



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA No. 4
"LUIS CASTELAZO AYALA"

**COMPARACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN RECIÉN
NACIDO CLÍNICAMENTE SANO Y CON SEPSIS NEONATAL
(Estandarización)
R-2021-3606-035**

TESIS

Que para obtener por el diploma de especialidad de:
Neonatología

Presenta:

Dr. Luis Fernando Bolaños Aparicio

Tutor:

M. en C. Dr. Leovigildo Mateos Sánchez



Ciudad de México

Graduación Febrero 2022



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.

COLABORADORES

M. en C. Pedro Antonio Reyes Castillo

Dr. en BM. Arturo Aguilar Rojas

Dra. en C. Dra. Eunice López Muñoz

Dr. Lino Mayorga Reyes

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA No. 4 “LUIS CASTELAZO AYALA”**

CARTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.

Por medio de la presente informo que el Dr. Luis Fernando Bolaños Aparicio, residente de la especialidad de Neonatología ha concluido la escritura de su tesis: ***Comparación de la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal (Estandarización)***, con número de folio R-2021-3606-035, por lo que otorgamos autorización para su presentación y defensa de la misma.

Dr. Oscar Moreno Álvarez

Director General

Unidad Médica de Alta Especialidad,
Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Juan Carlos Martínez Chequer

Director de Educación e Investigación en Salud

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Sebastián Carranza Lira

Jefe de la División de Investigación en Salud

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”
Instituto Mexicano del Seguro Social.

M. en C. Dr. Leovigildo Mateos Sánchez

Tutor de tesis

Jefe de Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”
Instituto Mexicano del Seguro Social.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, quienes con su amor, apoyo y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy una meta más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de perseverancia y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A Anyel Dayana quien ilumina mi vida, que con su apoyo, a través de sus consejos, de su amor, y paciencia, me ayudó a concluir esta meta.

Finalmente quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi tutor el Maestro Leovigildo Mateos Sánchez por su entrega, orientación y apoyo, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

Colaboradores.....	2
Carta de aceptación del trabajo de tesis.	3
Agradecimientos.....	4
Índice.....	5
Resumen	6
Abstract	7
Abreviaturas	8
Marco teórico.....	9
Justificación.....	15
Planteamiento del problema.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos	18
Material y métodos	19
Variables de estudio.....	21
Muestra	27
Análisis estadístico.....	28
Factibilidad y aspectos éticos.....	29
Resultados	31
Discusión.....	55
Conclusiones.....	59
Referencias	60
Anexos	65
Declaración de autenticidad y no plagio.....	72

RESUMEN

ANTECEDENTES: La microbiota intestinal es el conjunto de bacterias que habitan en el intestino. El desequilibrio de la misma afecta el pronóstico de sepsis neonatal.

OBJETIVO: Comparar la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal.

MATERIAL Y MÉTODOS: Fase de estandarización de un estudio observacional y comparativo que incluyó recién nacidos con sepsis neonatal y clínicamente sanos. Se tomó muestra de materia fecal para extraer ADN genómico bacteriano y se caracterizó la microbiota intestinal usando métodos de cultivo y con la técnica de PCR.

RESULTADOS: Se identificaron 94 recién nacidos, clasificándolos con presencia o ausencia de sepsis, siendo 86 con sepsis (91%) y 8 clínicamente sanos (9%). En edad gestacional, el grupo 1 mostró una mediana de 31 SDG (25-34), grupo 2 de 34.5 SDG (33-35), $p = 0.0001$. El peso al nacer del grupo con sepsis tuvo una mediana de 1172.5 gramos (620-2015), los sanos con 2055 gramos (1690-2055), con una $p = 0.001$. Sexo masculino predominó en el grupo de sepsis (51.2%), la p no mostró significancia estadística. Hasta este momento se han procesado 8 muestras de pacientes sanos. Se realizó extracción y amplificación del ADN genómico, con técnica de PCR con primer específico para la *phyla* Firmicutes. Se llevó a cabo una reacción de PCR del ADN extraído a partir de las heces. Como amplificadores se emplearon los primers Lac1 y Lac2 que amplifican la región V4-V5 del gen 16S. Los *phylum* de la microbiota encontrados en recién nacidos sanos fueron Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria y Acidobacteriota.

CONCLUSIONES: La identificación en las dificultades para la recolección de la materia fecal y su transporte, nos ayudó a estandarizar la técnica de cada uno de los pasos implicados, lo cual es de suma importancia para obtener muestras suficientes de adecuada calidad para un proceso confiable. Hasta el momento, la microbiota intestinal de los recién nacidos clínicamente sanos fue semejante a lo reportado en la literatura.

PALABRAS CLAVE: Microbiota intestinal, sepsis neonatal, Score de Rodwell, respuesta inflamatoria sistémica

ABSTRACT

BACKGROUND: Gut microbiota is a bacterium set that lives in the bowel. The imbalance in this bacterium set affects the neonatal sepsis prognosis.

OBJECTIVES: To compare the gut microbiota in healthy new born and the one with neonatal sepsis.

MATERIAL AND METHODS: Standardization phase of an observational and comparative study that included clinically healthy newborns with neonatal sepsis. A stool sample was collected to extract bacterial genomic bacteria DNA, and the gut microbiota was characterized using culture methods and the PCR technique.

RESULTS: We identified 94 newborns, classifying them with and with out sepsis, being 86 with sepsis (91%) and 8 clinically healthy (9%). In gestational age, group 1 showed a median of 31 weeks (25-34), group 2 was 34.5 weeks (33-35), $p = 0.0001$. Birth weight in sepsis group had a median of 1172.5 grams (620-2015), and 2055 grams in healthies (1690-2055), with $p = 0.001$. Male sex prevailed in the sepsis group (51.2%), with p not statistical significance. Eighth samples from healthy patients have been processed. Extraction and amplification of genomic DNA was performed, using a PCR technique with a specific primer for the Firmicutes *phyla*. A PCR reaction of the DNA extracted from the feces was carried out. Primers Lac1 and Lac2 that amplify the V4-V5 region of the 16S gene were used as amplifiers. The *phylum* of the microbiota found in healthy newborns were Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria and Acidobacteriota.

CONCLUSIONS: Identification of the difficulties for the collection of stool and its transport helped us to standardize the technique of each of the steps involved, which is of the utmost importance to obtain sufficient samples of adequate quality for a reliable process. Today, gut microbiota found in healthy newborns is similar to that reported in the literature.

KEY WORDS: Gut microbiota, neonatal sepsis, Rodwell score, systemic inflammatory response.

ABREVIATURAS

Mbi	Microbiota intestinal
PMN	Polimorfonucleares
I/T	Relación inmaduros/totales
I/M	Relación inmaduros/Maduros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés
UCIN	Unidad de cuidados intensivos neonatales
UTQ	Unidad toco quirúrgica
CMN	Centro médico nacional
SXXI	Siglo XXI
UMAE	Unidad médica de alta especialidad
UTIN	Unidad de terapia intermedia neonatal
RIS	Respuesta inflamatoria sistémica
UFC	Unidad formadora de colonias
SDG	Semanas de gestación
CPAP	Presión positiva continua en la vía aérea por sus siglas en inglés
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido

MARCO TEÓRICO

La microbiota intestinal (Mbi) es el conjunto de bacterias que habitan en el intestino y se compone de aproximadamente 10^{14} bacterias, es decir, 10 veces más que el número de células en el cuerpo humano. La microbiota intestinal contiene 3.3 millones de genes microbianos no repetidos y se encarga de realizar funciones metabólicas, estructurales y de protección, lo que contribuyen al estado fisiológico, inmunitario y nutricional del hospedero, por lo que se le ha llegado a considerar como “un órgano” adicional^{1,2,3,4,5}.

El inicio de la colonización ocurre durante el nacimiento donde predominan las *Bifidobacterium* pertenecientes al *phylum Actinobacteria*, situación que es estable hasta los 2-3 años^{6,7}. A partir de la introducción de alimentos sólidos empieza el cambio en la composición bacteriana, lo que determinará el tipo de microbiota de adulto⁸. La microbiota intestinal en adultos se compone principalmente en un 90% de dos *phyla Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que el 10% restante lo ocupan otros *phyla*, como *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* y *Actinobacteria*⁹. Las proporciones de la Mbi varían de acuerdo a la edad, ubicación geográfica, dieta, genética y salud del hospedero^{3,10}. Si bien, la microbiota intestinal en la etapa adulta se caracteriza por ser estable, esta es determinada en la infancia, ya que la composición de la microbiota intestinal de los neonatos sufre cambios dinámicos en composición, abundancia y diversidad, lo que puede producir efectos significativos en la salud de por vida^{11,12,13}. Al nacer, la población microbiana infantil se asemeja a la de la vagina materna o la microbiota cutánea dependiendo del modo de parto, es decir, por parto vaginal o cesárea, respectivamente¹⁴. Con base en la evidencia científica se ha observado que los neonatos nacidos por vía vaginal tienen una mayor abundancia de especies de *Bifidobacterium* y una abundancia reducida de *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, en comparación con la microbiota intestinal de recién nacidos por cesárea quienes mostraron una abundancia de bacterias comensales de la piel y orales, como *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y especies de *Propionibacterium*^{15,16}. Además, se ha observado

que en los neonatos nacidos por cesárea presentan una colonización tardía, retrasando así, el desarrollo del sistema inmunológico, la maduración del epitelio intestinal y la capa de mucina. Esto tiene como consecuencia una menor diversidad de la microbiota total durante los primeros dos años de vida, lo que aumenta el riesgo de enfermedades inflamatorias en el futuro, como el asma y las alergias alimentarias^{15,16}. Otro factor importante, que influye en la dinámica de la microbiota neonatal es la alimentación (lactancia materna o fórmula). Se sabe que la leche materna contiene proteínas, nutrientes, inmunoglobulinas A y G, oligosacáridos y bacterias; que en conjunto promueven el crecimiento y desarrollo de los recién nacidos¹⁷; así la Mbi de los lactantes amamantados cuenta con niveles altos de especies de *Bifidobacterium* y otras bacterias que son capaces de metabolizar los oligosacáridos provenientes de la leche materna¹⁸. Además, los lactantes amamantados reciben el 27% de su microbiota intestinal a partir de la leche materna y un 10% adicional de la piel areolar durante el primer año de vida^{17,18}. Finalmente, la introducción de alimentos sólidos se asocia con una mayor carga y diversidad bacteriana, una mayor abundancia de ácidos grasos de cadena corta y un cambio en la dominancia de las bacterias que pertenecen a los fermentadores de fibras *Bacteroides* y *Firmicutes*¹⁹.

La composición de la Mbi, es importante dentro del hospedero, ya que mantiene una relación simbiótica con la mucosa intestinal y cumple con importantes funciones metabólicas, estructurales y de protección. Las funciones metabólicas incluyen la producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de vitamina K, síntesis de amino ácidos, producción de ácidos grasos de cadena corta a través de la fermentación de fibras no digeribles y biotransformación de ácidos biliares. Las funciones estructurales de la microbiota son formar parte de una capa de moco que impide la colonización de microorganismos patógenos e intervenir en la regulación y diferenciación celular, así como, en el desarrollo de criptas y vellosidades intestinales. Por último, las funciones de protección contribuyen a la activación del sistema inmune innato y adaptativo, resistencia a la colonización y regulación de citosinas inflamatorias². Cada una de estas funciones

se relaciona entre sí y puede contribuir a largo plazo en la salud o enfermedad de un individuo²⁰.

La microbiota intestinal que coloniza el intestino de los neonatos es responsable del funcionamiento inmunológico y del desarrollo estructural del intestino; además de proporcionar nutrientes al hospedero, metabolizar compuestos no digeribles provenientes de la leche materna y defenderse contra la colonización por patógenos oportunistas²¹. Para la mayoría de los recién nacidos clínicamente sanos, esta colonización es un proceso rutinario, que ocurre sin ningún esfuerzo, por lo que las bacterias que logran colonizar el intestino se consideran como "microbiota normal"²². Sin embargo, para los recién nacidos con sepsis o que requieren hospitalización durante períodos prolongados, la colonización del intestino con patógenos potenciales puede provocar infecciones posteriores. Para estos pacientes el sistema inmunológico y la barrera intestinal es vulnerable con niveles bajos de mucosa protectora y motilidad disminuida. Esto hace que el intestino neonatal sea especialmente propenso a la colonización con bacilos gram negativos²³.

La sepsis es una afección grave en el período neonatal, siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los recién nacidos; la incidencia varía entre el 2% para la sepsis vertical (transmitida por la madre) y el 20% para la sepsis nosocomial (adquirida en el hospital)²⁴.

Los recién nacidos con sepsis bacteriana pueden presentar signos y síntomas inespecíficos o signos focales de infección. A veces, especialmente en los bebés prematuros, la sepsis vertical puede ser inicialmente asintomática y el diagnóstico puede basarse en la presencia de factores de riesgo²⁵.

