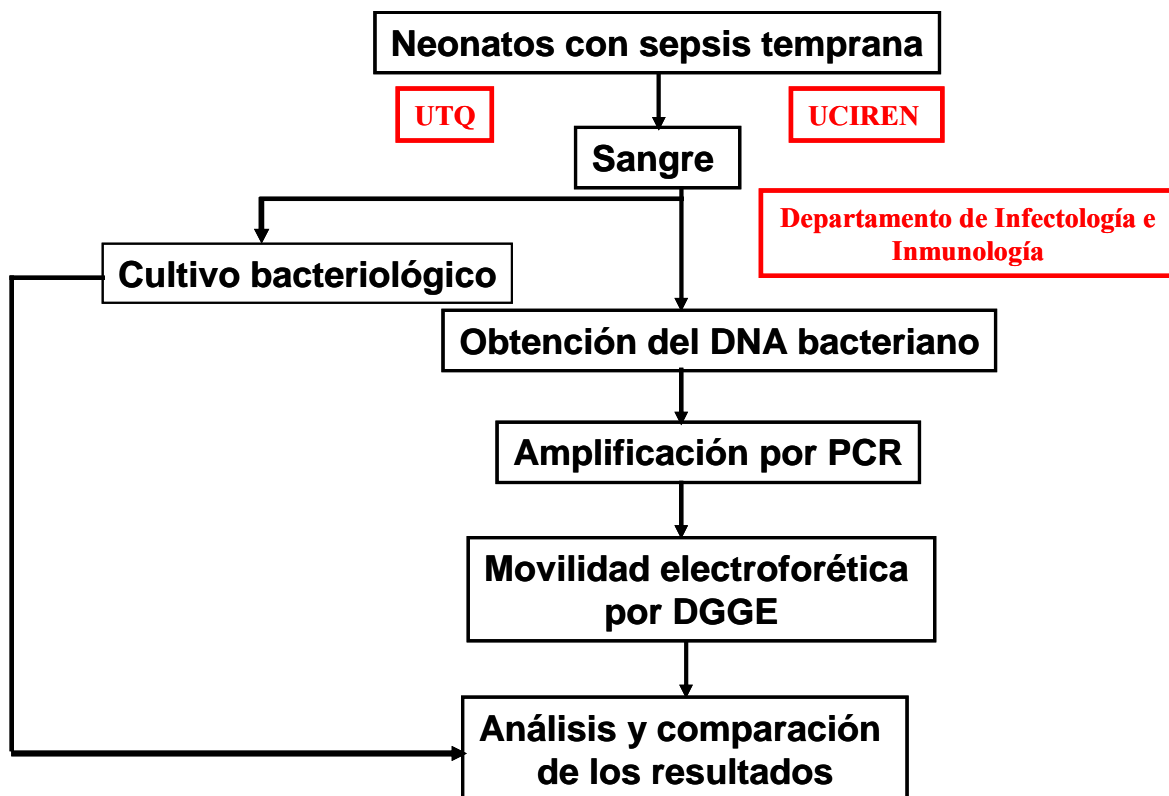
### 5.4. VARIABLES DE ESTUDIO.

Variable dependiente: Sepsis neonatal temprana.

Variable independiente: Las diferentes cepas que son comúnmente asociadas con el desarrollo de la sepsis *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Listeria monocytogenes*.



**Figura 5 Diseño general d el estudio.** Se describe el lugar de la toma de sangre de los neonatos con signos y síntomas de infección temprana y el procedimiento para la identificación microbiológica bacteriana.



## 6.0 MATERIAL Y METODOS

### 6.1. Universo de Estudio

Todos los recién nacidos con antecedentes de riesgo de sepsis neonatal temprana atendidos en la unidad tocoquirurgica, en el Instituto Nacional de Perinatología “Espinosa de los Reyes” (INPerIER). Las muestras sanguíneas fueron obtenidas en el periodo comprendido de Agosto del 2009 a Agosto del 2010.

### 6.2. Tamaño de la Muestra

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

- N = Total de la población (en este caso se puede usar un promedio de los nacimientos del 2007 y 2008), entonces serian: 5,410
- $Z_{\alpha}$  = 1.962 (si la seguridad es del 95%)
- p = proporción esperada (Seria si 5410 es el 100%, el porcentaje de casos en el año es de: 1.5% como mínimo y 2.43 como máximo (0.015 o 0.024) Estos valores se toman de los casos positivos a germen (82) y los reportados por epidemiología (132).
- q = 1 – p (en este caso 1-0.015 = 0.985, o 1-0.024)
- d = precisión (en este caso deseamos un 3%, 0.03).

$$n = \frac{5410 \times 1.96^2 \times 0.024 \times 0.976}{0.03^2 (5410-1) + 1.96^2 \times 0.024 \times 0.976}$$

Se puede hacer el cálculo con cualquiera de los dos valores de la proporción esperada o p (0.015 o 0.024).

