



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE  
LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

**“IDENTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE  
PATÓGENOS MÁS FRECUENTES ASOCIADOS A SEPSIS  
EN PACIENTES DE LAS TERAPIAS INTENSIVAS DEL  
HOSPITAL REGIONAL LIC. ADOLFO LÓPEZ MATEOS.”**

Trabajo de Investigación que presenta:  
**DRA. SILVIA ALEJANDRA VICTORIA MARES**

Para obtener el diploma de Especialidad en:  
**NEONATOLOGIA**

ASESOR DE TESIS:

**M. EN C. JACQUELINE SOLARES TLAPECHCO  
DRA ALMA OLIVIA AGUILAR LUCIO**

**NÚMERO DE REGISTRO:  
673.2018**

**AÑO: 2019**



**ISSSTE**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E  
INVESTIGACIÓN

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES  
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

“IDENTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE  
PATÓGENOS MÁS FRECUENTES ASOCIADOS A SEPSIS  
EN PACIENTES DE LAS TERAPIAS INTENSIVAS DEL  
HOSPITAL REGIONAL LIC. ADOLFO LÓPEZ MATEOS.”

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

DRA. SILVIA ALEJANDRA VICTORIA MARES

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN:

NEONATOLOGIA

ASESOR DE TESIS:

M. EN C. JACQUELINE SOLARES TLAPECHCO  
DRA ALMA OLIVIA AGUILAR LUCIO

NÚMERO DE REGISTRO:

673.2018

AÑO: 2019



ISSSTE

---

---

DR. DANIEL ANTONIO RODRÍGUEZ ARAIZA  
COORDINADOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

---

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

---

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO  
JEFE DE INVESTIGACIÓN

---

---

---

DRA. PERLA KARINA GARCÍA MAY  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEONATOLOGIA

---

M. EN C. JACQUELINE SOLARES TLAPECHCO  
ASESOR DE TESIS

---

DRA. ALMA OLIVIA AGUILAR LUCIO  
ASESOR DE TESIS

"Cualquiera que conserve la capacidad de ver la belleza no  
envejecerá nunca"

Franz Kafka

## **RESUMEN**

La sepsis neonatal es una de las tres primeras causas de mortalidad a nivel mundial y también de morbilidad, en especial en paciente prematuros y de bajo peso al nacimiento.

Sepsis neonatal temprana definida como aquella que inicia las primeras 72 horas de vida; y sepsis tardía que se presenta posterior a 72 horas de vida. Cuentan con patógenos específicos como causantes de enfermedad y por lo tanto tratamiento orientados estos patógenos.

El hemocultivo es el estándar de oro para realizar el diagnóstico de sepsis neonatal tanto temprana como tardía, sin embargo en la revisión de literatura se encuentra que es bajo el porcentaje de aislamiento de microorganismos en el cultivo. Existen además de pruebas de laboratorio datos clínicos que orientan a la sospecha de sepsis que conforman síndrome de sepsis.

La prueba de PCR es una propuesta para la detección de microorganismos causantes de sepsis que muchas veces no se aíslan en el hemocultivo a través de realizar secuencia de ADN de los patógenos asociados más frecuentemente.

La presente tesis hace un estudio pareado comparando hemocultivos de pacientes con datos clínicos de sepsis y factores de riesgo para desarrollarla con la prueba de reacción en cadena de polimerasa.

## **ABSTRACT**

Neonatal sepsis is one of the three leading causes of mortality worldwide and also of morbidity, especially in premature and low birth weight patients.

Early neonatal sepsis defined as that which begins the first 72 hours of life; and late sepsis that occurs after 72 hours of life. They have specific pathogens as the cause of disease and therefore treatment aimed at these pathogens.

Blood culture is the gold standard for the diagnosis of neonatal sepsis, both early and late, however in the literature review it is found that the percentage of isolation of microorganisms in the culture is low. There are also clinical laboratory tests that guide the suspicion of sepsis that make up sepsis syndrome.

The PCR test is a proposal for the detection of sepsis-causing microorganisms that are often not isolated in the blood culture by performing the DNA sequence of the most frequently associated pathogens.

This thesis makes a paired study comparing blood cultures of patients with clinical data of sepsis and risk factors to develop it with the polymerase chain reaction test.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis profesores que me han apoyado a lo largo de mi trayectoria en sus diferentes niveles y me han aportado la orientación para la obtención de conocimiento actual.

A mi familia que son el la base de mi fortaleza, me dan el apoyo emocional y los medios para continuar con mi formación

Agradezco a la institución que me permitió acceder a los medios de aprendizaje que son por medio de los pacientes, que además de conocimiento se aprende empatía.

Al servicio de medicina genómica que me han asesorado en la realización de este trabajo y que me brinda las herramientas necesarias para llevarlo a cabo

## INDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
AGRADECIMIENTOS.....	8
MARCO TEÓRICO.....	10
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPOTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	24
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	25
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	25
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIÓN.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS.....	37

## MARCO TEORICO

La sepsis neonatal es una infección sistémica que ocurre en pacientes menores de 28 días de vida y es una importante causa de morbilidad y mortalidad del recién nacido. La sepsis neonatal temprana ha sido definida de forma variable con base a la edad de inicio, con bacteremia o meningitis bacteriana en menos de 72 horas en neonatos hospitalizados contra 7 días en pacientes de término. En recién nacidos pretérmino la sepsis neonatal temprana ocurre en los primeros tres días de vida y es ocasionada por bacterias transmitidas verticalmente de la madre al paciente antes o durante el nacimiento. La sepsis neonatal tardía ocurre después de 72 horas en recién nacidos de UCIN y a los 7 días de vida en pacientes de término. Puede ser ocasionada por patógenos adquiridos vertical u horizontalmente. (1)

La definición de sepsis del consenso pediátrico es SIRS (Respuesta Inflamatoria Sistémica) en presencia de o como un resultado de una infección sospechada o comprobada. SIRS requiere ya sea 1) cuenta anormal de células blancas, incrementadas o disminuidas para la edad o > 10% de neutrófilos inmaduros, ó 2) temperatura anormal (>38.5 GC o <36 GC). (2)

<b>Tabla 1 Variable</b>	<b>Edad: 0-7 días</b>	<b>Edad: 8 a 30 días</b>
<b>Frecuencia cardiaca (latido x minuto)</b>	>180 o <100	>180 o <100
<b>Frecuencia respiratoria (respiraciones x minuto)</b>	>50	>40
<b>Leucocitos (cel/L)</b>	>34 000 o <5 000	>19 500 o <5 000
<b>*Temperatura (°C)</b>	<36 o > 38.5	<36 o >38.5