La sintomatología inicial suele ser inespecífica, sutil y difícil de definir, los neonatos con sepsis pueden presentar uno o más de los siguientes síntomas inespecíficos: alteración de la regulación térmica, hipotermia o fiebre; letargia, llanto débil o succión débil; hipoperfusión o llenado capilar prolongado; hipotonía o ausencia de reflejos neonatales; taquicardia o bradicardia; dificultad respiratoria o apnea; mal estado general; hipoglucemia o hiperglucemia; y acidosis metabólica²⁵.

Los síntomas clínicos de la sepsis están relacionados con las características del patógeno y la respuesta del organismo a la invasión²⁶.

Para el diagnóstico de sepsis neonatal se deben tomar en cuenta los días de vida del recién nacido, para diferenciar entre la de inicio temprano de la de inicio tardío al momento de realizar las pruebas diagnósticas complementarias. Al presente, para plantear el diagnóstico de sepsis neonatal ya no se realizan todas las pruebas que se consideraban obligatorias. En décadas pasadas se consideraba obligatorio realizar biometría hemática, hemocultivo, urocultivo (obtenido por punción supra púbrica) y punción lumbar, como un conjunto de pruebas para descartar la sepsis²⁶.

El diagnóstico etiológico se basa en el aislamiento de un microorganismo en el hemocultivo. Los estafilococos coagulasa negativos y bacterias gram negativas son los patógenos identificados con mayor frecuencia. Sin embargo, el hemocultivo frecuentemente proporciona resultados negativos debido a bacteriemia de bajo grado, pequeños volúmenes de inoculación y/o antibióticos suministrados a la madre durante el trabajo de parto²⁷. Por lo tanto, la sepsis neonatal se clasifica según el momento de aparición como temprana (dentro de los 3 días posteriores al nacimiento) o tardía (después del tercer día del nacimiento)²⁸.

Rodwell y colaboradores evaluaron los resultados del recuento sanguíneo como una prueba de detección para la sepsis neonatal temprana y desarrollaron una escala. En su estudio incluyeron 298 niños, en los que se observó que el 96% de los pacientes con sepsis y con sospecha de sepsis tenían una puntuación total de 3 o más. La probabilidad de sepsis con una puntuación mayor o igual a 3 fue del 31%; sin embargo, el valor se modifica según la edad gestacional. Cuanto mayor es la puntuación, mayor es la probabilidad de sepsis, es decir, cuando la puntuación es menor o igual a 2, existe un 99% de probabilidad de que el paciente no tenga sepsis. Rodwell y colaboradores concluyeron que la puntuación está diseñada para mejorar la precisión diagnóstica de los bioensayos sanguíneos

como herramienta de diagnóstico de sepsis, lo cual puede simplificar el uso de esta prueba²⁹.

Crterios de laboratorio Score de Rodwell		
Parámetro	Resultado	Puntaje
Conteo total de leucocitos	Menos de 5000 o más de 25 000 al nacimiento	2
	Más de 30 000 en las primeras 12 a 24 horas de vida	1
	Más de 21 000 de las 48 horas en adelante	1
Conteo total de PMN	No se observan PMN maduros	1
	Aumentados/ Disminuidos	1
Conteo de PMN inmaduros	Aumentada	1
Relación I/T de PMN	Aumentada	1
Relación I/M de PMN	Mayor o igual a 0.3	1
Cambios degenerativos en los PMN	Vacuolización tóxica, cuerpos de Dohle en los PMN	1
Conteo de plaquetas	Menor a 150 000	1

Se ha demostrado que existe una relación bidireccional entre el estado de sepsis y la microbiota intestinal, aunque no se ha logrado comprender en su totalidad. En primera instancia, se conoce que una microbiota intestinal diversa y equilibrada es capaz de mejorar la inmunidad del hospedero frente a patógenos tanto entéricos como sistémicos y que la alteración de este equilibrio conduce potencialmente a una mayor susceptibilidad a la sepsis²⁹. Por otro lado, otros estudios han demostrado que la composición de la microbiota intestinal se ve gravemente afectada por la sepsis y su tratamiento, pero es necesario investigar más a fondo las consecuencias clínicas de estas alteraciones³⁰.

En un proceso séptico ocurre una disbiosis bacteriana, en donde la microbiota intestinal es caracterizada por una escasa abundancia de géneros bacterianos benéficos como *Faecalibacterium*, *Blautia* y *Ruminococcus*, o en ocasiones, se encuentra en mayor proporción un solo género³¹. Por otro lado, la sepsis de aparición temprana es causada predominantemente por *Streptococcus*

agalactiae de madres con infecciones por dicho microorganismo. La sepsis de aparición tardía es causada comúnmente por bacterias adquiridas durante el proceso de parto o del medio ambiente, como *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Es importante destacar que *Escherichia coli* es el principal causante de la sepsis tardía, ya que es una bacteria oportunista intestinal³².

Por lo tanto, la disbiosis de la microbiota neonatal puede afectar el pronóstico de sepsis en neonatos. Estudiar estos cambios puede proporcionar una nueva y eficaz dirección de tratamiento, ya que la microbiota intestinal contribuye en la función de barrera intestinal y la modulación del sistema inmunológico³³. Actualmente, la microbiota neonatal es un área de interés emergente debido a la relativa simplicidad en su inicio al nacer y su desarrollo posterior, que puede influir potencialmente en la salud del hospedero. Se conoce que cambios drásticos en la microbiota intestinal aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias, intestinales y metabólicas durante toda la vida, por lo que es necesario conocer la microbiota intestinal en la infancia. Identificar el impacto de las exposiciones bacterianas en la vida infantil es fundamental para promover la salud. La posible traducción al entorno clínico podría incluir: informar la toma de decisiones sobre el parto del recién nacido a favor de los partos vaginales, reforzar e iluminar aún más la fisiología detrás de los beneficios para la salud de por vida de la exposición a la leche materna en la infancia, limitar o alterar los regímenes de antibióticos para enfermedades infecciosas comunes, el uso dirigido de probióticos específicos para tratar y prevenir enfermedades y, en última instancia, la individualización de los regímenes de medicación para niños pequeños en función de los perfiles microbianos³⁴.

JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones sobre el papel de microbiota que residen en el intestino humano han atraído mucha atención debido al papel que tiene la microbiota intestinal con el desarrollo de enfermedades como la obesidad, diabetes, síndrome metabólico, enfermedades hepáticas, el cáncer e incluso las enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, se ha encontrado relación entre la sepsis neonatal y la microbiota intestinal, mediante una disbiosis bacteriana que ocurre en el intestino del recién nacido, disminuyendo géneros bacterianos benéficos como *Faecalibacterium*, *Blautia* y *Ruminococcus*, quienes cumplen una función en la barrera intestinal y la modulación del sistema inmunológico. Con base en ello, inicialmente es importante conocer y describir la microbiota intestinal de neonatos con sepsis y clínicamente sanos, ya que la diferencia bacteriana entre estas dos poblaciones puede tener un impacto en la salud del recién nacido a corto y largo plazo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El establecimiento de las diferentes poblaciones bacterianas dependerá del estado de salud de la madre, el tratamiento antibiótico, el tipo de nacimiento, la edad gestacional y el tipo de alimentación. Las condiciones que causan la alteración del equilibrio microbiano en el período neonatal podrían expandir su influencia negativa en períodos posteriores de la vida. En un estado de sepsis, la microbiota intestinal de los neonatos está alterada, teniendo influencia en un bajo desarrollo del sistema inmunológico y el metabolismo del hospedero. Disminuyendo así la capacidad para resistir la colonización contra patógenos oportunistas. Esta función de la microbiota intestinal es muy importante en la vida temprana, debido a que la infección es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad entre los recién nacidos.

Con base en esto surgió la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación

¿Qué diferencias presenta la microbiota intestinal entre el recién nacido clínicamente sano y con sepsis?

HIPÓTESIS

Existen diferencias en la cantidad y tipo de microbiota intestinal entre recién nacidos clínicamente sanos y con sepsis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la microbiota intestinal en el recién nacido clínicamente sano y con sepsis.

Objetivos particulares

- Describir los datos clínicos de los neonatos con sepsis y clínicamente sanos
- Extraer el ADN genómico bacteriano de la materia fecal
- Identificar la microbiota intestinal en los recién nacidos estudiados
- Cuantificar la microbiota intestinal en los pacientes
- Comparar los datos de la microbiota intestinal en neonatos clínicamente sanos y con sepsis

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio deriva del proyecto titulado *“Aislamiento y caracterización de bacterias con potencial probiótico a partir de materia fecal de neonatos clínicamente sanos”*, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Lugar de realización:

- La fase de estandarización del estudio se realizó en la UCIN, UTIN, prematuros, cuneros y alojamiento conjunto de la UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, del Instituto Mexicano del Seguro Social, que es un Hospital de tercer nivel de atención donde se reciben pacientes derechohabientes provenientes de los hospitales generales de la zona sur de la Ciudad de México.

Diseño del estudio:

Fase de estandarización de un estudio observacional y comparativo.

Criterios de selección de la muestra:

Casos

I. Criterios de inclusión:

- a. Recién nacidos obtenidos por vía vaginal, con diagnóstico de sepsis neonatal, con datos de respuesta inflamatoria sistémica (RIS) y al menos tres criterios de complicación clínica como son: alteraciones en la curva térmica (hipotermia o hipertermia); síntomas respiratorios (dificultad respiratoria o apnea); síntomas cardiovasculares: hipotensión (presión arterial < percentil 5 para la edad), taquicardia, bradicardia o mala perfusión; síntomas neurológicos: convulsiones clínicas o eléctricas, hipotonía o letargo; síntomas gastrointestinales: vómitos, intolerancia a la vía oral, y la identificación de un patógeno bacteriano de un sitio estéril, mediante cultivo.

II. Criterios de exclusión

- a. Cesárea como vía de nacimiento

III. Criterios de eliminación

- a. Cuando el padre o tutor no autorizó mediante consentimiento informado la participación y toma de muestra.

Control

I. Criterios de inclusión:

- a. Recién nacidos obtenidos por vía vaginal, que se encontraron clínicamente sanos.

II. Criterios de exclusión

- a. Neonatos nacidos por cesárea.

III. Criterios de eliminación

- a. Cuando el padre o tutor no autorizó mediante consentimiento informado la participación y toma de muestra.

VARIABLES DE ESTUDIO

Definición de las variables y escalas de medición utilizadas en el estudio				
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición
Sepsis neonatal	Infección neonatal sistémica mediante datos de respuesta inflamatoria sistémica y/o hemocultivo positivo.	Presencia de infección neonatal sistémica: <i>a) Temprana:</i> diagnóstico de infección neonatal en las primeras 72 horas de vida mediante datos de respuesta inflamatoria sistémica (clínicos y laboratoriales) y/o hemocultivo positivo. <i>b) Tardía:</i> diagnóstico de infección neonatal posterior a las 72 horas de vida mediante datos de respuesta inflamatoria sistémica (clínicos y laboratoriales) y/o hemocultivo positivo.	Cualitativa nominal	No = 0 Si = 1
Microbiota intestinal	Conjunto de bacterias que habitan en el intestino realizando funciones metabólicas, estructurales y de protección, que contribuyen al estado fisiológico, inmunitario y nutricional del huésped.	Caracterización del conjunto de bacterias que habitan en el intestino neonatal mediante cultivo y extracción de ADN bacteriano. Se identifica la composición y proporción de cada familia para determinar la microbiota intestinal en recién nacidos clínicamente sanos y con sepsis neonatal.	Cuantitativa continua	UFC/mL

Definición de las variables y escalas de medición utilizadas en el estudio (continuación)					
Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición	de
Edad materna	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de la madre hasta el momento del embarazo.	Cuantitativa continua	Años cumplidos	
Escolaridad	Nivel máximo de estudios cursados y aprobados en alguna institución educativa	Nivel máximo de estudios cursados y aprobados en alguna institución educativa por la madre al momento del estudio.	Cualitativa	Analfabeta Primaria Secundaria Preparatoria Licenciatura Posgrado	
Estado civil	Situación civil del cuidador, al momento de realizar la encuesta	Situación civil de la madre al momento del estudio	Cualitativa	Soltera Unión libre Casada Viuda Separada	
Edad gestacional al nacimiento	Edad del feto desde el primer día de la última menstruación, establecida en semanas	Semanas transcurridas desde la fecha de última menstruación hasta el nacimiento.	Cuantitativa	Semanas (SDG)	
Consulta prenatal	Atención médica durante el embarazo	Número de consultas recibidas durante el embarazo	Cuantitativa	1-100	
Esteroides antenatales	Administración de dos dosis de Betametasona a la madre de forma prenatal	Administración de dos dosis de Betametasona a la madre de forma prenatal por lo menos 24 horas previas al nacimiento o hasta 30 días previos al nacimiento	Cualitativa	No = 0 Si = 1	
Edad cronológica al momento de la evaluación	Tiempo transcurrido en días de un recién nacido hasta el momento de la evaluación	Tiempo transcurrido calculado en días de un neonato desde que nace hasta el momento en el que se realizó el estudio	Cuantitativa	Días	
Vía de resolución del embarazo	Vía de nacimiento del producto	Vía de resolución del embarazo	Cualitativa	Inespecífico = 0 Vaginal = 1 Abdominal = 2	
Peso al nacer	Medida de registro que hace referencia a la masa que ocupa un cuerpo sobre el cual se ejerce una fuerza gravitacional, en el recién nacido, se registra en kilogramos y gramos	Peso en gramos obtenido al nacimiento. Se pesará al recién nacido en una báscula electrónica calibrada	Cuantitativa	Gramos	