Si el valor de n sale muy alto (mayor de 100), puedes usar con la otra fórmula (como en el ejemplo):

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$  (ya que la seguridad es del 95%)
- $p$  = proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)
- $q = 1 - p$  (en este caso  $1 - 0.05 = 0.95$ )
- $d$  = precisión (en este caso deseamos un 3%)

$$n = \frac{1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.03^2} = 203$$

Las dos son válidas, usa la que te salga un valor menor.

Según diferentes seguridades el coeficiente de  $Z_{\alpha}$  varía, así:

- Si la seguridad  $Z_{\alpha}$  fuese del 90% el coeficiente sería 1.645
- Si la seguridad  $Z_{\alpha}$  fuese del 95% el coeficiente sería 1.96 (esta es la seguridad mínima que se espera en un estudio que puede ser publicable en una revista de investigación)
- Si la seguridad  $Z_{\alpha}$  fuese del 97.5% el coeficiente sería 2.24
- Si la seguridad  $Z_{\alpha}$  fuese del 99% el coeficiente sería 2.576

### 6.3. Criterios de Selección

#### 6.3.1 Inclusión

Todo recién nacidos vivos hijo de madre con antecedentes riesgo de sepsis neonatal temprana y/o datos clínicos (Escala de NOSEP 1) en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes "INPer IER".

#### 6.3.2 Exclusión

Paciente el cual no cuente con la toma correspondiente de 50 microlitros de sangre para el procesamiento molecular de muestra. Que haya iniciado tratamientos antimicrobianos antes de la toma de la muestra y que no se cuenten con el registro clínico completo.



## 6.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES

### *Neonatales*

**Edad:** se obtendrá el dato del expediente. Se tomará como unidad de medición en días.

- **Género:** se obtendrá el dato del expediente (femenino o masculino).
- **Peso:** se obtendrá el dato del expediente (unidad de medición en gramos)
- **Hipotermia:** temperatura axilar  $<36^{\circ}\text{C}$
- **Fiebre:** Temperatura axilar  $>37.5^{\circ}\text{C}$
- **Taquicardia:** frecuencia cardiaca  $>160$  latidos/min
- **Bradicardia:** frecuencia cardiaca  $<100$  latidos/min
- **Taquipnea:** frecuencia respiratoria  $>60$  respiraciones/min
- **Quejido:** sonido espiratorio audible
- **Distensión abdominal:** incremento del perímetro abdominal en 2 cm
- **Residuo gástrico:**  $>20\%$  del volumen alimenticio aspirado antes de la alimentación, al menos en 2 ocasiones en 24 horas
- **Retracción torácica:** visualización de las costillas en cada inspiración
- **Letargia:** dificultad persistente en despertarse, sin medicación sedativa.
- **Neutrofilia:** valor total de neutrófilos  $>14,500/\text{mm}^3$
- **Neutropenia:** valor total de neutrófilos  $<7,500/\text{mm}^3$
- **Trombocitopenia:** valor total de plaquetas  $<100,000/\text{mm}^3$  en menores de 10 días y  $<150,000/\text{mm}^3$  en las 3 semanas siguientes.
- **Proteína C reactiva (normal):** se define como los valores séricos  $\leq 0.8\text{mg/dl}$
- **Proteína C reactiva (positiva):** se define como los valores séricos  $>0.8\text{mg/dl}$



## VALIDACION DE DATOS

### 6.3 ANALISIS ESTADÍSTICO

La edad materna, edad gestacional y el peso del recién nacido fueron analizados mediante la mediana con intervalo de rango. Posteriormente, se utilizaron las pruebas estadísticas de *t*-student para la comparación de variables continuas y la  $X_i^2$  y exacta de Fisher para la comparación de variables discretas o nominales.

### 6.4 METODO DE RECOLECCION DE INFORMACION

Se realizara en todo recién nacido que ingrese a la unidad toco quirúrgica (UTQ) o Unidad de cuidados Intermedio del recién nacido UCIREN con factores de riesgo y/o datos clínicos sugestivos de sepsis neonatal temprana. La toma de sangre se realizara por medio de punción de vena con obtención de 800  $\mu$ L (hemocultivo Bactec) y 50  $\mu$ L (PCR-DGGE) para la identificación bacteriana. Las muestras se obtendrán de la misma punción neonatal. El historial clínico materno y neonatal se registrará en la hoja de recolección de información.

### 6.5 Obtención de las Muestras.

De acuerdo a los criterios establecidos para evaluar el desarrollo clínico de infección se asignarán dos grupos 1) neonatos con evidencia clínica y de laboratorio de sepsis neonatal temprana y 2) neonatos sanos a los cuales se les tomo una muestra de sangre para otros análisis ajenos al proceso infeccioso (control). Cada muestra de sangre es perfectamente rotulada con el número del registro materno asignado por el INPer. La toma de la sangre se obtuvo con la previa autorización y firma de consentimiento informado de la madre (Anexo 1).