\*en recién nacidos prematuros ≤ 35 semanas la temperatura mínima para considerarlos febriles es de 38 GC. (3)

### Crterios para establecer sepsis

Infección sospechada o probada: evidencia de infección incluye manifestaciones clínicas, y alteraciones hematológicas: leucocitosis, neutropenia, relación neutrófilos inmaduros/maduros >0.2, proteína C reactiva >10 mg/L, procalcitonina >0.5 ng/L. (3)

La presencia del agente infeccioso puede ser demostrada mediante cultivo, biopsia, reacción en cadena de polimerasa o coagulación. (3)

**Tabla 2. Variables clínicas y de laboratorio usadas para el diagnóstico de sepsis en recién nacidos**

<b>Clínica</b>	<b>Inestabilidad de temperatura</b> <b>Frecuencia cardíaca &gt; 1DS por encima de lo normal para la edad (<math>\geq 180</math> latidos/min, <math>\leq 100</math> latidos/min)</b> <b>Frecuencia respiratoria (&gt;60 respiraciones/min) más quejido o desaturación</b> <b>Letargia o alteración del estado mental</b> <b>Intolerancia a la glucosa (glucosa en sangre &gt; 10mmol/L)</b> <b>Intolerancia alimentaria</b>
<b>Hemodinámica</b>	Presión arterial 2DS por debajo de lo normal para la edad Presión sistólica < 50 mm Hg (recién nacido día 1) Presión sistólica < 65 mm Hg (infantes $\leq 1$ mes)
<b>Perfusión tisular</b>	Llenado capilar > 3 segundos Lactato en plasma > 3 mmol/L
<b>Inflamatoria</b>	Leucocitosis (Leucocitos > 34 000 x 10 <sup>9</sup> /L) Leucopenia (Leucocitos < 5000 x 10 <sup>9</sup> /L) Neutrófilos inmaduros > 10% ** Tasa de neutrófilos inmaduros/totales > 0,2 † Trombocitopenia < 100 000 x 10 <sup>9</sup> /L Proteína C-reactiva (PCR) >10 mg/dL o >2DS por encima del valor normal ‡ Procalcitonina > 8,1 mg/dL o 2DS por encima del valor normal

\*Modificado de Haque KN, 2005 (23); \*\*neutrófilos inmaduros: metamielocitos, mielocitos y abastionados; † neutrófilos inmaduros/totales: (metamielocitos, mielocitos y abastionados)/neutrófilos totales; ‡Notar que las unidades están en mg/dL, no mg/L, se debe hacer la conversión; DS: desviación estándar.

### **Causas de sepsis neonatal**

La sepsis neonatal puede ser resultado de infecciones con bacterias, virus u hongos. Los microorganismos más comúnmente asociado con sepsis neonatal temprana son *Streptococcus agalactiae* (GBS) y *Escherichia coli*. En al menos 400 000 nacimientos de 2006 a 2009 en centros de Estados Unidos, 389 neonatos tuvieron infección neonatal temprana (0.98 casos por 1000 nacimientos) con 43% debido a GBS (0.41 por 1000

nacimientos) y 29% por *E coli* (0.28 por 1000 nacimientos). La mayoría de los niños con infecciones de GBS fueron de término (73%) aunque 81% de aquellos con infecciones por *E coli* fueron pretérmino; las tasas de infección incrementaron con forme al decremento del peso al nacimiento. Las tasas de fatalidad fueron de 16%, pero inversamente proporcional a la edad gestacional: 54% en la semana 22-24, 30% en la semana 25-28, 12% en la semana 29-33 y 3% para más de 37 semanas de gestación. A pesar de que 9% de niños con sepsis por GBS y 33% de niños con sepsis por *E coli* murieron, el riesgo de muerte no fue significativamente más alto para niños con sepsis asociada con infecciones de *E coli* comparados con sepsis asociada a GBS después del ajuste para la edad gestacional. (5)

A pesar de ser menos frecuentes que GBS y *E coli*, *Listeria monocytogenes* (adquirida usualmente trasplacentaria), *Haemophilus influenzae no tipificable* y *enterobacterias* Gram-negativas también han sido implicadas en sepsis neonatal temprana. También especies de *Candida*, las cuales en ocasiones están asociadas con rash eritematosos cutáneo. (5)

La sepsis neonatal tardía puede estar asociada también con GBS y *E coli*, otros aerobios Gram-negativos o infección por *Listeria monocytogenes*. Sin embargo en la unidad de cuidado intensivo neonatal, el estafilococo coagulasa negativo son los patógenos más aislados en neonatos con sepsis neonatal tardía. *Staphylococo aureus* está también asociado a sepsis neonatal tardía, más comúnmente en neonatos con accesos vasculares. (5)

Otros causas infrecuentes de sepsis neonatal tanto temprana como tardía son *Streptococo pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis* y los neonatos en la comunidad, *Streptococo pneumoniae*. Adicionalmente *Neisseria meningitidis*, *Ureaplasma spp* y *Mycoplasma hominis* han sido asociados con sepsis neonatal temprana, meningitis, neumonía, osteomielitis y abscesos cerebrales. La prevalencia de los patógenos varía considerablemente por la herramienta internacional, con una notable prevalencia de organismos Gram-negativos en áreas de escasos recursos. (5)

Las causas virales más comunes de sepsis son virus del Herpes simple (HVS) e infecciones por enterovirus, ambos asociados más frecuentemente con sepsis tardía. Las infecciones de HVS están asociadas con morbilidad y mortalidad substancial. Las manifestaciones de infecciones pueden resultar en presentaciones similares a sepsis y

pueden ser limitadas a piel, ojos y boca, involucrar sistema nervioso central o pueden ser diseminadas involucrando hígado, pulmón, glándulas adrenales con un inicio a los 5-9 días de vida. La infección neonatal por HVS puede resultar de ya sea HVS-1 o HVS-2, con HVS-1 siendo más prevalente con incremento de infecciones genitales debido a HVS-1. (5)

Los neonatos con infecciones por enterovirus pueden desarrollar meningoencefalitis, miocarditis y hepatitis, seguido de pobre alimentación, letargia, fiebre, irritabilidad, hipoperfusión e ictericia. Niños menores de 10 días que estuvieron expuestos a ecovirus, parecovirus y virus coxsackie del grupo B a través de secreciones maternas con incapaces de montar una respuesta inmune substancial por el tiempo reciente de infección materna. Usualmente no se benefician de paso trasplacentario de anticuerpos. (5)