Definición de las variables y escalas de medición utilizadas en el estudio (continuación)					
Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición	de
Talla al nacer	Longitud del recién nacido desde la cabeza a los pies.	Se registrará con cinta métrica estándar la longitud del recién nacido	Cuantitativa	Centímetros	
Sexo	Característica natural o biológica con base a los genitales externos que lo distingue entre hombre, mujer o indiferenciado.	Género al que pertenezca el recién nacido	Cualitativa	Mujer = 0 Hombre = 1 Indiferenciado = 2	
Apgar al minuto	El test de Apgar es el examen clínico que se realiza al recién nacido después del parto, en donde se realiza una prueba en la que se evalúan cinco parámetros para obtener una primera valoración simple, y clínica sobre el estado general del neonato.	Evaluación que el pediatra realiza al minuto de vida del recién nacido calificando frecuencia cardiaca, esfuerzo respiratorio, tono muscular, coloración, irritabilidad refleja.	Cuantitativa	1-10	
Apgar a los cinco minutos	El test de Apgar es el examen clínico que se realiza al recién nacido después del parto, en donde se realiza una prueba en la que se evalúan cinco parámetros para obtener una primera valoración simple, y clínica sobre el estado general del neonato.	Evaluación que el pediatra realiza a los 5 minutos de vida del recién nacido calificando frecuencia cardiaca, esfuerzo respiratorio, tono muscular, coloración, irritabilidad refleja.	Cuantitativa	1-10	

Definición de las variables y escalas de medición utilizadas en el estudio (continuación)					
Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición	de
Ventilación mecánica invasiva	Asistencia de la ventilación por medio de un ventilador	Asistencia de la ventilación por medio de un ventilador donde el paciente requiere la introducción de un tubo endotraqueal a través de la cavidad oral que comunica al ventilador con la tráquea	Cualitativa	No = 0 Si = 1	
Duración de la ventilación mecánica asistida	Duración de la asistencia de la ventilación de forma invasiva (paciente intubado)	Duración en días que el paciente requiere la presencia de un tubo endotraqueal y un ventilador para llevar a cabo su ventilación	Cuantitativa	Días	
Ventilación no invasiva	Asistencia de la ventilación del paciente sin ameritar intubación endotraqueal	Asistencia de la ventilación por medio de CPAP nasal, O ₂ por puntas nasales, O ₂ a flujo libre o por nebulizador	Cualitativa	No = 0 Si = 1	
Duración de la ventilación no invasiva	Duración de la asistencia de la ventilación con O ₂ suplementario de forma invasiva (paciente no intubado)	Duración en días que el paciente requiere la asistencia de O ₂ suplementario por medio de CPAP nasal, O ₂ por puntas nasales, O ₂ a flujo libre o por nebulizador	Cuantitativa	Días	
Datos de respuesta inflamatoria sistémica	Datos clínicos y paraclínicos desencadenados por la respuesta del organismo ante una infección	Presencia de al menos dos signos de respuesta inflamatoria sistémica como hipotermia o fiebre; letargia, llenado capilar prolongado; hipotonía, arreflexia, taquicardia o bradicardia; apneas; hipoglucemia o hiperglucemia;	Cualitativa	No = 0 Si = 1	

Definición de las variables y escalas de medición utilizadas en el estudio (continuación)					
Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición	
Estado de choque	Estado de grave reducción sistémica en la perfusión tisular, que se caracteriza por la reducción en la provisión y empleo de oxígeno celular, al igual que reducción en la eliminación de los subproductos de desecho del metabolismo.	Gravedad clínica que amerita la utilización de apoyo aminérgico	Cualitativa	No = 0 Sí = 1	
Conteo total de leucocitos	Conteo del número de células blancas de la sangre por unidad de volumen en la sangre venosa	Recuento de leucocitos de Menos de 5000 o más de 25 000 al nacimiento; más de 30 000 en las primeras 12 a 24 horas de vida; o más de 21 000 de las 48 horas en adelante	Cuantitativa	Número de células/ μ L	
Conteo total de PMN	Conteo del número de células blancas PMN de la sangre por unidad de volumen en la sangre venosa	Recuento de PMN observables maduros: aumentados o disminuidos	Cuantitativa	Número de células/ μ L	
Conteo de PMN inmaduros	Conteo del número de células blancas PMN inmaduros de la sangre por unidad de volumen en la sangre venosa	Recuento de PMN inmaduros por encima de los valores normales para su edad	Cuantitativa	Número de células/ μ L	
Relación I/T de PMN	Resultado de la división del recuento de PMN inmaduros y totales	Resultado de la división del recuento de PMN inmaduros y totales	Cuantitativa	Cociente numérico	
Relación I/M de PMN	Resultado de la división del recuento de PMN inmaduros y maduros	Resultado de la división del recuento de PMN inmaduros y maduros	Cuantitativa	Cociente numérico	
Relación de PMN alterada	Resultados de la relación aumentada por encima de 0.3	Resultados de la relación aumentada por encima de 0.3	Cualitativa	No = 0 Sí = 1	
Cambios degenerativos en los PMN	Cambios observables al microscopio en células PMN	Presencia de vacuolización tóxica y/o cuerpos de Dohle en los PMN	Cualitativa	No = 0 Sí = 1	
Conteo de plaquetas	Conteo del número de células plaquetarias de la sangre por unidad de volumen en la sangre venosa	Conteo total de plaquetas	Cuantitativa	Número de células x 10^9 /L	
Conteo de plaquetas alterado	Conteo total de plaquetas menor de 150×10^9	Conteo total de plaquetas menor de 150×10^9	Cualitativa	No = 0 Sí = 1	

Definición de las variables y escalas de medición utilizadas en el estudio (continuación)				
Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición
Score de Rodwell	Prueba de detección para la sepsis neonatal temprana con base a biometría hemática inicial.	Resultado de los parámetros evaluados en la biometría hemática inicial. Por lo que la alteración en alguno de ellos se considerará como un puntaje para el Score.	Cuantitativa después se dicotomizó	Puntaje total Puntaje > 3 = positivo para sepsis Puntaje < 2 = negativo para sepsis
Hemocultivo	Se realiza hemocultivo en el cual	En caso de ser positivo de investiga si hubo un aislamiento. De ser así se coloca el nombre del microorganismo identificado.	Cualitativa	Negativo = 0 Positivo = 1 (especificar microorganismo aislado)

MUESTRA

Tamaño de la muestra:

Para llevar a cabo la estandarización de la técnica de caracterización de la microbiota intestinal se recolectaron muestras de materia fecal de recién nacidos en el lugar de estudio el periodo comprendido entre el 1 de septiembre de 2020 y el 31 de diciembre de 2021.

Muestreo

No probabilístico de casos consecutivos

Se realizó análisis estadístico descriptivo calculando medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, así como frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas. Según la distribución de los datos cuantitativos se realizaron pruebas paramétricas o no paramétricas para comparar las variables entre los neonatos sanos y con sepsis. Se utilizó el programa SPSS v. 23.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis estadístico descriptivo calculando medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, así como frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas. Dada la N y la distribución de los datos cuantitativos se realizaron pruebas no paramétricas para comparar las variables entre los neonatos sanos y con sepsis (U de Mann de Whitney). Mientras que para la comparación de las variables cualitativas se utilizó prueba χ^2 de Pearson o Prueba Exacta de Fisher cuando la frecuencia en las celdas fue menor a 5. Se utilizó el programa SPSS v. 23.

FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ÉTICOS

1. El investigador garantiza que este estudio tuvo apego a la legislación y reglamentación de la Ley General de salud en materia de Investigación para la Salud, lo que brindó mayor protección a los sujetos del estudio.
2. De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, este proyecto fue considerado como investigación sin riesgo, ya que se realizó únicamente recolección de materia fecal, no ameritó ninguna maniobra de intervención y no se requirió de muestras séricas.
3. Los procedimientos de este estudio se apegaron a las normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y se llevaron a cabo en plena conformidad con los siguientes principios de la “Declaración de Helsinki” (y sus enmiendas en Tokio, Venecia, Hong Kong y Sudáfrica) donde el investigador garantizó que:
 - a. Se realizó una búsqueda minuciosa de la literatura científica sobre el tema a realizar.
 - b. Este protocolo fue sometido a evaluación y aprobado por el Comité Local de Investigación en Salud y Comité de Ética en Investigación de la UMAE HGO No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del Instituto Mexicano del Seguro Social.
 - c. Este protocolo se realizó por personas científicamente calificadas en biología molecular en colaboración con un equipo de médicos clínicamente competentes y certificados en su especialidad.
 - d. Este protocolo guardó la confidencialidad de las personas.
 - e. Este estudio requirió carta de consentimiento informado por escrito.
4. Se respetó cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg y el Informe Belmont.

5. El procedimiento que se utilizó inicialmente, para invitar a los posibles participantes, se realizó proporcionando información completa, precisa y suficiente a los padres o tutores del menor, sobre el estudio de investigación titulado: **“Comparación de la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal”**. En donde se les explicó, sobre la importancia de las bacterias del intestino (microbiota intestinal), los posibles cambios bacterianos que pueden presentarse con el tipo de parto, dieta y el uso de antibióticos. Se explicó la relación de los cambios de la microbiota intestinal y las probables complicaciones respiratorias, intestinales o metabólicas.

Los padres de los recién nacidos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron invitados para que sus hijos formaran parte del estudio de manera voluntaria y confidencial. Se proporcionó una carta de consentimiento informado a la madre (**Anexo 5**), explicando ampliamente como se realizaría el estudio para describir la microbiota intestinal de neonatos, la toma de muestra de materia fecal (tomada del pañal del bebé) y finalmente la búsqueda de los principales grupos bacterianos que habitan en la materia fecal neonatal. Además, de hacer mención que, en cualquier momento tenían el derecho de cambiar su decisión y manifestarla. Cuando no autorizaron la participación en el estudio, el bebé recibió la atención médica y el tratamiento que ameritó de acuerdo a los procedimientos establecidos en el hospital independientemente del retiro del estudio.

6. El procedimiento para garantizar la confidencialidad de los datos personales y la información obtenida fue la asignación de un folio estructurado específicamente para este estudio (Mbi-21-001), donde solo el investigador principal conoció los datos de cada paciente.
7. Para el estudio no se requirió obtener otras muestras biológicas que sometieran a los pacientes a una intervención.

RESULTADOS

Identificación y selección de los pacientes

En el periodo de estudio se identificaron 94 recién nacidos en los servicios de UCIN, UTIN, prematuros, cuneros y alojamiento conjunto. El servicio de UCIN representó el mayor porcentaje de pacientes (46.8%) (Figura 1).

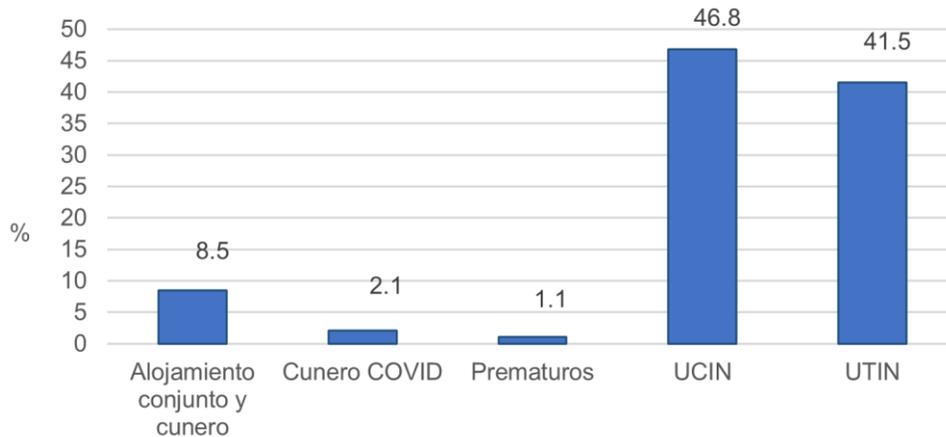


Figura 1. Distribución de los pacientes estudiados por servicio

Se recolectaron datos clínicos de los pacientes para clasificarlos con presencia o ausencia de sepsis (**Anexo 1**), siendo 8 clasificados como clínicamente sanos (9%) y 86 con sepsis (91%) (Figura 2).