A los neonatos se le tomó una muestra de sangre periférica considerando un volumen total de 0.8mL la cual será tomada por punción de la vena y la realizará el neonatólogo adscrito

y que colabora en el desarrollo del presente estudio. Para evitar cualquier interferencia con el crecimiento bacteriológico y con la prueba molecular, las muestras fueron tomadas antes de que sea iniciado cualquier esquema antimicrobiano. Quinientos microlitros de sangre neonatal será procesada y analizada mediante el hemocultivo y cincuenta microlitros fueron analizados por la prueba molecular de PCR-DGGE en el departamento de infectología e inmunología del INPer.

### 6.5 Identificación de los Microorganismos por hemocultivo.

La sangre (0.5 mL) se deposita en botellas de hemocultivo pediátricas Bact/Alert (Dirham, Biomerieux) las que se monitorean constantemente durante 14 días. Este sistema automatizado emite una alarma cuando el cultivo bacteriológico es positivo. Posteriormente éstas son sembradas en medios de cultivo con micronutrientes específicos y se incuban a 37°C a presión constante de CO<sub>2</sub>. Una vez desarrolladas las colonias microbianas se les realiza la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa, lo que permitirán clasificarlas en dos grupos: negativas y positivas.

#### Identificación de las bacterias Gram-negativas.

Las bacterias Gram-negativas son aquella que no retienen el colorante de cristal de violeta en su pared celular. Los principales grupos son Enterobacterias y bacilos no fermentadores, los cuales se diferencian por la prueba positiva de oxidasa.

#### Identificación de las bacterias Gram-positivas.

Las bacterias Gram-positivas son aquella todas aquellas que retienen el colorante de cristal de violeta en su pared celular Los grupos microbianos representativos son *Staphylococcus*, los cuales se diferencian por la prueba positiva de catalasa.

## 6.7 Identificación de los Microorganismos por PCR-DGGE.

### Extracción del DNA total.

La sangre (50µL) es colectada en tubos MicroTainer que contienen EDTA (Becton-Dickerson) y son mezclados por inmersión. La extracción y amplificación del DNA bacteriano a partir de las muestras sanguíneas se realizará en el laboratorio de la Subdirección de Investigación Biomédicas. Para la extracción del DNA se toman 50 µl de sangre y se mezclan con un mililitro del reactivo de DNAzol (InvitroGene) el procedimiento se realiza con las recomendaciones del fabricante que consisten en mezclar vigorosamente la mezcla por 3 minutos y se centrifuga a 14 000 rpm (Eppendorf 5415) por 5 minutos. El sobrenadante es retirado y el DNA es resuspendido y lavado con 500 µL de etanol (100%) y se centrifuga nuevamente. El lavado se repite dos veces más con 500 µL de etanol (75%). Finalmente el DNA es estabilizado con 50 µL de hidróxido de amonio (8.0 mM) y se almacena a -20°C.

El DNA es cuantificado por espectrofotometría a una Absorbancia de 260 y 280 nm y es analizado en geles de agarosa al 1.0% con el amortiguador que contiene 0.89 M de Tris, 0.89 M Borato y 0.02 M (TBE) 1X a 60 V por 30 minutos. El gel es teñido con bromuro de etidio (5 µg/mL) y las bandas de DNA son visualizadas en un equipo (Gel Doc 2000, Bio-Rad) en luz ultravioleta. La imagen es fotodocumentada y almacenada para su registro.

### Amplificación del dominio-3 del 16S rDNA

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

La mezcla de la reacción se llevará a cabo en tubos Eppendorf para PCR de 0.2 mL en un termociclador (Techne touchgene gradient). Cada tubo de PCR contiene la mezcla de



reacción amortiguador (InvitroGene), 2 mM de  $MgCl_2$ , 0.8 mM de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) 40 pmol de iniciadores, 5U de Taq DNA polimerasa recombinante (InvitroGene) y agua de Milli-Q (Millipore) toda la reacción a un volumen de 25.0  $\mu$ L. Las condiciones de PCR son

Desnaturalización 92°C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de (desnaturalización 92°C por 45 segundos, alineamiento 55°C por 30 segundos, amplificación 72°C por 45 segundos) y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Al término de la PCR se toman 5  $\mu$ L de cada una de las reacciones de amplificado del DNA y se visualizan en geles de agarosa al 1.0% con las condiciones de corrimiento antes descritas. Se detecta una banda con un peso molecular de aproximadamente 233 pares de bases la cual es la esperada para la región V3 del 16S rDNA. El resto del amplificado (20  $\mu$ L) se utiliza su corrimiento electroforético en DGGE.

#### Identificación presuntiva de las bacterias mediante la movilidad electroforética en geles con gradientes desnaturalización (DGGE).

La preparación de los geles de acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad) al 8.0% con gradientes desnaturalizantes se harán de acuerdo a las recomendaciones previamente descritas por Burton y Reid (2002) para el sistema de detección universal D-Code (BioRad). La mezcla desnaturalizante se prepara en un rango de 20 a 70 % partiendo de una solución concentrada 100 % (7 M de urea y 40 % de formamida). La polimerización de los geles se realiza con la adición de 13  $\mu$ L de N,N,N',N'-tetramethylethylenediamina (TEMED; Sigma) y 50  $\mu$ L de persulfato de amonio 10% (Sigma).