Los hongos, han sido implicados en un número creciente de infecciones sistémicas, usualmente adquiridas durante la hospitalización prolongada de pacientes pretérmino. *Cándida spp* son la tercera causa más común de sepsis tardía en niños de muy bajo peso al nacer (<1500 gramos), con la emergencia de *Candida parapsilosis* como el patógeno mayor en neonatos con acceso venoso central. (5)

Como otras infecciones neonatales, los factores de riesgo incluyen prematuridad, colonización gastrointestinal y cateterismo vascular, sugiriendo que el control de la transmisión en el ambiente hospitalario puede prevenir la colonización e infección. (5)

### **Factores de riesgo**

Los factores neonatales más importantes que predisponen a una infección que puede resultar en sepsis son prematuridad y bajo peso al nacimiento. Los pacientes pretérmino con bajo peso al nacimiento tienen de 3 a 10 veces más incidencia de infección que los pacientes de término con peso normal al nacimiento.

Los pacientes pretérmino requieren en ocasiones accesos intravenoso prolongados, intubación endotraqueal u otros procedimientos invasivos que proveen una puerta de entrada o una falla en la barreras contra microorganismos, dando lugar a un incremento en el riesgo de infecciones adquiridas en el hospital. Además las concentraciones bajas de 25-hidroxitamina D neonatal han sido asociadas con sepsis neonatal temprana. (5)

## Factores maternos

La historia materna provee información importante acerca de la exposición a enfermedades infecciosas, colonización bacteriana, inmunidad (natural o adquirida) y factores de riesgo obstétrico (prematuridad, ruptura prolongada de membranas de 18 horas o más, corioamnioitis e infecciones del tracto urinario). La tasa de ataque de sepsis neonatal incrementa substancialmente en pacientes de bajo peso al nacimiento en presencia de corioamnioitis materna. Los factores que influyen como y si la colonización materna resulta en enfermedad incluyen la prematuridad, enfermedad subyacente, procedimientos invasivos, tamaño del inóculo, virulencia del organismo infectante, predisposición genética, el sistema inmune innato, la respuesta del hospedero y la adquisición trasplacentaria de anticuerpos IgG, no está completamente entendida. La aspiración o ingestión de bacterias en líquido amniótico puede orientar hacia neumonía congénita o infección sistémica, con manifestaciones frecuentemente presentes después del nacimiento (distress fetal y taquicardia), en el nacimiento (apnea, distress respiratorio y choque), o después de un periodo de latencia desde pocas horas a 1-2 días (distress respiratorio, inestabilidad hemodinámica o choque). Adicionalmente la bacteriuria materna de GBS, indicativa de un proceso fuerte de colonización por GBS representa un notable riesgo para adquirir infección neonatal por GBS. (5)

---

### **Tabla 3. Factores de riesgo para el desarrollo de Sepsis Neonatal**

---

#### Sepsis Neonatal Temprana

Colonización materna con estreptococo del grupo B  
Corioamnioitis  
Ruptura prematura de membranas  
Ruptura prolongada de membranas (<18 horas)  
Infección materna del tracto urinario  
Embarazo múltiple  
Nacimiento pretérmino (<37 SDG)

#### Sepsis Neonatal Tardía

Ruptura de las barreras naturales (piel y mucosa)  
Catéter de estancia prolongada  
Procedimientos invasivos (intubación endotraqueal)  
Enterocolitis necrosante  
Uso prolongado de antibióticos  
Uso inhibidor del receptor de bomba de protones.

#### **\*Neonatal**

---

---

Prematuridad: función inmadura del sistema inmune y paso disminuido de inmunoglobulinas maternas y anticuerpos específicos.

---

### **Desarrollo del sistema inmune y riesgo incrementado de los neonatos a Infecciones**

El desarrollo del sistema inmune implica un número de cambios que ocurren durante el primer año de vida. Lo neonatos, especialmente los pretérmino, están relativamente inmunocomprometidos por la inmadurez de sistema inmune así como también el paso disminuido de anticuerpos maternos a través de la placenta. (6)

### **Sistema Inmune Innato**

El sistema inmune innato produce una respuesta inmunológica inmediata y es capaz de hacerlo sin exposición previa a un patógeno específico. El reconocimiento de patógenos ocurre por la identificación de regiones biológicas conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los receptores de reconocimiento tipo TOLL-like, NOD-like y RIG-ike identifican y responden a PAMPs con la producción de citosinas y respuestas proinflamatorias con activación del sistema inmune adaptativo. Estudios que comparan funciones innatas de neonatos y adultos, muestran que las células neonatales tienen una habilidad disminuida para producir citosinas inflamatorias, especialmente el factor de necrosis tumoral y la interleucina 6. En adición, inducen la producción de interleucina 10, la cual es capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias. Las funciones de los neutrófilos y las células dendríticas están disminuidas. Los neutrófilos muestran un poco expresión de moléculas de adhesión así como también respuesta a factores quimiotácticos disminuida. Las células dendríticas también tienen poca capacidad de producir interleucina 12 e interferón gamma. En general la reducción en la producción de citocinas en neonatos también resulta en activación disminuida de las células natural killer. El deterioro del sistema inmune conlleva a un incremento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales en neonatos. (6)

### **El sistema Inmune Adaptativo.**

El sistema inmune adaptativo está diseñado para eliminar patógenos específicos. En recién nacidos el sistema inmune adaptativo incrementa lentamente su función hacia una respuesta de adulto minimizando de otro

modo la inmensa respuesta inflamatoria que podría ocurrir cuando se da la transición de un niño de un ambiente estéril a un colonizado. La función citotóxica disminuida (polarización de células T helper con escasa producción de interferón gamma), falta en la activación de isótopos por inmadurez en general y la memoria escasa (debido a la exposición limitada a patógenos al nacimiento), reducen la capacidad del neonato para responder efectivamente a infecciones. Por ejemplo la reducción de la inmunidad mediada por células incrementa el riesgo de infecciones por patógenos intracelulares como *Listeria*, *Salmonella*, Virus Herpes Simple, citomegalovirus y enterovirus (6)