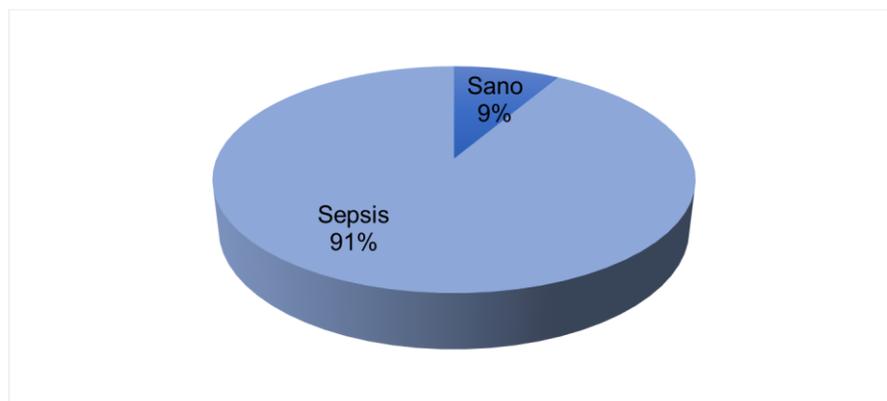


Figura 2. Clasificación de los pacientes estudiados por grupo.

La mediana de edad materna del grupo de pacientes con sepsis fue de 32 años (25-36), así mismo, en los pacientes del grupo clínicamente sanos mostraron una mediana de 32 años (19-44), con una $p = 0.865$, la cual no es significativa lo que nos traduce que en esta variable ambos grupos son semejantes, como se muestra en la figura 3.

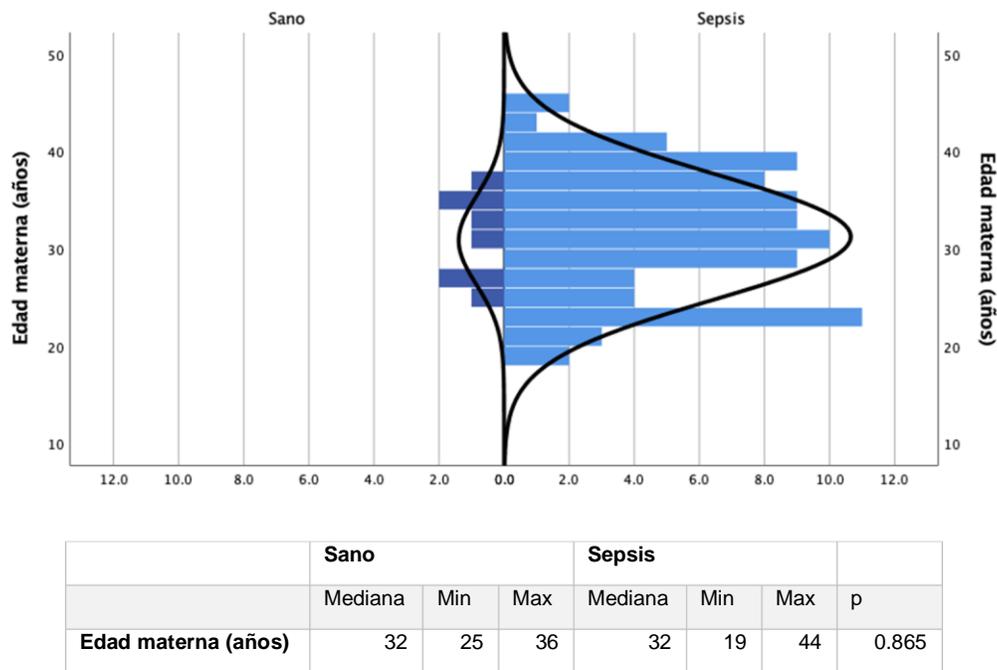


Figura 3. Distribución de la edad materna por grupo.

Para la edad gestacional, el grupo 1 mostró una mediana de 31 SDG (25-34), en cambio, para el grupo 2 fue de 34.5 SDG (33-35), $p = 0.0001$, estadísticamente significativa lo cual nos indica que en esta variable los grupos no son comparables. (Figura 4)

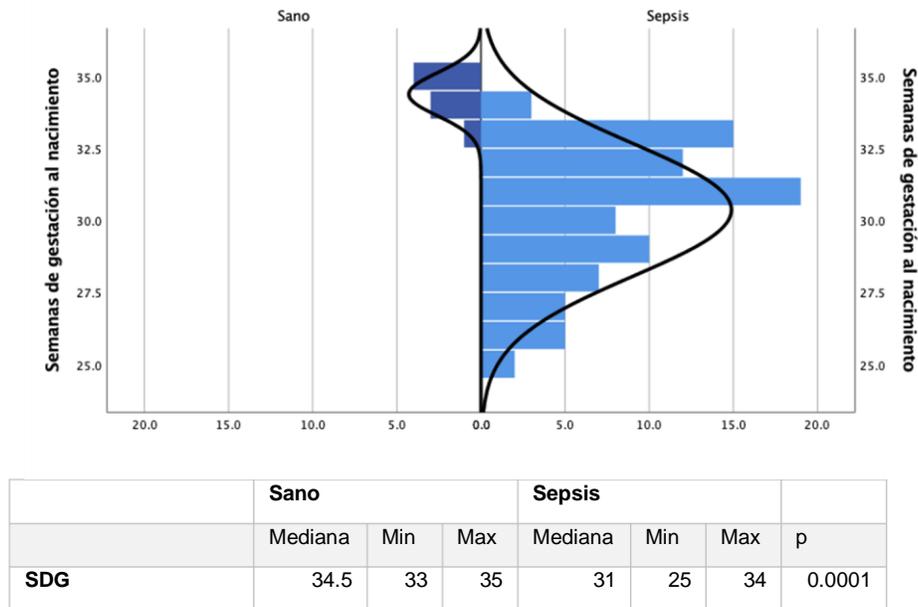
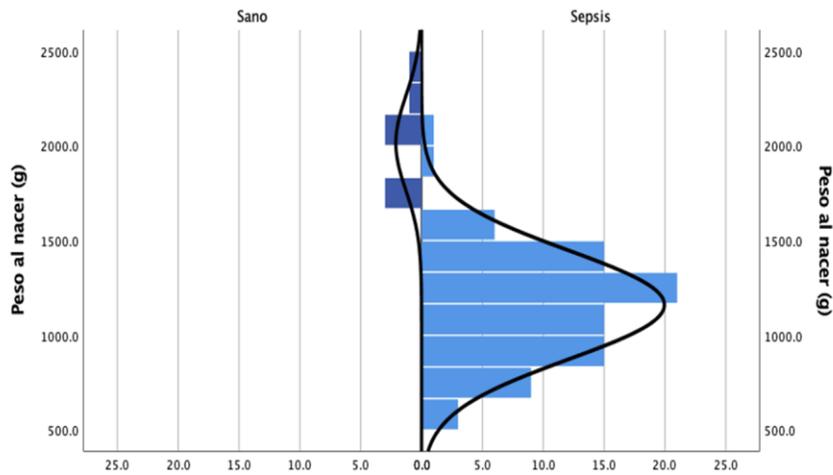


Figura 4. Distribución de la edad gestacional por grupo.

El peso al nacer del grupo de pacientes con sepsis tuvo una mediana de 1172.5 gramos (620-2015), en contraste con el grupo de clínicamente sanos que fue de 2055 gramos (1690-2055), con una $p = 0.001$, estadísticamente significativo, lo que nos muestra que no son comparables a este nivel (Figura 5).



	Sano			Sepsis			p
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	
Peso al nacer (g)	2055	1690	2420	1172.5	620	2015	0.0001

Figura 5. Distribución del peso al nacer por grupo de estudio.

La distribución de la talla al nacer de los pacientes en función de la presencia o no de sepsis se muestra en la figura 6.

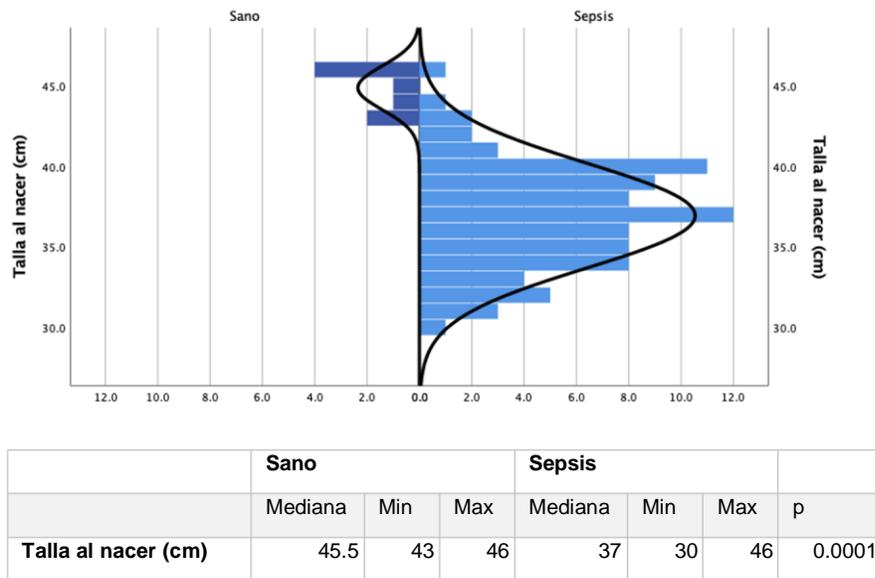


Figura 6. Distribución de la talla al nacer por grupo de estudio.

La distribución del Apgar al minuto de los pacientes en función de la presencia o no de sepsis se muestra en la figura 7.

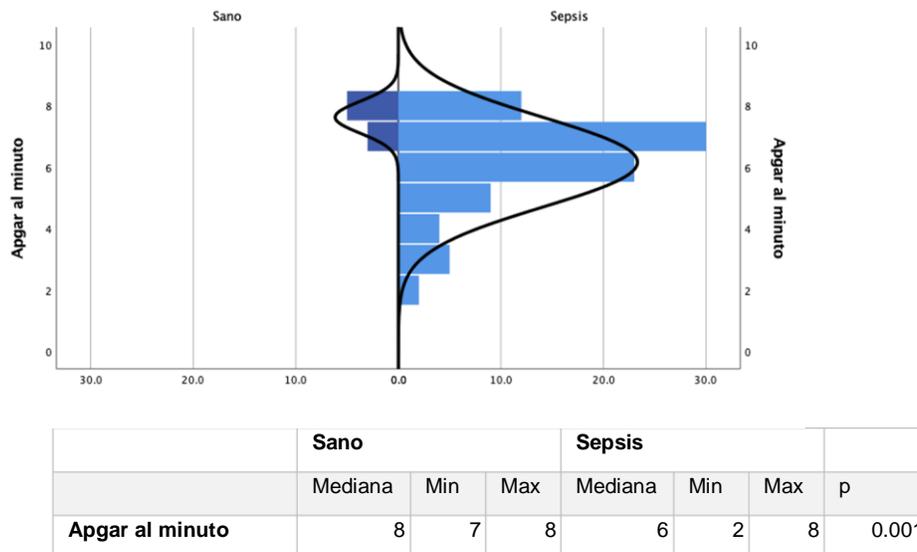


Figura 7. Distribución del Apgar al minuto por grupo de estudio.

La distribución del Apgar a los 5 minutos de los pacientes en función de la presencia o no de sepsis se muestra en la figura 8.

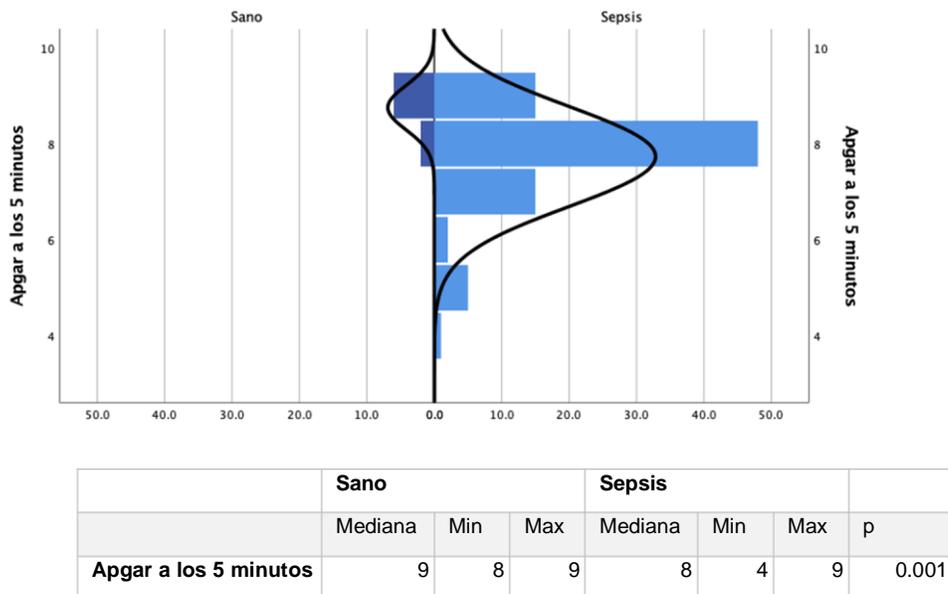


Figura 8. Distribución del Apgar a los 5 minutos por grupo de estudio.