En cada uno de los pozos formados del gel se adiciona 20  $\mu$ L de DNA amplificado el cual estará previamente mezclado con 6  $\mu$ L de amortiguador de corrimiento (250  $\mu$ L de azul de bromofenol [2.0 %], 7.0 mL de glicerol y 2.5 mL de agua Milli-Q). Los geles se correrán en la cámara de D-Code a 60 V con TBE (1x) como amortiguador a temperatura constante de 60°C por 16 horas. Al término de este tiempo, los geles se tiñen con el





reactivo de Vista-Green a dilución de 1:1000 (Amersham Bioscience) en amortiguador de TBE (1x) y se incuban a temperatura ambiente y en agitación por 1 hora. Las bandas se visualizan en un transiluminador con luz ultravioleta y las imágenes se capturan en un fotodocumetador (Gel Doc 2000. Bio-Rad). La identificación presuntiva de las bacterias de las muestra se realiza con respecto a la movilidad del marcador de referencia de las diferentes bacterias usadas.

## 7.0 RESULTADOS

Durante el período en el cual se desarrollo éste estudio, se proporcionó atención perinatal a 3,677 recién nacidos; reportándose 113 casos de sepsis neonatal con sintomatología clínica desarrollada en las primeras 72 horas de vida y que cumplieron con los criterios inclusión requeridos para el desarrollo del presente estudio (Departamento de Estadística Agosto 2009-Mayo 2010). Del total de las muestras se excluyeron 14 (12.38%) por no haberse obtenido la cantidad de sangre requerida para el análisis microbiológico y la prueba molecular; 50 (44.24%) debido a que se les iniciaron los tratamientos antimicrobianos y 20 (17.69%) por no tener la autorización materna correspondiente. Se analizaron 44 muestras de sangre las cuales fueron asignados a dos grupos de estudio: grupo control (n=15) el cual estuvo conformado por recién nacidos sanos a los cuales se les tomo una muestra de sangre para otros análisis ajenos al proceso infeccioso y el grupo de neonatos con desarrollo clínico de sepsis neonatal (n=29).

### *Datos epidemiológicos maternos de la población de estudio.*

En el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, se proporciona servicios de salud a población provenientes diversas zonas de la República Mexicana, consideradas de alto riesgo por infertilidad, patologías crónicas maternas, o complicaciones obstétricas, así como de alto orden fetal. Las pacientes ingresadas al estudio fueron en su mayoría provenientes del Distrito Federal, y del estado de México (datos no mostrados). El consumo de drogas (alcohol y tabaco) fue del 40% en el grupo control y del 24% en las madres del grupo de sepsis neonatal; sin embargo, no se encontró una diferencia entre ambos grupos (dato no mostrado;  $p=0.074$ ). La vía de nacimiento tanto para el grupo control (100%) como el de sepsis neonatal (90%) por indicaciones médicas (hipertensión, corioamnioítis, ruptura de membranas fetales y sufrimiento fetal) fue por cesárea.

La tabla 2 muestra las características maternas de los dos grupos de estudio. La edad materna ( $p=0.023$ ), complicaciones médicas (hipertensión, preeclamsia, diabetes

gestacional;  $p=0.047$ ) y las infecciones en el tercer trimestre del embarazo (ruptura prematura de las membranas fetales y corioamnioítis;  $p=0.001$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 2). El número de gestas ( $p=0.29$ ) y el trabajo de parto espontáneo ( $p=0.176$ ) no mostraron diferencias estadísticas entre ambos grupos.

Tabla 2. Características clínicas maternas de la población de estudio.

	Control n=15	Sepsis neonatal n=29	<i>p</i> -valor
Edad (años) <sup>a</sup>	36.41 ± 3.9	33.76 ± 3.3	0.053
Complicaciones médicas (%)	9.0 (60.0)	15.0 (51.0)	0.047
Infecciones en el tercer trimestre del embarazo (%)	7.0 (46.66)	27.0 (93.1)	0.001
Número de gestas			
Multigestas (%)	11.0 (73.33)	15.0 (51.73)	0.290
Trabajo de parto			
Espontáneo (%)	7.0 (46.67)	21.0 (72.41)	0.176

<sup>a</sup> los valores se presentan en media ± desviación estándar.

### *Datos epidemiológicos y clínicos de los neonatos de estudio.*

La tabla 3 muestra las características clínicas de los 44 neonatos del grupo control y del grupo de sepsis neonatal. El sexo del recién nacido (masculino y femenino;  $p=0.203$ ), el APGAR medido a los 5 minutos ( $p=0.781$ ) y la cuantificación de la proteína reactiva-C ( $p=0.101$ ) no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Tabla 3).