El paso trasplacentario materno de IgG está inversamente relacionado con la edad gestacional y limita la capacidad funcional de la respuesta del neonato a ciertos patógenos. La cantidad mínima de IgG es transportada a feto in el primer trimestre, mientras de la IgG fetal incrementa en el segundo trimestre de aproximadamente 10% en la semana 17 a 22 de gestación a 50% en la semana 28-32 de gestación. Por lo que el recién nacido pretérmino no cuenta con protección humoral adecuada contra un numero de patógenos de la edad pediátrica, mientras que los niños de término en su mayoría estarán protegidos contra la mayoría de infecciones neonatales prevenibles por vacuna por el paso trasplacentario desde el suero materno. (6)

Estudios histológicos también han demostrado que la zona marginal del bazo no está completamente desarrollada hasta los dos años de edad, incrementando la susceptibilidad del niño a infecciones por bacterias encapsuladas (*Streptococo pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*). Finalmente una disminución en la transferencia de IgA y IgG, citosinas y péptidos antibacterianos presentes en la leche humana pueden comprometer especialmente a niños prematuros. La pobre secreción de IgA disminuye la capacidad del neonato de responder a patógenos ambientales. (6)

### **Complemento**

Los niveles de complemento incrementan con la edad gestacional, pero son solo cerca del 50% de los niveles del adulto en el niño de término. Niveles reducidos del complemento están asociados con opsonización deficiente y pobre eliminación bacteriana. También se ha visto que ambas vías son capaces de ser activadas, puede haber variaciones en sus niveles de activación. En adición la deficiencia profunda de C9 ha sido observada en neonatos reduciendo la capacidad de formar el complejo

bacteriolítico de C5b-9, el cual incrementa el riesgo de adquirir infecciones bacterianas invasivas. (6)

### **Hallazgos de laboratorio y diagnóstico**

El protocolo completo de sepsis en un neonato consiste en obtener cuenta completa de leucocitos con diferencial, hemocultivo, urocultivo y punción lumbar para cuenta celular y cultivo. En adición puede haber un papel para tinción de Gram y cultivo de aspirado traqueal en neonatos intubados por corto tiempo después del nacimiento. Reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva y procalcitonina en conjunto con una escala hematológica han incrementado su uso para asistir al diagnóstico de niños con sospecha de sepsis. La necesidad de una radiografía de tórax es usualmente determinada por la presencia de síntomas respiratorios. Los pacientes con sospecha de sepsis por virus necesitarán marcadores de respuesta inmunológica o estudios virales específicos para determinar la presencia de virus. (7)

### **Cuenta de leucocitos y diferencial.**

Los valores normales de neutrófilos dependen de la edad, con un pico durante las primeras 12 a 14 horas de edad (rango 7800 cel/mm<sup>3</sup> a 14500 cel/mm<sup>3</sup>). Durante 72 a 240 horas el rango de valores va de 2700 cel/mm<sup>3</sup> a 13000 cel/mm<sup>3</sup> en recién nacidos de término. La cuenta total de leucocitos tiene un pobre valor predictivo positivo para sepsis. La neutropenia tiene una más alta especificidad para sepsis neonatal, pero la definición de neutropenia es dependiente de la edad gestacional, método de desarrollo y altitud. La cuenta absoluta de neutrófilos inmaduros tiene un pico a las 12 horas de vida, de un valor máximo de 1100 a 1500 cel/mm<sup>3</sup> a las 12 horas. En contraste una tasa normal máxima de formas inmaduras y cuenta total de leucocitos de 0.16 ocurre al nacimiento y alcanza un nadir de 0.12 con incremento en la edad posnatal. Un valor único de (>0.3) tiene un alto valor predictivo negativo (99%) pero pobre valor predictivo positivo (25%) para sepsis neonatal. Murphy y Weiner encontraron que una combinación de dos tasas normales seriadas de formas inmaduras/leucocitos totales y un hemocultivo negativo en 24 horas en un neonato en sus primeras horas de nacimiento fueron más precisos en descartar sepsis neonatal. Típicamente los neonatos con infecciones virales incluyen VHS, enterovirus tienen una cuenta leucocitaria normal moderada leucopenia. (7)

## **Cuenta de plaquetas**

No es muy sensible o específica para el diagnóstico para el diagnóstico de sepsis neonatal y no es de ayuda en la monitorización de la respuesta al tratamiento.

## **Hemocultivos**

Todos los neonatos con sospecha de sepsis deberían tener una muestra de sangre para cultivo. El volumen sangre necesario para cultivos de neonatos es sustancialmente más pequeño que el que se necesita para adultos por que los neonatos. Como resultado 0.5 ml era tradicionalmente considerado el volumen estándar de sangre adecuado para detectar bacteremia en neonatos. Sin embargo algunos estudios recientes han demostrado que más de un cuarto de los neonatos con sepsis tienen bacteremia con una cuenta baja de colonias (<4 UFC/ml) y dos tercios de los menores de 2 meses tienen cuentas de colonias < 10 UFC/ml. Un volumen de 0.5 ml de sangre ha demostrado ser insuficiente para detectar niños con esta cantidad de bacteremia, mientras que 1 ml duplica la posibilidad de un cultivo positivo. Por esta razón la mayoría de los expertos recomienda que 1 ml de sangre debiera ser el volumen mínimo para ser introducido en un frasco de hemocultivo pediátrico. La sangre es obtenida frecuentemente de vena periférica, pero la muestra obtenida de catéter arterial recién instalado es aceptable. La sangre de vena umbilical tiene más riesgo de ser contaminada sino es obtenida cuidadosamente durante el nacimiento al limpiar cuidadosamente el cordón pinzado. (7)

## **Reactantes de fase aguda**

PCR y procalcitonina son los reactantes de fase aguda más comúnmente estudiados en sepsis neonatal. Los niveles de PCR se elevan dentro de 6-8 horas de infección y el pico en 24 horas. La inflamación dispara el incremento de IL-6, la cual estimula incremento en concentraciones de PCR. Dependiendo del estudio los valores individuales de PCR de 0.2 a 95 mg/litro (media 1.7 mg/litro; mediana de 10 mg/litro) tiene un rango de sensibilidad de 41 a 96% y un rango de especificidad de 72 a 100% para sepsis neonatal. Un valor de 10 mg/litro es la medida más comúnmente utilizado en varios estudios. Las infecciones virales no están comúnmente asociadas con niveles elevados de PCR y si estos llegan a hacerlo es menos de 5 mg/litro. La PCR tiene su mejor valor predictor positivo si es medido dentro de 24 a 48 horas del inicio de infección. Un nivel incrementado de PCR es un mejor predictor que valores individuales. 2

determinaciones normales de PCR (8 a 24 horas después del nacimiento y 24 horas más tarde) han demostrado tener valor predictivo negativo de 99.7% y una razón negativa de 0.15 para comprobar sepsis. Estos valores repetidos de PCR normal son fuerte evidencia contra sepsis bacteriana y pueden hacer garantizar el poder discontinuar los antibióticos. (7)