El sexo masculino predominó en el grupo de sepsis (51.2%), a diferencia del grupo clínicamente sanos donde las mujeres fueron más frecuentes (75%). Para esta variable la p no mostró significancia estadística, lo que hace comparables ambos grupos (Figura 9).

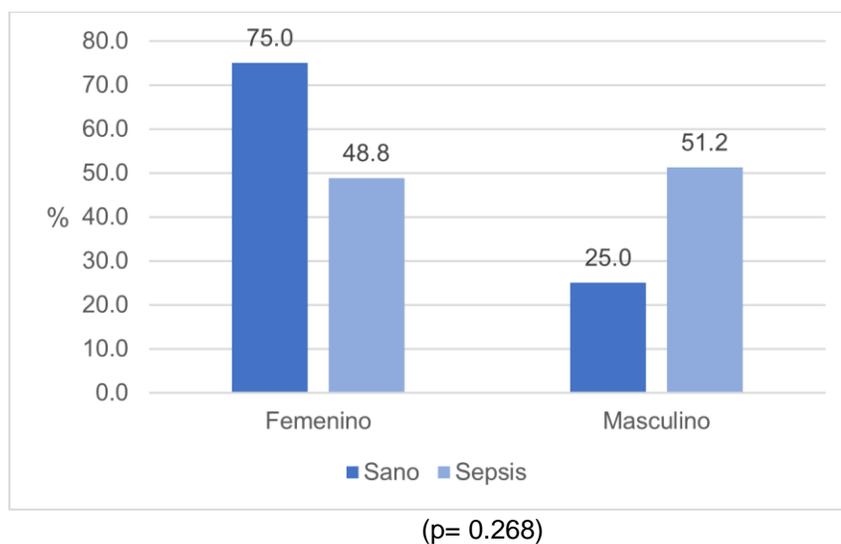


Figura 9. Frecuencia del género por grupo de estudio.

El uso de esteroides prenatales en función de la presencia o no de sepsis se muestra en la figura 10.

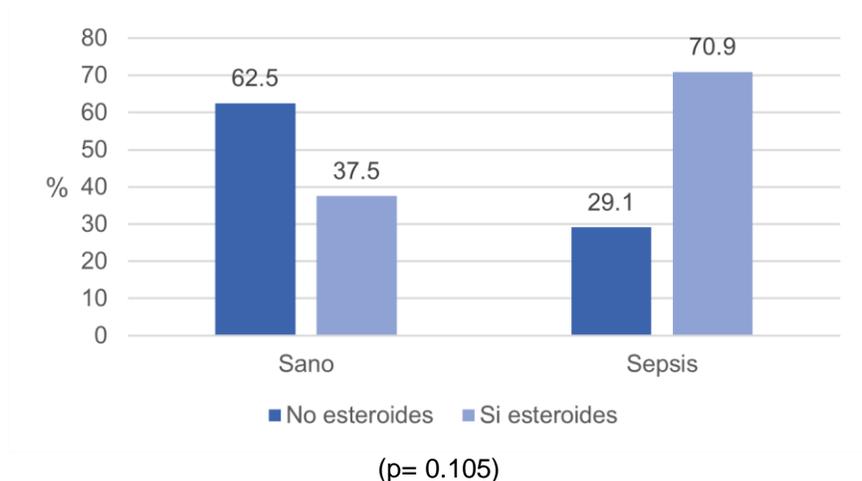


Figura 10. Frecuencia del uso de esteroides prenatales por grupo de estudio

La ventilación mecánica se requirió por 16 días como mediana (1-80) (Tabla 1).

Tabla 1. Ventilación invasiva y no invasiva en los pacientes con sepsis.

	Mediana (mínimo-máximo)
Tiempo de VMA (días)	16 (1 - 80)
Tiempo de uso de CPAP (días)	4 (1 - 15)
Tiempo de uso de puntas nasales (días)	26 (3 - 66)

Respecto a los pacientes con sepsis, en la figura 11 se muestra el uso de ventilación invasiva y no invasiva, requerida por la morbilidad a nivel respiratorio que fue la más frecuente.

La ventilación mecánica se requirió en el 89.5% de los pacientes, y el CPAP 64.3%. De estos en 70.9% se administró surfactante exógeno.

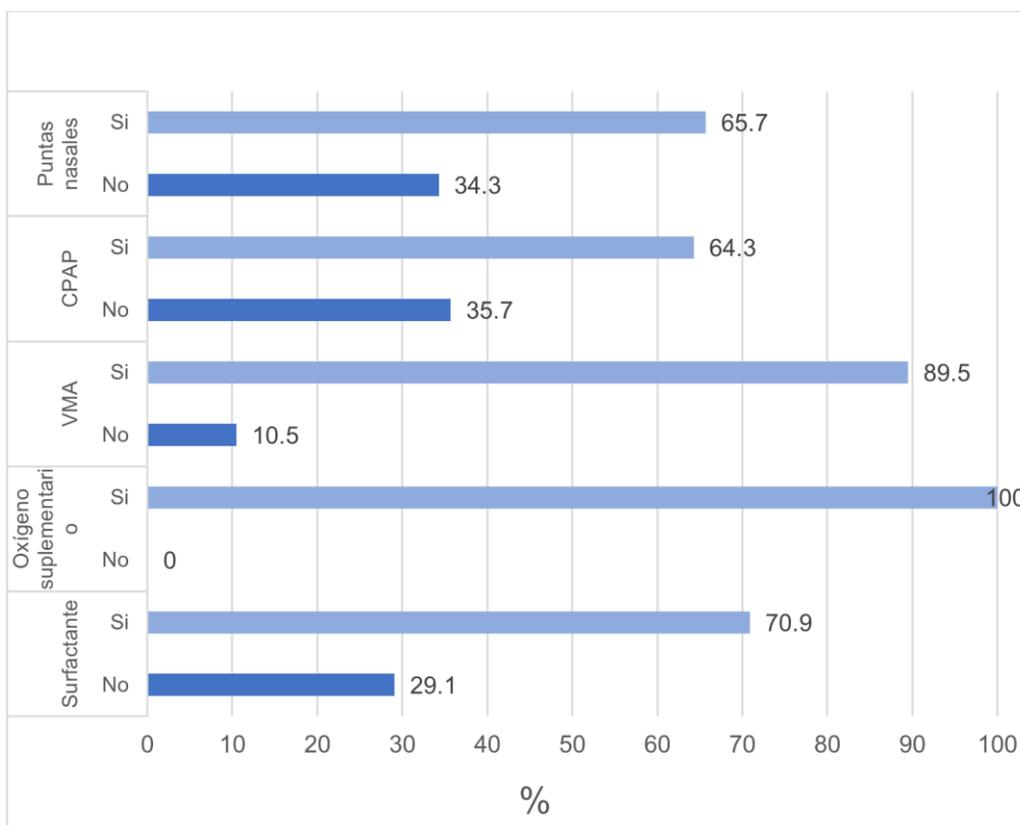


Figura 11. Frecuencia de medidas de apoyo ventilatorio en pacientes con sepsis.

Los pacientes con sepsis presentaron algún dato de respuesta inflamatoria sistémica tales como: hipotermia o fiebre; letargia, llenado capilar prolongado; hipotonía, arreflexia, taquicardia o bradicardia; apneas; e hipoglucemia o hiperglucemia, en 76.8% se presentó alguno de ellos.

Los pacientes con sepsis 73.3% cursaron algún evento de sepsis tardía (Tabla 2).

Tabla 2. Eventos de sepsis en los pacientes estudiados

Sepsis	n (%)
Temprana	86 (100)
Tardía	63 (73.3)

De acuerdo al Score de Rodwell, cada uno de los parámetros se aplicaron en los pacientes estudiados mostrando la mediana en todos ellos en parámetros normales, así mismo, su puntaje con mayor frecuencia fue negativo (2 puntos, 0-6) (Tabla 3).

Tabla 3. Puntaje del Score de Rodwell en los pacientes de sepsis

	Mediana	Mínimo	Máximo
Conteo total de leucocitos (BH inicial)	6945	790	72040
Polimorfonucleares totales (BH inicial)	2975	190	39510
Polimorfonucleares inmaduros (BH inicial)	110	0	13460
Relación PMF inmaduros/totales	0	0	1
Relación PMF inmaduros/maduros	0	0	1
Conteo de plaquetas	205	19	500
Score de Rodwell	2	0	6

El Score de Rodwell fue positivo en 42 pacientes que conformaban este grupo, es decir, el 48.8% (Tabla 4).

Tabla 4. Interpretación del puntaje de Score de Rodwell

	n (%)
Positivo	42(48.8)
Negativo	44 (51.2)

De los casos con sepsis se logró el aislamiento microbiológico en el hemocultivo en 22.1%.

En los hemocultivos que se reportaron positivos, el microorganismo que predominó fue *S. epidermidis*. La distribución del resto de los gérmenes aislados se muestra en la figura 12.

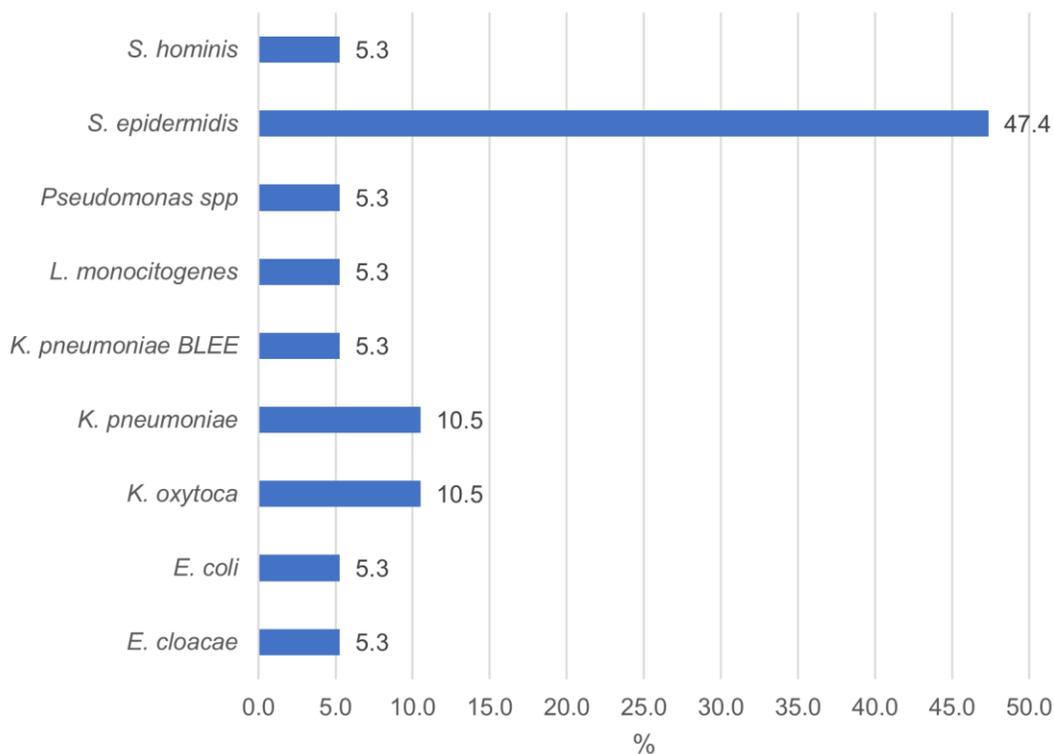


Figura 12. Frecuencia según el microorganismo aislado en hemocultivo.

Los pacientes que tuvieron hemocultivo con tipificación del germen causal presentaron datos clínicos de respuesta inflamatoria sistémica en el 89.4% mientras que 73.6% de ellos, cursaron con datos clínicos de respuesta inflamatoria sistémica, así como una calificación del score de Rodwell mayor a 3 puntos, es decir positivo para sepsis (figura 13).