El peso al momento del nacimiento ( $p=0.023$ ), edad gestacional ( $p=0.010$ ), manifestaciones clínicas (taquicardia, fiebre, taquipnea;  $p=0.015$ ) y la cuenta de células hemáticas ( $p=0.025$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 3).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en el grupo de sepsis neonatal fueron la taquicardia (3.44%), fiebre (10.34%) y taquipnea (34.48%) incrementándose la cuenta celular en leucopenia (24.13%), bandemia (13.79%) y neutrofilia (3.44%) y la proteína de fase aguda C-reactiva (24.13%).

En todos los casos con sospecha clínica de sepsis neonatal se inicio el esquema antimicrobiano de acuerdo a las normas de operatividad institucionales. Doce (42%) de los neonatos se les administró Beta lactamico (ampicilina) en combinación con aminoglucocido (Amikacina). Al finalizar el tratamiento se requirió que en once (38%) se les iniciara el segundo esquema antimicrobiano con cefalosporina (cefotaxima) y vancomicina.

Tabla 3. Características clínicas del recién nacido de la población de estudio.

	Control n=15	Sepsis neonatal n=29	<i>p</i> -valor
Peso (gramos) <sup>a</sup>	36.407 ± 3.93	33.76 ± 3.28	0.023
Edad (semana gestacional) <sup>b</sup>	3204.0 ± 274.35	1772.0 ± 725.82	0.010
Sexo			
Masculino	5 (33.33)	17 (58.62)	0.203
Femenino	10 (66.67)	12 (41.38)	0.203
APGAR a los 5 minutos mayor de 7	14.0	28.0	0.781
Manifestaciones clínicas (%)	1.0 (6.66)	14.0 (48.27)	0.015
Biometría hemática (%)	1 (6.66)	13 (44.8)	0.025
Proteína de fase aguda C-reactiva mayor de 6	0	7 (24.13)	0.101
Identificación bacteriológica (%)			
Hemocultivo	0	7 (24.0)	0.077
16S rDNA			

<sup>a,b</sup> los valores se presentan en media ± desviación estándar.  
Subunidad ribosomal 16S rDNA (16S rDNA).



## *Resultados bacteriológicos por el hemocultivo y por el 16S rDNA de los neonatos de estudio.*

### *Hemocultivo.*

Al evaluar el crecimiento bacteriológico de las 44 muestras de sangre de los neonatos control (n=15) y del grupo de sepsis temprana (n=29), encontramos que en el grupo control no se aisló ningún microorganismo (Tabla 3); mientras que en el grupo de sepsis temprana se observó el crecimiento bacteriológico en 7 de los 29 casos (24%; Tabla 4).

En los siete casos se aisló a *Estafilococcus* (14.28%), *Enterococcus* (3.44%), *Escherichia coli* (6.89%), *Enterobacter* (14.28%), *Klebsiella pneumoniae* (14.28%) y *Klebsiella spp* (14.28%) como las bacterias más frecuentemente detectadas (Tabla 4). En los 7 neonatos con identificación positiva se detectaron simultáneamente dos bacterias en 2 de 29 casos (6.0%; neonatos 9 y 15). La bacteria que obtuvo una mayor frecuencia de aislamiento fue *E. coli* con el 6.0% y se presentó en los neonatos 8 y 9 (tabla 4). En el paciente 17 (3%) se aisló a *Cándida albicans* como el agente etiológico de la sepsis temprana (tabla 4).

Tabla 4. Comparación entre el cultivo bacteriológico y el 16S rDNA de los 29 casos con sepsis neonatal temprana.

Sepsis Neonatal	Identificación por hemocultivo	Número de bandas detectadas por el 16S rDNA
1	CBN	0
2	CBN	0
3	CBN	0
4	CBN	0
5	<i>Estafilococcus</i>	0
6	<i>Enterococcus</i>	0
7	CBN	0
8	<i>Eschericia coli</i>	0
9	<i>Eschericia coli</i>	0
	<i>Enterobacter</i>	
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
11	CBN	0
12	CBN	0
13	CBN	0
14	CBN	0
15	<i>Klebsiella</i>	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
16	NCB	0

NCB: Crecimiento Bacteriológico Negativo.

Tabla 4. *Continuación.*

Sepsis neonatal	Identificación por hemocultivo	Número de bandas detectadas por el 16S rDNA
17	<i>Cándida albicans</i>	0
18	CBN	0
19	CBN	0
20	CBN	0
21	CBN	0
22	CBN	0
23	CBN	0
24	CBN	0
25	CBN	0
26	CBN	0
27	CBN	0
28	CBN	0
29	CBN	0

CBN: Crecimiento Bacteriológico Negativo.

#### *16S rDNA.*

De las 44 muestras de sangre a las cuales se les aisló el DNA bacteriano no obtuvimos amplificación de las muestras de sangre del grupo control (n=15); sin embargo, observamos un amplificado de 233 pares de bases del grupo de los neonatos con sepsis temprana (n=29) que corresponde al dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S rDNA (Fig. 5).