La procalcitonina es un pro péptido de la calcitonina producida principalmente por los monocitos y hepatocitos que es elevada significativamente durante infecciones en neonatos, niños y adultos. La vida media es de 24 horas en sangre periférica. El valor normal para neonatos >72 horas de vida es usualmente de < 0.1 ng/ml. Mientras la procalcitonina ha sido usada principalmente como herramienta de investigación, está siendo utilizada como una guía en el manejo de infecciones en tiempo real por laboratorios clínicos y generalmente toma cerca de 90 minutos a 2 horas para procesar. En general la procalcitonina es más sensible para la detección temprana de sepsis que la PCR. El nivel de procalcitonina está más comúnmente elevado durante infecciones bacterianas que durante procesos virales y declina rápidamente con tratamiento apropiado. Sin embargo un incremento fisiológico en la producción de procalcitonina ocurre en las primeras 24 horas de vida y los niveles elevados en suero pueden ocurrir bajo condiciones no infecciosas (pacientes con distres respiratorio, inestabilidad hemodinámica, hijos de madre diabética). La procalcitonina también es útil para detectar sepsis neonatal nosocomial. La probabilidad de sepsis nosocomial es duplicada con una procalcitonina > 0.5 ng/ml para paciente con muy bajo peso al nacimiento (<1501 grs) (7)

Cuando un patógeno potencial crece en un hemocultivo, es importante distinguir entre una verdadera infección de una contaminación (error tipo 1). Hasta 62% de recién nacidos de peso extremadamente bajo al nacimiento que sobreviven >12 horas después del nacimiento tienen hemocultivos positivos durante su hospitalización. El estafilococo coagulasa negativo representa más del 50% de las bacterias aisladas de hemocultivos de recién nacidos pretérmino en EUA y muchas partes del mundo. El manejo de un único hemocultivo positivo para estafilococo coagulasa negativo varía ampliamente desde observación cuidadosa a un tratamiento agresivo que puede implicar que los médicos puedan verlo como contaminación. La tasa de hemocultivos falso positivo (de los cuales >67% son debidos a estafilococo coagulasa negativo) es directamente proporcional a la edad del niño y es tan alto como 17% en los niños < 12 semanas de edad. (8)

A pesar de que un cultivo positivo es considerado el “estándar de oro” para la definición de infección, la sepsis clínica con cultivos negativos es considerada una entidad real en todos los grupos. Además un patógeno puede ser identificado en poco más de 36-51% de los casos de sepsis en adultos aunque la sepsis es definida como SIRS en respuesta a una infección incipiente. Una tasa similar de sepsis con cultivos negativos es vista en pacientes pediátricos aun en el estado de choque. En un estudio de recién nacidos con infección documentada en la autopsia, los hemocultivos premortem fueron negativos en 14% de los casos. En otro estudio de 92 neonatos mayores de 34 semanas con cultivos positivos para meningitis bacteriana, 35 (38%) tuvieron hemocultivos negativos. Cuando la sangre y otros sitios estériles de cultivo son negativos, pero el niño manifiesta signos correspondientes a infección, son considerados como sepsis clínica. En neonatos este escenario clínico es más común que la sepsis con cultivo positivo, y representa cerca de 60% de los sujetos incluidos en el reciente estudio internacional de inmunoterapia neonatal, que examinó el tratamiento de la sepsis neonatal con inmunoglobulina. Además los neonatos suelen tener cuentas bajas de colonias bacterianas y cuando un volumen insuficiente de sangre es obtenido para cultivo, el hemocultivo puede ser falso negativo (error tipo II). Finalmente la causa no bacteriana de infección debe ser considerada también. Las infecciones fúngicas y virales también pueden generar respuesta inflamatoria sistémica y sepsis. Existe gran evidencia para patógenos virales asociados con sepsis en nacidos pretérmino (ejemplos: echovirus, enterovirus, parechovirus, coxsackie, adenovirus, parainfluenza, rinovirus, coronavirus) (8)

### **Hemocultivo e identificación molecular del patógeno**

La rapidez es el pivote de importancia para el diagnóstico de sepsis. Por lo tanto, una variedad de técnicas moleculares para la detección de patógenos provee una visión general de técnicas disponibles comercialmente. Sin embargo la mayoría de estas técnicas son aplicadas en el seguimiento inicial de microorganismos con crecimiento en hemocultivos. (9)

Las principales desventajas del análisis de especímenes después de que han crecido en cultivos son el retardo en el tiempo y la potencial contaminación. Además organismos no cultivables no pueden ser identificados por estas técnicas. Sin embargo, el uso de métodos moleculares para identificar patógenos siguiendo el hemocultivo puede

ser más rápido que las técnicas estándar que involucran la identificación fenotípica y susceptibilidad microbiana requiriendo hasta 72 horas después de que el hemocultivo sea positivo.(9)

Los métodos de moleculares para el diagnóstico de sepsis son: Técnicas de hibridación, técnicas de amplificación, técnicas de detección post-amplificación y técnicas No basadas en ácidos nucleicos. (9)

### **Reacción en cadena de polimerasa**

La amplificación de segmentos definidos del ácido nucleico mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) comenzó en la investigación básica, pero su aplicación se ha incorporado en laboratorios de microbiología clínica y de la salud, en los que se han logrado importantes avances para identificar la etiología de los procesos infecciosos. A diferencia del cultivo bacteriológico, la PCR requiere mínimas concentraciones del DNA (pg/ml). (10)

En los últimos años, se han realizado estudios que evalúan una nueva técnica de detección de microorganismos mediante PCR a tiempo real como una herramienta más en el diagnóstico microbiológico de sepsis (reacción en cadena de polimerasa con amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo PCR-RFLP) es una técnica por PCR a tiempo real capaz de detectar 25 microorganismos, siendo éstos los más frecuentemente encontrados en las infecciones sanguíneas. (10)

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha. Finalmente en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio o mediante hibridación con sondas específicas. En general todo este proceso suele durar 24 horas. (11)

### **Uso Juicioso de los antibióticos**

El uso apropiado de antibióticos es importante para salvar vidas y reducir complicaciones. El uso indiscriminado incrementa el riesgo de

microorganismos multi-resistentes y otras complicaciones incluyendo infecciones diseminadas por *Candida* y enterocolitis necrosante. (12)