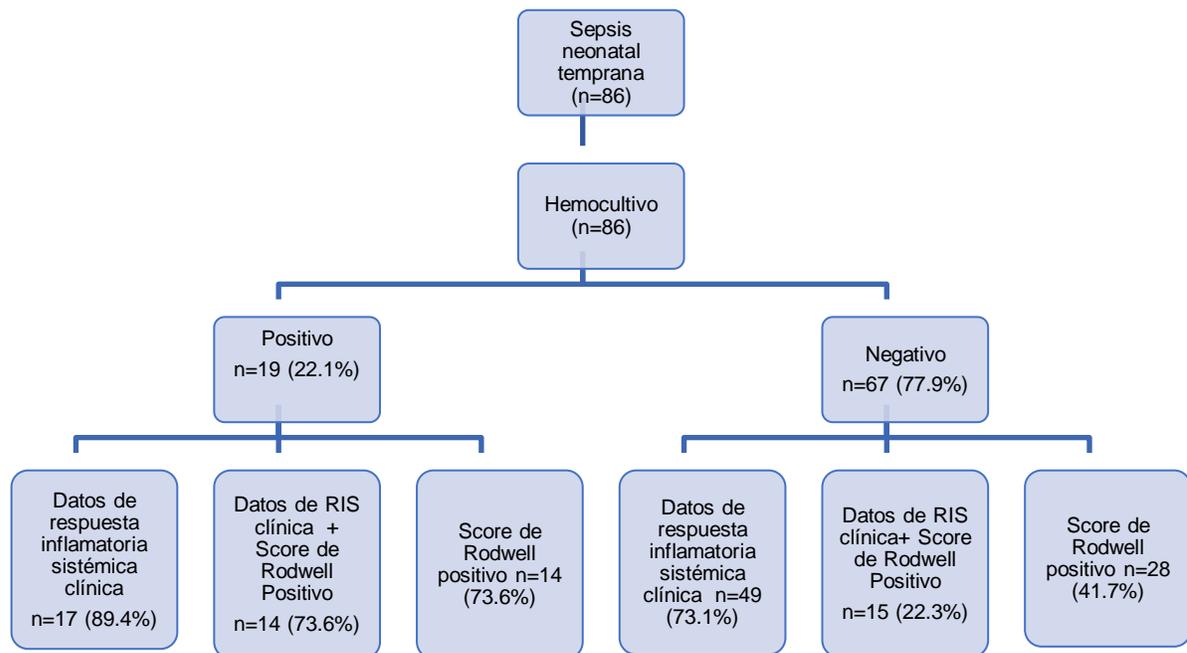


Figura 13. Flujograma de la relación entre los hemocultivos y los datos de RIS y Score de Rodwell.
RIS = Respuesta Inflamatoria sistémica.

Para la estandarización de las técnicas de biología molecular, se realizó la recolección de una muestra de materia fecal fresca y/o meconio del pañal dentro de las 48 horas posteriores al nacimiento de recién nacidos con sepsis que cumplieran con los criterios de selección. Cabe mencionar que con fines de la estandarización, se procesaron muestras biológicas de los pacientes con sepsis independientemente de la vía de nacimiento, ya que al tratarse de pacientes con antecedentes perinatales patológicos, la probabilidad de nacimiento con parto fue menor.

Las muestras de materia fecal fresca y/o meconio del pañal se congelaron para su transporte al laboratorio y se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento.

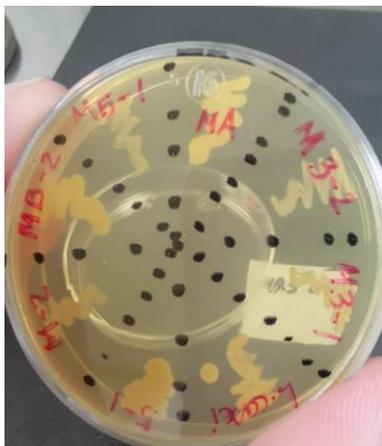
A partir de las muestras de materia fecal se extrajo ADN genómico bacteriano con el kit *QIAamp ADN stool Mini kit* (Qiagen) de acuerdo especificaciones del proveedor. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para determinar la calidad e integridad del ADN genómico se realizó una PCR con oligonucleótidos universales, 27f 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' y 1491r 5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (*Integrated DNA Technologies IDT, USA*). Las condiciones de reacción fueron: pre-desnaturalización: 94° C, 5min; desnaturalización: 94°C, 30 segundos; alineamiento: 52° C, 20 segundos; elongación 68° C, 40 segundos y extensión final 68° C, 7 minutos, por 35 ciclos.

La identificación microbiana se realizó mediante la técnica de PCR punto final y el empleo de oligonucleótidos específicos para los *phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias* y *Actinobacterias*; los géneros *Lactobacillus, Bifidobacterium* y *Prevotella* y especies *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus agalactae, Bifidobacterium longum, Faecalibacterium prausnitzii* y *Bacteroides Thetaiotaomicron* (**Anexo 2**). Los oligonucleótidos se sintetizaron por *Integrated DNA Technologies IDT, USA* y se utilizaron las condiciones de amplificación para cada bacteria de acuerdo con la literatura. La cuantificación de la microbiota intestinal se realizó mediante PCR en tiempo real (PCR en tiempo real StepOnePlus™, USA (**Anexo 3**), empleando una curva estándar de *Escherichia*

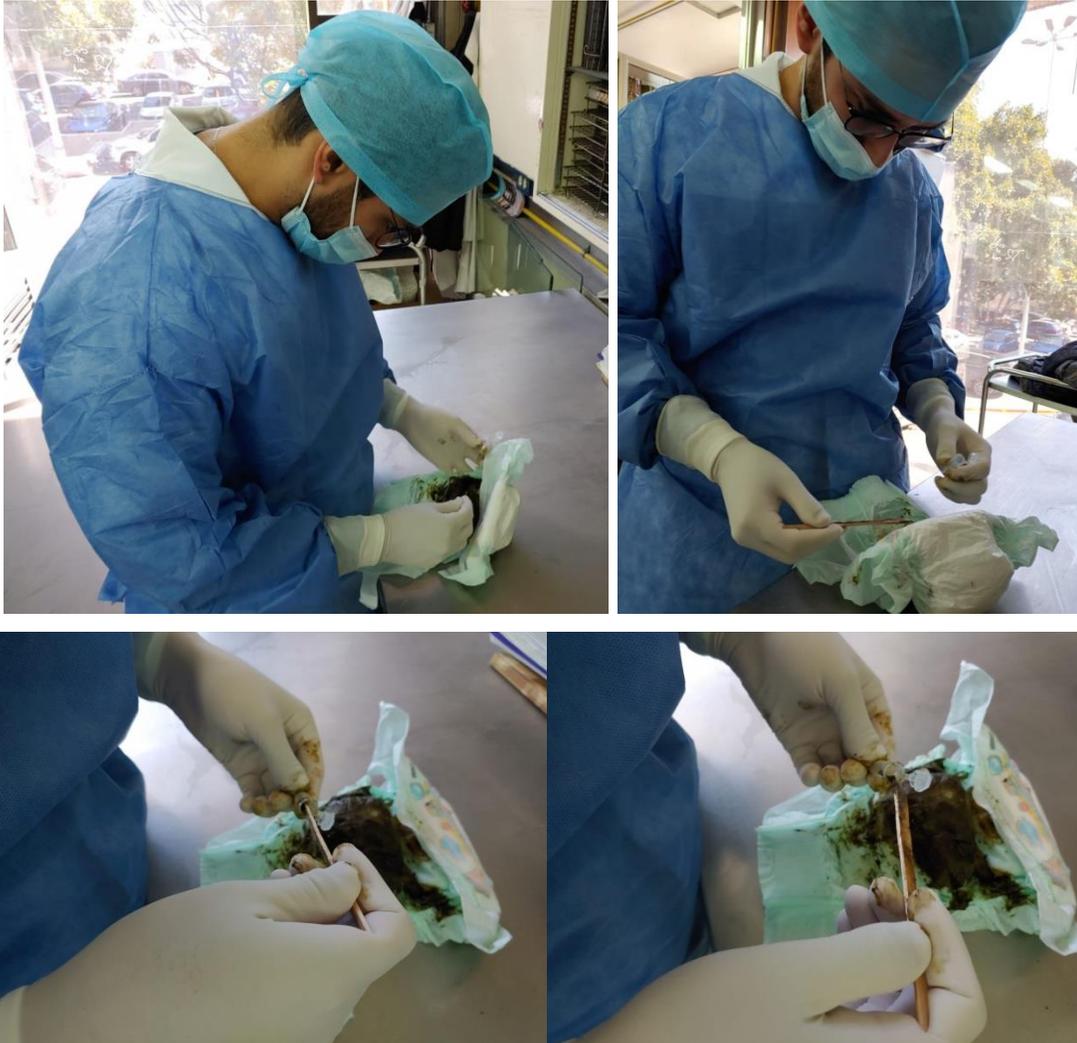
coli. Para realizar la curva se cultivó el microorganismo en caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) a 37 °C por 24 horas en condiciones aerobias. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas y se extrajo el ADN genómico de las diluciones: 1x10¹, 1x10³, 1x10⁵, 1x10⁷ y 1x10⁹ UFC/mL, que fueron los puntos de la curva estándar. Se confirmó la calidad e integridad del ADN con una PCR y con oligonucleótidos universales 27f y 1491r. Una vez confirmada la integridad del ADN de la curva estándar, se procedió a la cuantificación de las muestras por PCR en tiempo real. Para la cuantificación, se utilizaron oligonucleótidos específicos para los *phyla Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterias* y *Actinobacterias*; los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacteriu*, *Streptococcus ssp* y *Prevotella* y especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bifidobacterium longum*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bacteroides Thetaiotaomicron*. Cada reacción contuvo SYBR® Green I, select master mix 2x 10 µL, primer forward 1 µL, primer reverse 1 µL, ADN 3 µL, agua 10 µL, con un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación para cada bacteria fueron las utilizadas de acuerdo con la literatura (**Anexo 4**). Los oligonucleótidos se sintetizaron por *Integrated DNA Technologies IDT, USA*.

Se presentaron diversas limitaciones técnicas para la recolección de las muestras,

1. Al identificar a los pacientes que tenían disponibilidad de la muestra en el pañal, se recolectaba la cantidad necesaria en su misma cama, sin embargo, al realizar la extracción del ADN genómico presentaba contaminación con ADN no bacteriano.



Para solucionar este problema, se decidió trasladar el pañal con materia fecal a un área disponible donde se usó equipo de protección como gorro, bata y guantes estériles para evitar la contaminación.

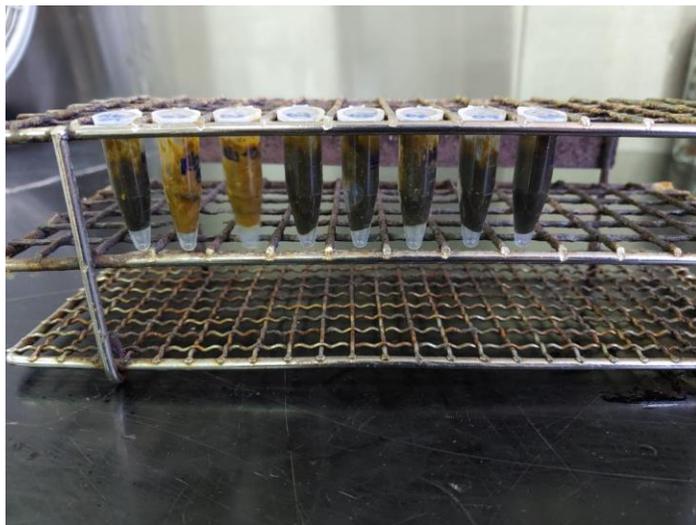
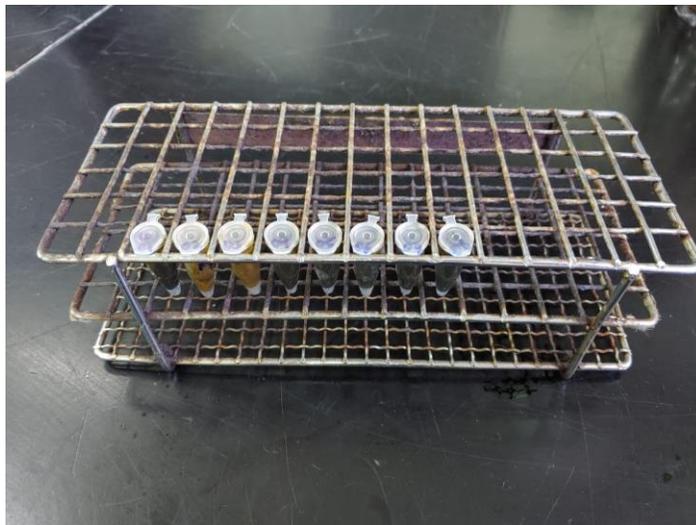


2. Inicialmente la cantidad de muestra para procesar fue insuficiente ya que se realizaba hisopado rectal en los casos de no presentar abundante materia fecal.

Lo cual se solucionó recolectando el meconio directamente del pañal, asegurando mayor cantidad de muestra, se tomaba con abatelenguas usado como espátula, y se recolectaba en un tubo estéril de microcentrífuga de Eppendorf.