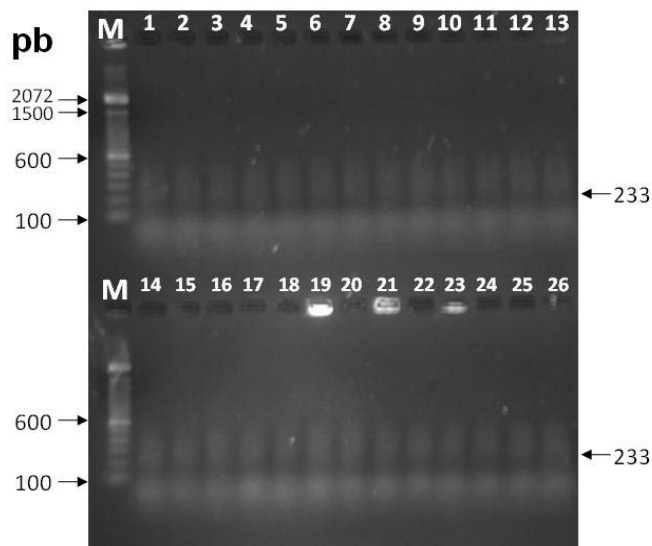


Figura 6. Amplificación del dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S rDNA de las muestras de sangre neonatal. Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), carriles de 1-26 muestras de sangre de los neonatos con sepsis. La flecha indica el tamaño de 233 pares de bases que corresponde con al dominio-3 de la subunidad ribosomal 16S rDNA.

Al someter las 29 muestras de DNA bacteriano de los neonatos con sepsis a la electroforesis en gradiente (20-70%) desnaturalizante (DGGE) no observamos en ninguna de las muestras el patrón de banda/bacteria sobre la matriz del DGGE (dato no mostrado).



## 8.0 DISCUSION

La sepsis neonatal temprana puede cursar con signos y síntomas similares a los del periodo de adaptación del recién nacido; sin embargo, la identificación de sepsis en las primeras horas de vida es la diferencia entre la atención oportuna y la evolución infecciosa dramática del recién nacido.

Una de las estrategias de laboratorio que confirma el diagnóstico clínico de sepsis neonatal temprana, es mediante el hemocultivo; el cual tiene como objetivo, detectar e identificar la biota bacteriana patógena responsable del proceso infeccioso así como determinar su sensibilidad ante los tratamientos antimicrobianos.

En el presente estudio encontramos que el 48% de los neonatos presentaron manifestaciones clínicas de infección (taquicardia, fiebre, y taquipnea) y el 44.8% tuvieron biometría hemática elevada (leucopenia, bandemia y neutrofilia). Sin embargo, solo en 7 pacientes (24%) se logró el aislamiento e identificación bacteriológica responsable de la sepsis neonatal temprana (Tabla 3). La baja sensibilidad y especificidad del hemocultivo como prueba de diagnóstico se debe: 1) La viabilidad de los microorganismo para su desarrollo en condiciones in vitro 2) Los nutrientes esenciales para el crecimiento microbiológico; y el volumen requerido de muestra para su análisis. Estas limitaciones del hemocultivo como prueba de diagnóstico clínico, hacen la necesidad de contar con otras alternativas de diagnóstico.

La amplificación del dominio-3 del gene 16S rDNA en combinación con la electroforesis en gradientes desnaturizantes (PCR-DGGE) es una alternativa para la identificación de diversas bacterias implicadas en la salud humana (25, 27-31). Mediante la utilización de la PCR-DGGE, analizamos 29 muestras de neonatos con signos y síntomas de sepsis temprana; sin embargo, en ninguno de los casos fue posible la identificación de acuerdo a la movilidad electroforética asociadas a alguna bacteria patógena (Tabla 3).

En éste estudio tuvimos limitaciones de la técnica de amplificación del dominio-3 del gene 16S rDNA que pudieran haber contribuido con el resultado negativo de la PCR las cuales enumeramos a continuación: 1) La calidad del DNA bacteriano obtenido, pudo haberse deteriorado antes de su análisis molecular, ya que el periodo comprendido entre la toma de la muestra y su análisis fué de aproximadamente 12 meses, [32]; 2) consideramos que en las muestras obtenidas el DNA bacteriano pudiera contener enzimas que inhiben o afectan la actividad de la Taq polimerasa por lo que su rendimiento no fue el optimo para el análisis de la electroforesis en gradientes desnaturalizantes [33] y 3) La concentración del 16S rDNA amplificado fuera menor al rango de detección por el DGGE

Recientemente Zavala-Díaz de la Serna y colaboradores (2009) demostraron mediante la amplificación del 16S rDNA en combinación con el DGGE la exploración inicial de las bacterias involucradas en la sepsis neonatal. La PCR-DGGE, corroboró 2-veces casos de sepsis neonatal con respecto al hemocultivo y en 6 de 15 casos la asociación de entre 2 a 7 bacterias involucradas con el proceso infeccioso (34). En esas muestras existe una banda constante en el 60% de los casos de sepsis neonatal analizados. El patrón de movilidad en el DGGE de las bacterias no fueron detectadas en el grupo de neonatos sin sepsis neonatal.