Ampicilina y gentamicina continúan siendo los antibióticos preferidos para el tratamiento empírico de sepsis neonatal temprana. En algunos centros el surgimiento de *E. coli* resistente a ampicilina ha llevado al incremento en el uso de cefalosporinas de tercera generación como parte del tratamiento empírico, sin embargo los estudios han demostrado una asociación potencial con incremento de la mortalidad y el desarrollo de organismos multi-drogo resistentes asociados. En adición, las cefalosporinas no son activas contra listeria y enterococos. En la sepsis neonatal tardía la cobertura con vancomicina debería ser considerada, especialmente en niños de muy bajo peso hospitalizados con riesgo de infección por estafilococo coagulasa negativo. (12)

Anfotericina y fluconazol continúan siendo los fármacos antifúngicos de elección para el tratamiento de candidiasis neonatal. La experiencia con el uso de caspofungina en neonatos continua en incremento, pero su uso aun no es aprobado en esta población y su poca penetración a sistema nervioso central aun es preocupante.(13)

Duración de la terapia antibiótica en Sepsis Neonatal basada en la presentación clínica. (13)

<b>Tabla 4. Presentación clínica</b>				<b>Duración de la terapia antibiótica</b>
<b>Sepsis neonatal temprana</b>	<b>sin</b>			10 días
<b>meningitis</b>				
<b>Sepsis neonatal tardía</b>	<b>sin</b>			10-14 días
<b>meningitis</b>				
<b>Meningitis: temprana o tardía</b>	<b>sepsis neonatal</b>			14-21 días

## DEFINICION DEL PROBLEMA

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

pueda ser accesible a la población y que se puede obtener en periodos mucho menores que el hemocultivo.

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

## **JUSTIFICACION**

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

## **HIPOTESIS**

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

## **OBETIVO GENERAL**

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

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Implementar la detección de microorganismos asociados a sepsis por PCR tiempo real.

Evaluar el porcentaje de resultados positivos a microorganismo asociados a sepsis por PCR tiempo real vs hemocultivo.

Evaluar el porcentaje de resultados negativos a microorganismo asociados a sepsis por PCR tiempo real vs hemocultivo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Tamaño de la muestra: 7 muestras de sangre venosa de pacientes con sepsis de la Terapia Intensiva Neonatal

Definición de las unidades de observación: Edad, genero, cuenta leucocitaria, niveles proteína C reactiva, muestras positivas y negativas por PCR en tiempo real. Muestras positivas y negativas por hemocultivo.

Definición del grupo de control: Resultados de identificación por hemocultivo.

## **CRITERIOS DE INCLUSION**

Diagnóstico clínico de sepsis por parte del médico.

Muestras de sangre tomadas de sangre venosa, y que consideren muestra para enviar a hemocultivo.

Definición de variables y unidades de medida:

Edad en: días, meses, años

Género:

Cuenta leucocitaria:  $10^3/\text{mm}^3$

Determinación de proteína C reactiva: mg/L

Patógeno identificado: Genero y especie

Muestras positivas en PCR y hemocultivo

Muestras negativas en PCR y hemocultivo

Recursos materiales:

Tubos de colección de sangre.

Gabinete de Bioseguridad nivel II.

Arreglo de sepsis.

Kit de extracción de ADN.

Espectrofotómetro Nanodrop 8000.

Termobloque.

Vortex.

Microcentrifuga.

Termociclador Rotor Gene.

Equipo de cómputo.

## CRITERIOS DE EXCLUSION

Muestras que no cumplan con el cuadro clínico de sepsis

Muestras que no provienen de sangre venosa.

Muestras que no hayan considerado la muestra paralela para la identificación por hemocultivo.

## CRITERIOS DE ELIMINACION

Muestras insuficientes para la extracción del material genético.

Muestras que no se cuente con las variables de observación.

## RESULTADOS

**Tabla 5. (10-HP)**

Cuenta leucocitaria	4.14 x 10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Fiebre 38 GC, intolerancia a la vía oral, apnea
Microorganismo o aislado en hemocultivo	Escherichia coli	Factores de riesgo	Enterocolitis necrosante
Proteína C reactiva	0.31 mg/dL	Reporte de PCR.	Bacillus anthracis (+) Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia pyrocinia, Burkholderia cenocepacia, Burkholderia cepacia (+/-) Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae (+) Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Shigella boydii, Shigella sonnei, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri (+) Propionibacterium acnés (+/-) Pan Aspergillus/Candida

			(+/-) Pan Bacteria 1 (+) Pan Bacteria 3 (+/-)
Días de vida	20 días	Tratamiento o antibiótico	Ampicilina 7 días Amikacina 7 días Cefotaxima 10 días Vancomicina 10 días Meropenem 3 días Tigeciclina 3 días
Género	femenino	Semanas de gestación	33 SDG

**Tabla 6. (11-AJ)**

Cuenta leucocitaria	9.35 x 10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Fiebre 38 GC, apneas, intolerancia a la vía oral
Microorganismo aislado en hemocultivo	Staphylococcus epidermidis	Factores de riesgo	Prematurez
Proteína C reactiva	0.31 mg/dL	Reporte de PCR.	Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia pyrrocinia, Burkholderia cenocepacia, Burkholderia cepacia (+/-) Pan Aspergillus/Candida (+/-) Pan Bacteria 1 (+) Pan Bacteria 3 (+/-)
Días de vida	10 días	Tratamiento o antibiótico	Ampicilina 7 días Amikacina 7 días Cefotaxima 3 días Vancomicina 3 días
Género	Masculino	Semanas de gestación	33 SDG

**Tabla 7. (13-DG)**

Cuenta leucocitaria	23.25 x 10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Fiebre 38 GC, intolerancia a la vía oral, apneas
Microorganismo aislado en hemocultivo	No hubo crecimiento	Factores de riesgo	Prematuro
Proteína C reactiva	8.32 mg/dL	Reporte de PCR.	Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter rhizosphaerae (+/-) Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia pyrrocinia, Burkholderia cenocepacia, Burkholderia cepacia (+/-) Pan Aspergillus/Candida (+/-) Pan Bacteria 1 (+) Pan Bacteria 3 (+/-)
Días de vida	8 días	Tratamiento antibiótico	Ampicilina 8 días Amikacina 5 días Cefotaxima 3 días
Género	Masculino	Semanas de gestación	30 SDG