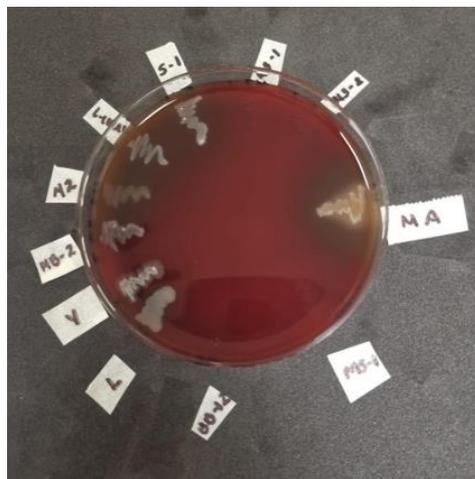


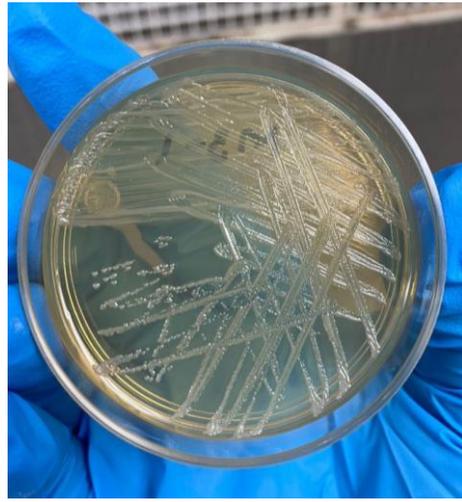
3. Las muestras de materia fecal fresca y/o meconio se congelaron para su transporte al laboratorio donde se realizó la extracción, para lo cual se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desde su congelamiento hasta su procesamiento, al momento de transportarlas se detectó que se perdía la red de frío. Por lo tanto, para solucionarlo se revisó esta parte del proceso, garantizando en todo momento que el transporte de las muestras mantuviera siempre la temperatura requerida y esto en parte fue al hacerlo con un contenedor con aislante térmico y bolsas refrigerantes isotérmicas.



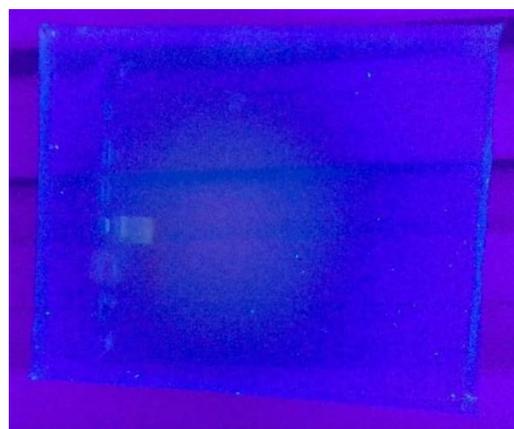
4. Posteriormente, al procesar las muestras, se encontró que en estas no había aislamiento microbiológico, se identificó que el tiempo en que se presentaba la evacuación y se recolectaba el pañal con la muestra era prolongado, más de una hora, lo que condicionaba la desnaturalización del ADN.

Para solucionarlo, la recolección de la muestra se realizó en menos de una hora desde su deposición, logrando de esta forma el aislamiento de microorganismos y así realizar la extracción del ADN genómico.





5. Al detectar errores en algunos de los pasos del proceso, desde la obtención de la muestra hasta la extracción genómica del ADN; cuando se realizaba la amplificación del mismo, con primers específicos, no se lograba la identificación de microorganismos.



Al corregir los problemas comentados previamente, la extracción y amplificación del ADN se realizó de forma exitosa.

6. A base de prueba y error, se logró estandarizar la técnica de recolección de muestra, incluyendo pacientes del grupo de casos, para lograr evitar los errores enumerados en los párrafos anteriores. Lo cual nos permitió, finalmente, una muestra de meconio con las condiciones adecuadas para la extracción y amplificación del ADN genómico, para identificar la microbiota intestinal en los recién nacidos.

Una vez estandarizada la técnica sólo se procesaron 8 muestras de pacientes clínicamente sanos que cumplieron con todos los criterios de selección, incluyendo la vía de nacimiento por parto. (Figura 14).

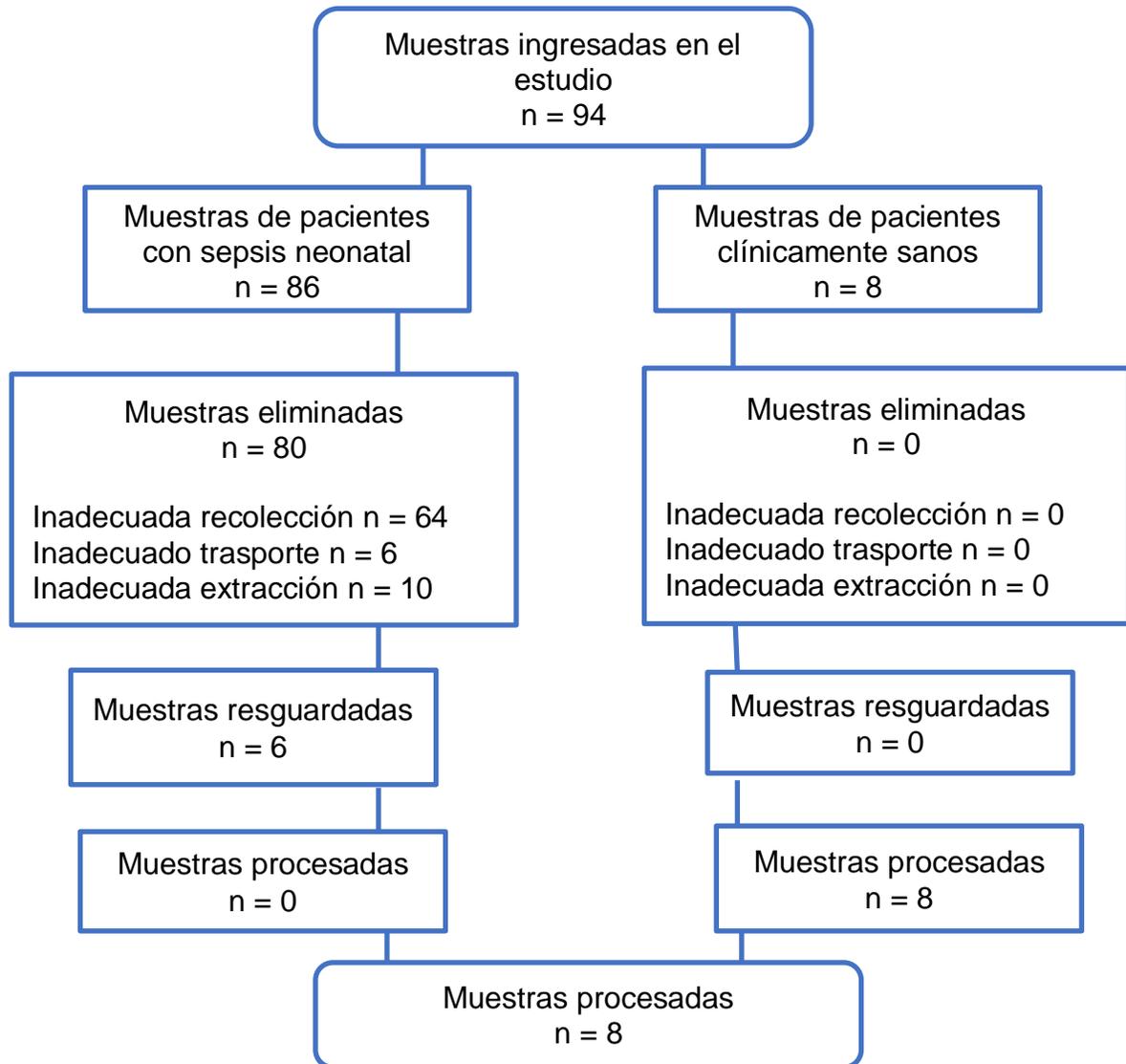


Figura 14. Flujograma de muestras recolectadas en el estudio.

Para determinar y describir las poblaciones bacterianas presentes en las heces de los neonatos clínicamente sanos y con sepsis, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de muestras de meconio, para lo cual se siguieron las especificaciones del kit QIAmp ADN stool mini kit, desglosado en el apartado anterior (Imagen 1).

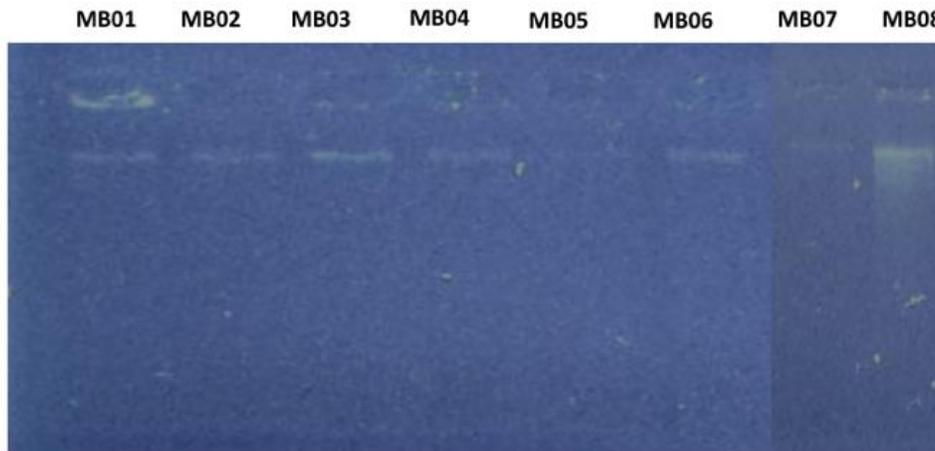


Imagen 1. Extracción de ADN genómico de materia fecal de neonatos clínicamente sanos

Posterior a la extracción, se realizó amplificación del ADN genómico mediante la técnica de PCR con primer específico para la *phyla* Firmicutes (Imagen 2).

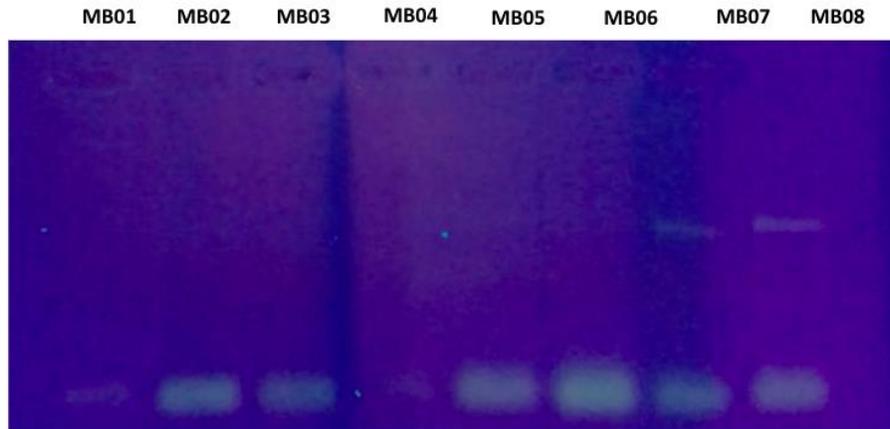


Imagen 2. Amplificación de ADN genómico primer *phyla* Firmicutes

Como siguiente paso se llevó a cabo una reacción de PCR del ADN extraído a partir de las heces de cada uno de los pacientes.

Como amplificadores se emplearon los primers Lac1 y Lac2 que amplifican la región V4-V5 del gen 16S (Imagen 3).

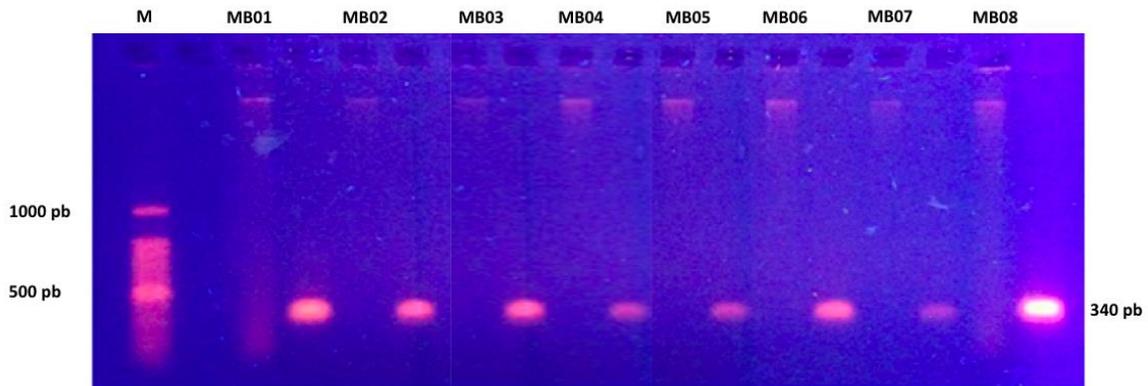


Imagen 3. ADN genómico de neonatos clínicamente sanos y amplificación de los primers Lac 1 y Lac 2 (340 pb).

M=marcador de ADN 100 pb.

Los perfiles identificados a partir de los productos de PCR de la región V4-V5 obtenidos con los primers Lac1 y Lac2 fueron complejos y característicos para cada uno de los neonatos analizados. Sólo algunas bandas fueron comunes entre los diferentes carriles. Todos los perfiles presentaron bandas intensas y bien resueltas en la parte inferior del gel (340 pb), pero también aparecían otras regiones que contenían bandas sin resolver o fragmentos separados débilmente, que por lo general se observaron en la parte alta del gel.

Con estos resultados se pudo determinar los *phylum* de la microbiota encontrados en estos recién nacidos (Tabla 5).

Tabla 5. *Phyla* más abundantes en materia fecal de neonatal clínicamente sanos.