En conclusión, se confirmó que la prematurez y el bajo peso al nacimiento, en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” se consideran como factores de riesgo para el desarrollo de alguna infección neonatal; sin embargo, no se encontró alguna asociación con datos clínicos valorados al nacimiento como lo es la respiración espontánea, tono, actividad motora, llanto y coloración, evaluada mediante el APGAR. Las manifestaciones clínicas (fiebre, taquipnea, taquicardia) observadas y la presencia de alteraciones en la citometría hemática sugirieron el establecimiento del proceso infeccioso en la mayoría de los casos; sin embargo, en todos los casos se iniciaron tratamientos y se dio una estrecha monitorización durante 48 a 72 horas para confirmar sospecha diagnóstica. El hemocultivo solo corroboró el 21% de los casos el desarrollo de sepsis neonatal temprana del total de pacientes incluidos. En este sentido, será de gran utilidad la incorporación de técnicas moleculares como la PCR-DGGE para la identificación de los



casos en el que se sospeche el desarrollo de sepsis neonatal, ya que este cuenta con la ventaja de menor tiempo para la confirmación diagnóstica y tiene mayor sensibilidad.



## 9.0 PERSPECTIVAS

La amplificación del dominio-3 del 16S rDNA es un buen blanco molecular para la identificación de las bacterias en muestras de sangre neonatal asociadas a la sepsis neonatal temprana como previamente lo hemos demostrado (Zavala-Díaz de la serna, 2009); sin embargo, se requiere mejorar el procedimiento de extracción y conservación del DNA bacteriano para optimizar la amplificación y detección en los geles desnaturalizantes. Para lo cual realizaremos las siguientes incorporaciones a la metodología de extracción 1) Se realizará en un periodo de tiempo menor para la extracción de DNA bacteriano y el análisis electroforético; 2) solubilizaremos el DNA en amortiguador de DPEP para reducir la actividad proteolítica del DNA y el efecto sobre la enzima catalítica Taq polimerasa; 3) Se realizaran estrategias de sensibilización y difusión en los médicos tratantes para la obtención de la muestra de sangre al momento de toma de hemocultivo iniciar antibióticos.

En nuestro grupo de investigación proponemos, además de la identificación molecular bacteriana contar con otros marcadores de infección como la interleucina 1-beta y el factor de necrosis tumoral-alfa las cuales forman parte integral del proceso inflamatorio, así como de marcadores de superficie celular de la respuesta inmunológica innata.

## 10.0 BIBLIOGRAFIA

1. M. Jeeva Sankar et al. Sepsis in the Newborn. *Indian J Pediatr* 2008; 75 (3) : 261-166
2. M. Gonzales y cols . Identificación de marcadores hematológicos para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana, en el Hospital Militar Regional de Irapuato, Gto. *Rev Sanid Milit Mex* 2006; 60(6) Nov – Dic : 390-396
3. R. Villegas y cols. Diagnóstico etiológico de sepsis neonatal basado en factores de riesgo e índices hematológicos. *Enf Inf Microbiol* 2008 28(2): 51-59
4. Velasco-Murillo V y cols . Causalidad y tendencia de la mortalidad perinatal hospitalaria en el IMSS, 1998-2002 *Cir Ciruj* 2003; 71: 304-313
5. Miranda-Del-Olmo H et al. Morbilidad y mortalidad del recién nacido prematuro. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2003; 66 (1): 22-28
6. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, et al: International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005 Jan;6(1):2-8.
7. Gonzalez et al, Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J Perinat Med* 31(2003) 60-68
- 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.
8. Mussap M. et al. Biochemical markers for the early assessment of neonatal sepsis: the role of procalcitonin. *J Chemother* 2007; 19 (2) 35-38
9. Kocabas E, et al. Role of procalcitonin, C-reactive protein, Interleukin -6, interleukin -8 and tumor necrosis factor – alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr* 2007, 49 (1):7-20
10. Vazzalwar et al. Procalcitonin as a screening test por Late-Onset Sepsis in Preterma Very Low Birth Weight Infants. *Journal of Perinatology* 2005; 25:397 – 402
11. Hoyos A. “Guías Neonatales de práctica clínica basada en evidencia” Distribuna Editorial Médica, Bogotá, Colombia. 2006. Guía 6 Pág. 6-1 6-98