**Tabla 8. (14-LZ)**

Cuenta leucocitaria	25.35 x 10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Neumonía Fiebre 38 GC
Microorganismo aislado en hemocultivo	No hubo crecimiento	Factores de riesgo	Prematuro
Proteína C reactiva	0.31 mg/dL	Reporte de PCR.	Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia pyrrocinia, Burkholderia

			cenocepacia, Burkholderia cepacia (+/-) Streptococcus pneumoniae, Streptococcus infantis, Streptococcus oralis (+) Pan Aspergillus/Candida (+/-)
Días de vida	15 días	Tratamiento antibiótico	Ampicilina 7 días Amikacina 7 días Cefotaxima 7 días Vancomicina 7 días
Género	masculino	Semanas de gestación	31 SDG

**Tabla 9. (15-CL)**

Cuenta leucocitaria	33.00 x10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Fiebre 38 GC
Microorganismo aislado en hemocultivo	Sin crecimiento	Factores de riesgo	Infección de vías urinarias materna
Proteína reactiva C	1.41 mg/dl	Reporte de PCR.	Pan Bacteria 1 (+)
Días de vida	1 día	Tratamiento antibiótico	Ampicilina 1 día Amikacina 1 día
Género	Masculino	Semanas de gestación	38 SDG

**Tabla 10. (16-ME)**

Cuenta leucocitaria	3.44 x 10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Hipoglucemia, distermias
Microorganismo aislado en	Acinetobacter lwoffii	Factores de riesgo	Peso bajo al nacimiento

hemocultivo			
Proteína reactiva C	0.91 mg/dl	Reporte de PCR.	Acinetobacter baumannii (+/-) Candida krusei (+/-) Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae (+/-) Neisseria meningitidis (+/-) Pan Aspergillus/Candida (+/-) Pan Bacteria 1 (+)
Días de vida	7 días	Tratamiento antibiótico	Amikacina 7 días Ampicilina 7 días
Género	Masculino	Semanas de gestación	38 SDG

**Tabla 11. (18-BPT3)**

Cuenta leucocitaria	19.4 x 10 <sup>3</sup> /uL	Datos clínicos	Distermias, apneas, intolerancia a la vía oral
Microorganismo aislado en hemocultivo	Staphylococcus haemolyticus	Factores de riesgo	Prematurez
Proteína reactiva C	3.47 mg/dl	Reporte de PCR.	Fusobacterium nucleatum (+) Pan Aspergillus/Candida (+) Pan Bacteria 1 (+)
Días de vida	25 días	Tratamiento antibiótico	Ampicilina 7 días Amikacina 7 días Cefotaxima 5 días Vancomicina 5 días
Género	femenino	Semanas de	31 SDG

		gestación	
--	--	-----------	--

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

<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus arlettae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusobacterium varium</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Brevibacterium casei</i>	<i>Leifsonia aquatica</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Methylobacterium</i>	
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>		

<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>zatmanii</i>	<i>sanguinis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Streptomyces bikiniensis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Streptomyces mediolani</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Nocardia farcinica</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Ochrobactrum tritici</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Resistencia Beta-lactamasa</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Aspergillus</i>
		<i>Candida</i>

En la tabla 5 se muestran los resultados de la detección del patógeno por PCR en tiempo real, esta técnica se realizan ciclos exponenciales de amplificación de la secuencia de ADN, para este kit se utilizaron 40 ciclos. Las secuencias que se llegan a detectar antes de un ciclo de amplificación menor a un ct 34, el software las considera positivas o detectables (+), sin embargo las secuencias que amplifican o se detectan a partir del ct 34 al 37 el software arroja un valor indeterminado (+/-) y para estos se tendría que volver a correr la prueba con más material genético para poder saber si es positivo o negativo para este patógeno. En los ct >38 el software nos da un resultado no detectable (-)

TABLA 13 Resultados de detección de patógenos por PCR tiempo real	Muestras						
	10	11	13	14	15	16	18
Species							
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	+/-	-

Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter rhizosphaerae	+/-	-	+/-	-	-	-	-
Aeromonas enteropelogenes, Aeromonas hydrophila, Aeromonas punctata, Aeromonas media	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus anthracis	+	-	-	-	-	-	-
Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia pyrrocinia, Burkholderia cenocepacia, Burkholderia cepacia	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
Candida krusei	-	-	-	-	-	+/-	-
Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae	+	-	-	-	-	+/-	-
Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Shigella boydii, Shigella sonnei, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri	+	-	-	-	-	-	-
Fusobacterium nucleatum	-	-	-	-	-	-	+
Neisseria meningitidis	-	-	-	-	-	+/-	-
Propionibacterium acnes	+/-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus anginosus	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus pneumoniae, Streptococcus infantis, Streptococcus oralis	-	-	-	+	-	-	-
mecA	-	-	-	-	-	-	-
Pan Aspergillus/Candida	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+
Pan Bacteria 1	+	+	+	-	+	+	+
Pan Bacteria 3	+/-	+/-	-	-	-	-	-

La metodología utilizada; una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa posee una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la región de interés, sin embargo este kit solo ha sido utilizado con fines de investigación, este en el sentido ha sido probado en cultivos

bacterianos, pero hasta el momento no ha sido validado o utilizado en muestras de pacientes.

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

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

## **DISCUSIÓN**

Durante el estudio se realizó la prueba de reacción en cadena de polimerasa en 7 muestras de pacientes que fueron hospitalizados en el área de Unidad de Cuidados intensivos Neonatales. Estos pacientes mostraron factores de riesgo para desarrollar sepsis neonatal en sus diferentes presentaciones (sepsis temprana, tardía, choque séptico) y también datos clínicos.

Cabe destacar que tres pacientes no presentaron crecimiento bacteriano en el hemocultivo, sin embargo las cuentas leucocitarias observadas son mayores de  $19\ 500 \times 10^3/\text{ul}$ , valores que son considerados como criterio de sepsis de acuerdo a los días de vida según guías internacionales sobre manejo de sepsis en el recién nacido de Critical Care.

La cifra de Proteína C reactiva de uno de estos pacientes sin aislamiento bacteriano se encuentra en límite alto para el criterio de sepsis además de tener datos clínicos y factores de riesgo.

La literatura describe que existen situaciones donde el paciente muestra clínica sugestiva de sepsis sin aislamiento en cultivos, iniciando terapia

antimicrobiana orientada hacia patógenos más frecuente en la etapa neonatal. Estos antibióticos pueden alterar resultado de la reacción en cadena de polimerasa. Los resultados indeterminados que muestran los pacientes pueden deberse a las múltiples terapias antimicrobianas al momento de la toma. Así como también se ha visto que el volumen del hemocultivo también influye en resultados tanto descripción fenotípica como genética.

Durante el estudio de tomaron volumen de 1 ml como mínimo para mejorar la sensibilidad de la prueba. El volumen de sangre es una limitante importante debido a que los pacientes del estudio presentan peso bajo y la toma de 1 ml representa para muchos de ellos una pérdida significativa en su volemia.

Los estándares internacionales marcan que 1 ml es suficiente para garantizar el desarrollo de un microorganismo en sangre aproximadamente 40 a 50% de los casos.

Existe correlación entre el reporte de hemocultivo con la especie de *Acinetobacter ixfiij* reacción en cadena de polimerasa con especies de *Acinetobacter*, siendo positivos.

El estudio de PCR demuestra crecimiento de una especie de *S. pneumoniae* en un paciente con Neumonía y datos de respuesta inflamatoria sistémica ( fiebre 38 GC) a pesar de que el resultado de hemocultivo no presenta crecimiento bacteriano.

Entre los criterios diagnósticos de sepsis tenemos la cuantificación de proteína C reactiva mayor de 10 mg/dl. Tenemos en el resultado de los pacientes que la cuantificación de proteína C reactiva no se rebasa 10 mg/dl por lo que no cumpliría criterio para sepsis neonatal, sin embargo los factores de riesgo tanto maternos (infecciones y ruptura de membranas) como del paciente (prematurez) y la clínica presente al momento del estudio orientan a cuadro infeccioso compatible con el resultado que arroja la reacción en cadena de polimerasa.

La reacción en cadena de polimerasa demuestra la presencia de un patógeno en un paciente clínicamente enfermo con factores de riesgo para sepsis pese a un hemocultivo sin crecimiento y esto a futuro puede generar mejorías en cuanto a terapia antimicrobiana al iniciar la terapia específica hacia el microorganismo causante y evitando así el desarrollo de cepas resistentes que son frecuentes en el ámbito hospitalario. Esto

lleva a mejoría clínica y periodos cortos de estancia hospitalaria y por lo tanto a la disminución de costos por la institución.

## **CONCLUSIONES**

El presente trabajo tuvo la finalidad de sentar las bases para el uso de PCR como auxiliar diagnóstico en sepsis neonatal temprana, de igual forma se llevó a cabo en las distintas unidades de terapia intensivas de este Hospital. Si bien la literatura lo marca como un estudio rápido y con mayor especificidad en la detección del patógeno causante de enfermedad, también es de utilidad para guiar el tratamiento antibiótico para que vaya dirigido contra el microorganismo detectado y así evitar abuso en el uso de antibióticos y disminuir el surgimiento de cepas multirresistentes.

Entre las situaciones que causaron conflicto en la realización del estudio es el no contar con una unidad que proporcione la temperatura adecuada para la conservación de la muestra así como tampoco contar con laboratorio de biología molecular 24 horas al día ya que las muestras para pacientes con sospecha de sepsis pueden llegar a tomarse en diferentes horas del día y en diferentes fechas.

Si bien es cierto que un porcentaje aproximado del 40 a 50% de los hemocultivos solo presentara crecimiento de microorganismos, se puede presentar clínica de sepsis y por lo tanto nos obliga iniciar el tratamiento empírico contra patógenos más comunes de la etapa neonatal, para lo cual este estudio de PCR en tiempo real podría ayudarnos a extender las posibilidades diagnósticas en especial en pacientes que pese al tratamiento llevan una evolución tórpida.

Aún falta por establecer bien la ruta diagnóstica en donde pueda entrar la prueba de reacción en cadena de polimerasa, por ser un estudio de biología molecular representa un gasto mayor que las pruebas convencionales que tenemos en el hospital. Esta prueba nos permite llegar al diagnóstico etiológico del paciente, aunque no debe olvidarse clínica del padecimiento. Como se dijo en un principio, esta prueba se convierte en un auxiliar diagnóstico.

Se espera que con la realización de protocolos de investigación pueda documentarse su eficacia y así entrar en el catálogo de laboratorios de la institución para estar disponible cuando sea necesario.

## BIBLIOGRAFIA

1. Simonsen K, Anderson A. Early-Onset Neonatal Sepsis. *CMR*.2014; 27 (1): 21-47
2. Wynn J, Wong H. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2014; 15 (6): 523-528
3. Normas y Procedimientos de Neonatología. Instituto Nacional de Perinatología. 2015. 214-216.
4. Zea A, Turin C. Unificando los criterios de sepsis neonatal tardía: propuesta de un algoritmo de vigilancia diagnóstica. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014. 31 (2): 358-363
5. A, Sánchez P. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017;390: 1770-80
6. Camacho A, Spearman P. Neonatal Infectious Diseases: Evaluation of Sepsis. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60 (2): 367-389.
7. Bhandari V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *JPIDS*. 2014; 3 (3): 234-245
8. Hernández S, Álvarez C. Hemocultivos en urgencias pediátricas. Guía práctica de recomendaciones: indicaciones, técnica de extracción, procesamiento e interpretación. *An Pediatr*. 2016; 84 (5): 294.e1-294.e9.
9. Liesenfeld O, Lehman L. Molecular diagnosis of Sepsis: New aspects and recent developments. *EuJMI*.2014; 4 (1): 1-25
10. López D, Castellanos A. Eficacia de PCR-RFLP contra hemocultivo para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana. *Revista Médica MD*. 2017; 8 (4): 131-139
11. Costa J, Reacción en cadena de polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin* 2004; 22 (5): 299-305.
12. Du Pont G, Joyal J. Management of neonatal sepsis in term newborns. *PMCID*. 2014; 6 (67)
13. Obiero C, Seale A. Empiric treatment of Neonatal Sepsis in Developing Countries. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2015; 34 (6): 659-661

**ANEXOS**

**CEDULA DE RECOLECCIÓN DE DATOS:**

---

**NOMBRE DEL PACIENTE**

**GENERO**

**EDAD**

**SEMANAS DE GESTACIÓN**

**CUENTA DE LEUCOCITOS**

**DATOS CLÍNICOS**

**FACTORES DE RIESGO:**  
**Maternos/del recién nacido**

**AISLAMIENTO EN EL**  
**HEMOCULTIVO**  
**PCR**

**TRATAMIENTO(S)**  
**ANTIBIOTICO(S)**

---