12. Couto R. et al. C-Reactive Protein –Guided Approach May Shorten Length of Antimicrobial Treatment of Culture-Proven Late-Onset Sepsis. An Intervention Study. *BJID* 2007; 11(2): 240-245
13. Ng, Cheng, Chui, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child* 1997; 77:F221-F227.
14. Morag, I et al Leukocytosis in very low birth weight neonates: associated clinical factors and neonatal outcomes. *J Perinatol* 2008
15. L Brown, T Shaw, W A Wittlake. Does leucocytosis identify bacterial infections in febrile neonates presenting to the emergency department? *Emerg Med J* 2005;22:256–259.
16. Brown RE et al. Effects of Sepsis on Neonatal Thrombopoiesis. *Pediatr Res.* 2008 Jun 11
17. Colarizi P. et al, Circulating thrombopoietin levels in neonates with infection. *Acta Paediatr.* 1999 Mar;88(3):332-7.
18. Lam HS, et al. Biochemical markers of neonatal sepsis. *Pathology.* 2008 Feb;40(2):141-8..
19. Ng PC et al Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr.* 2006 Apr;18(2):125-31.
20. Laborada G. et al, Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2003 Nov;20(8):491-501.
21. Zuppa AA et al, Evaluation of C reactive protein and others immunologic markers in the diagnosis of neonatal sepsis . *Minerva Pediatr.* 2007 Jun;59(3):267-74
22. Ng PC et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997 Nov;77(3):F221-7.
23. Flores-Herrera et al. Identificación de bacterias causales de sepsis neonatal mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) *Acta Pediatrica Mex* 2009;30 (3):148-155.
24. Reier-Nilsen et al. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study *BMC Pediatrics* 2009, 9:5



25. Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, Jones KG, Brozanski BS: Evaluating the near-term infant for early onset sepsis: progress and challenges to consider with 16rDNA polymerase chain reaction testing. *J Mol Diagn* 2006, 8:357-363.
26. Jordan JA, Dueso MB: Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DAN directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 2005, 7:575-581.
27. Muyzer G, De Wall E, Uitterlinder A. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(3):695-700.
28. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nungent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis* 2002; 186:1770-80.
29. Jordan J, Durso M, Real time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *JMD* 2005; 7(5), 575-581.
30. Jordan J, Durso M, Butchko A, Jones J, Brozanski B, Evaluating the near Term Infant for early onset sepsis. Progress and challenges to consider with 16S r DNA polymerase chain reaction testing. *JMD* 2006; 7 (3):357-363.
31. Payne SM., Goss KCW., Connet GJ., Kollamparambil T., Legg JP., Thwaites R., Ashton M., Puddy V., Peacock JL., Bruce KD. Molecular microbiological characterization of preterm neonates at risk of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 67(4):412-418.
32. Katsoulis J., Heitz-Mayfield LJ., Weibel M., Hirschi R., Lang NP. Impact of samples storage on detection of periodontal bacterial. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:128-130.
33. Von Wintzingerode F., Gobel UB., Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR- based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 21:213-229.
34. Zavala-Díaz de la Serna F., Zamorano-Jiménez A., Solís- Herrera H., Iyescas-Medrano E., Maida-Claros R., Becerril-Soriano D., Flores-Herrera H. Use of 16S rDNA gene PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for detection of neonatal sepsis. *International Sepsis Forum* 2009; november 11-14. P73.



## **11.0. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de investigación para la Salud que según se estipula en el Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, se trata de una investigación sin riesgo. El manejo y procesamiento de la sangre conlleva un riesgo mínimo. Las 44 muestras fueron tomadas por la neonatóloga Rosa Isela García Gudiño.





## ANEXO 1: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha de inicio: AGOSTO 2009.

Fecha de Término: JULIO 2010.

	Agosto A Octubre 2009	NOV 2010	DIC 2010	ENERO 2010	FEB 2010	MARZO 2010	ABRIL JUNIO 2010	JULIO 2010
Revisión bibliográfica	■	■	■	■	■	■		
Elaboración del protocolo	■							
Obtención de la información	■	■	■	■	■	■	■	
Procesamiento y análisis de datos		■	■	■	■	■	■	■
Elaboración del informe técnico final							■	■
Divulgación de resultados								■



## ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de los pacientes en este estudio conlleva un tipo de riesgo: Con riesgo mínimo

### TEXTO DECLARATORIO

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO \_\_\_\_\_  
(Nombre del participante o de su representante legal)

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

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

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

NOMBRE

FIRMA

PARTICIPANTE  
REPRESENTANTE  
INVESTIGADOR  
TESTIGO



### **ANEXO 3. RECURSOS HUMANOS**

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

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

**Asesores Clínico:** DR. ROLANDO MAIDA CLAROS

- Asignación de los grupos por las características clínicas de infección
- Revisión bibliográfica
- Revisión de protocolo de investigación

**Tesista:** ROSA ISELA GARCIA GUDIÑO

- Identificación de los casos con sepsis neonatal
- Obtención de la sangre de los recién nacidos
- Amplificación del gene 16S rDNA
- Discusión bibliográfica
- Elaboración del protocolo



## **ANEXO 4. RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS.**

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

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

Rosa Isela García Gudiño es Médico Pediatra; actualmente es residente del último año de Neonatología, del INPerIER. Obtuvo la beca *“Carlos Slim para el Impulso a la Investigación en Salud”* (2010-11) para la realización de esta investigación. Fue otorgada el 23 de Abril de 2010 en el “Foro Impulso 2010” por el *Instituto Carlos Slim de la Salud A.C.*