<i>Phylum</i>
Actinobacteriota
Firmicutes
Proteobacteria
Acidobacteriota

Hasta el momento las 6 muestras de materia fecal de los recién nacidos con sepsis neonatal no han sido procesadas debido a la interrupción en la ministración del financiamiento derivado de la problemática generada por la pandemia de COVID-19, por lo que se encuentran congeladas. Aún no ha sido posible llevar a cabo la caracterización de la microbiota en paciente sépticos, y por lo tanto la comparación de los pacientes sépticos con los clínicamente sanos.

Es necesario continuar con la recolección y procesamiento de muestras para cumplir con el objetivo inicial del trabajo.

DISCUSIÓN

Madan y colaboradores⁴⁶ determinaron la microbiota en 6 prematuros extremos de 24 a 27 SDG, así mismo, Tururen y colaboradores⁴⁷ la determinó en 21 recién nacidos obtenidos por cesárea y 23 por vía vaginal. De la misma forma, Stewart y colaboradores⁴⁸ analizaron las muestras de 7 recién nacidos con sepsis neonatal tardía de 26.5 a 28 SDG, y 28 sanos de 25 a 28 SDG.

Dornelles y colaboradores⁴⁹, de igual manera incluyeron en su estudio 40 neonatos menores de 32 SDG con sepsis y 44 neonatos sin sepsis. Semejante a las muestras de pacientes recolectadas en el presente estudio, ya que de los 86 pacientes del grupo de sepsis inicialmente incluidos y que posteriormente se fueron descartando por muestra inadecuada para finalmente quedar seis que si cumplían con los criterios de inclusión y adecuada calidad y cantidad, así como 8 muestras en pacientes clínicamente sanos en las cuales ya se realizó el proceso completo.

En los pacientes incluidos en el presente estudio, al comparar los grupos de sepsis neonatal con los clínicamente sanos, las únicas variables que no mostraron significancia estadística son edad materna, sexo y uso de esteroide prenatal, lo que representó que los grupos son comparables en estas características.

En cambio, la edad gestacional y el peso al nacimiento mostraron significancia estadística al comparar ambos grupos, traduciendo que estas variables no son comparables entre sí. En este momento no se ha completado el tamaño de muestra por lo que los pacientes registrados aún no están pareados, siendo esto necesario para que los grupos, en estas características epidemiológicas, sean semejantes.

El estudio de Madan y colaboradores⁴⁶ mostró que la microbiota intestinal adquirida en prematuros extremos de cuidados intensivos está alterada por diversos factores: alimentación, administración de antibiótico y patógenos

adquiridos durante su hospitalización; se incluyeron 6 recién nacidos de 24 a 27 SDG con peso al nacer de 510 a 1080 gramos, cinco de ellos nacieron por vía abdominal, a quienes se les tomó 3 muestras seriadas (la primera antes de las 24 horas de vida, las restantes entre el 3º y 14º día de vida). Dos pacientes no tuvieron sepsis, dos con sepsis tardía y dos con hemocultivo negativo pero con datos de respuesta inflamatoria sistémica. La extracción del ADN se realizó utilizando el kit MoBio Powesoil bacterial DNA isolation. Se requirió por lo menos 50 miligramos de materia fecal para lograr la extracción del ADN.

El meconio no fue estéril, encontrando predominio de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Enterobacteriales*.

Los recién nacidos que desarrollaron sepsis inicialmente tuvieron baja diversidad microbiana y adquirieron un predominio de *Staphylococcus*, mientras que en los sanos se presentó mayor diversidad y predominio de Firmicutes. Semejante a los hallazgos que hemos encontrado en los pacientes sanos que hasta el momento se han analizado en nuestro estudio.

Stewart y colaboradores⁴⁸ describen un estudio de 7 pacientes con sepsis tardía, 4 nacieron por vía vaginal y 3 por vía abdominal; y 28 sanos, 16 partos y 12 cesáreas. A cada grupo se le recolectó una muestra diaria, por más de 2 semanas. La microbiota intestinal que estuvo alterada en los bebés prematuros con sepsis tardía mostraron que los taxones dominantes generalmente se aíslan en el hemocultivo de diagnóstico, y en orden de frecuencia fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Los sanos tuvieron un mayor aislamiento de *Bifidobacterium*.

Dornelles y colaboradores⁴⁹ llevaron a cabo un estudio en 40 pacientes con diagnóstico clínico de sepsis, y 44 sin sepsis. El *phylum* más abundante en el meconio de los neonatos pretérminos fue Proteobacteria, siendo este más prevalente en el grupo de sepsis neonatal. Mostrando que la microbiota intestinal

de los prematuros con diagnóstico clínico de sepsis neonatal temprana es diferente que los pretérminos sin infección, predominando el género *Paenibacillus* y *Flavobacterium*, respectivamente.

En este estudio se describen las dificultades técnicas en la recolección del meconio, entre las que destacan el retraso en la evacuación hasta su recolección y su reducido volumen. Mismas situaciones que ocurrieron en la primera fase de nuestro estudio, y que fueron enumeradas previamente. Las cuales, los autores las corrigieron y pudieron recolectar un número considerable de muestras, en condiciones que permitieron un análisis confiable, así mismo nosotros tuvimos la oportunidad de superar situaciones semejantes, logrando obtener algunas muestras, aunque todavía sin completar el número requerido.

Turunen y colaboradores⁴⁷ publicaron un estudio donde los recién nacidos se incluyeron de acuerdo a su vía del nacimiento, vaginal (23) o cesárea (21), determinando la diferencia de bacterias en el meconio. Encontrando que predominaban las *phyla* Firmicutes en el 74% de los nacimientos vaginales y 40% en los nacidos por cesárea, seguidos de Proteobacteria en el 22 y 20%, respectivamente. Así como Actinobacteriota en el 18% de los neonatos obtenidos por cesárea comparado sólo con el 1.3% de los nacidos por parto vaginal. Reportando otros *phyla* en menos del 1% en ambos tipos de nacimientos.

Similar a los encontrados en las muestras analizadas de los recién nacidos por parto vaginal incluidos en el presente estudio. Sin embargo, consideramos que se pueden modificar los criterios de inclusión y no solo limitarlo a los nacimientos por vía vaginal, ya que se ha demostrado que están bien establecidas las diferencias de la microbiota en estas dos vías de nacimiento.

Es importante mencionar que, en estos primeros meses del estudio, haber logrado la estandarización de la toma de muestra y su recolección es de gran ayuda para obtener el objetivo final, ya que para lograrlo, aunque se invirtió más tiempo de lo esperado en esta primera fase del estudio, finalmente se realizó.

Estos mismos problemas técnicos también se han presentado en otros estudios ya publicados^{46,47}.

Al tener estandarizado y optimizado cada uno de los pasos del proceso, se ganará tiempo en reunir y procesar el tamaño de muestra calculado, ya que pacientes con las características requeridas para incluirlos en el estudio se presentan diariamente en nuestro hospital.

Con los resultados finales del presente estudio, buscamos las diferencias de la microbiota intestinal en pacientes con sepsis y clínicamente sanos, para intentar modificar la microbiota, sobre todo en los recién nacidos con infección, ya que es una entidad nosológica grave en el neonato, que incrementa la morbilidad y mortalidad, sobre todo en el prematuro.

CONCLUSIONES

La identificación en las dificultades para la recolección de la materia fecal y su transporte, nos ayudó a estandarizar la técnica de cada uno de los pasos implicados, lo cual es de suma importancia para obtener muestras suficientes de adecuada calidad para un proceso confiable.

Al contar con las muestras procesadas de ambos grupos se podrá comparar la microbiota intestinal entre ellos.

Hasta el momento, la microbiota intestinal de los recién nacidos clínicamente sanos fue semejante a lo reportado en la literatura.

REFERENCIAS

1. Caitriona MG, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013;6:295-308.
2. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro DC. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*. 2011;5:71-86.
3. Angelaski E, Armougom F, Million M, Didier Raoult. The relationship between gut microbiota and weight gain in human. *Future Microbiol*. 2012;7:91-99.
4. Stephens RW, Arhire L, Covasa, M. Gut microbiota: from microorganisms to metabolic organ influencing obesity. *Obesity*. 2018;26:801-809.
5. Tisai F, Walter C. 2009. The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep*. 2009;11:307-313.
6. Turrioni F, Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bernasconi SF, et al. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. *Ital J Pediatr*. 2020;46:1-13.
7. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrioni F, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;81:36-117.
8. Koenig JE, Spora A, Scalfonea N, Frickera AD, Stombaughb J, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:4578-4585.
9. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019;7:14. doi: 10.3390/microorganisms7010014.
10. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:1-11.
11. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018;62:583-588.

12. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:690-703.
13. Yatsunencko T, Rey F, Manary M, Trehan I, Dominguez-Bello MG, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222-227.
14. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*. 2017;5:1-18.
15. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:11971-11975.
16. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int*. 2017;66:515-522.
17. Dzidic M, Boix-Amorós A, Selma-Royo M, Mira A, Collado MC. Gut microbiota and mucosal immunity in the neonate. *Am J Med Sci*. 2018;6:1-23.
18. Gopalakrishna KP, Hand TW. 2020. Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome. *Nutrients*. 2020;12:823. doi: 10.3390/nu12030823.
19. Lawson MAE, O'Neill IJ, Kujawska M, Wijeyesekera JA, Flegg Z, et al. Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote *Bifidobacterium* interactions within a single ecosystem. *J Microb Ecol*. 2020;14:635-648.
20. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 2014;7:17-44.
21. Zhuang L, Chen H, Zhang S, Zhuang J, Li Q, et al. Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. 2019;17:13-25.
22. Madan JC, Farzan SF, Hibberd PL, Karagas MR. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24:753-759.
23. Kan, B., Razzaghian, HR, Lavoie, PM. An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis. *Trends Mol Med*. 2016;22:290-302.

24. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110:285-291.
25. Prociانو RS, Silveira RC. The challenges of neonatal sepsis management. *J Pediatr*. 2020;96:80-86.
26. Coto GD, Ibáñez A. Protocolo diagnóstico-terapéutico de la sepsis neonatal. *Bol Pediatr*. 2006;46:125-131.
27. Chiesa C, Panero A, Osborn JF, Simonetti AF, Pacifico L. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clin Chem*. 2004;50:279-287.
28. Singh M, Alsaleem M, Gray CP. Neonatal Sepsis. [Updated 2020 Sep 4]. In: Stat Pearls [Internet]. 2020: Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531478/>
29. Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr*. 1988 May;112:761-767.
30. Haak BW, Prescott HC, Wiersinga WJ. Therapeutic potential of the intestinal microbiota in the prevention and treatment of sepsis. *Front Immunol*. 2018;9:1-8.
31. Wan YD, Zhu RX, Wu ZQ, Lyu SY, Zhao LX, et al. Gut microbiota disruption in septic shock patients: a pilot study. *Med Sci Monit*. 2018;24:8639-8646.
32. Sanidad KZ, Zeng MY. Neonatal gut microbiome and immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2020;56:30-37.
33. Kan B, Razzaghian HR, Lavoie PM. An immunological perspective on neonatal sepsis. *Trends Mol Med*. 2016;22:290-302.
34. Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C, Cotter PD. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*. 2012;3:203-220.
35. Guo X, Xia X, Tang R, Zhao H, Wang k. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol*. 2008;47:367-373.

36. Jinatham V, Kullawong N, Chukeatirote E, Kespechara K, Popluechai S. Gut microbiota of Thai volunteer fecal samples by using quantitative PCR. 29th Annual Meeting Thai Soc Biotechnol and Int Conferen. 2014;1:575-580.
37. Yang YW, Chen MK, Yang BY, Huang XJ, Zhang XR, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:6749-6756.
38. Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, et al. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl and Environ Microbiol.* 2001;67:2578-2585.
39. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. Genus and species specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2003;4:61-69.
40. Chumponsuk T, Jaroensuk S, Phengkhot S, Gentekaki E, Popluechai S, et al. Development of genus-specific primers for quantitative PCR analysis of *Streptococcus* in human feces. 29th Annual Meeting Thai Soc Biotechnol and Int Conferen. 2017;1:79-88.
41. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona FS, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Medicine.* 2013;11:1-12.
42. Nakanishi H, Shojo H, Ohmori T, Hara M, Takada A, et al. Identification of feces by detection of *Bacteroides* genes. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7:176-179.
43. Balamurugan R, Janardhan HP, Geoge S, Venkata-Raghava M, Muliylil J, et al. Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46:514-519.
44. Osek J. Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13:308-311.
45. Sun F, Yang S, Chen X. Detection of intestinal pathogenic *Klebsiella pneumoniae* from fecal samples of giant panda by polymerase chain reaction. *J Biotech Res.* 2013;5:10-15.
46. Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, et al. Gut microbial

- colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2012;97:456-462.
47. Turunen J, Tejesvi MV, Paalanne N, Hekkala J, Lindgren O, et al. Presence of distinctive microbiome in the first-pass meconium of newborn infants. *Sci Rep*. 2021;19449. doi: 10.1038/s41598-021-98951-4.
48. Stewart CJ, Embleton ND, Marrs ECL, Smith DP, Fofanova T, et al. Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls. *Microbiome*. 2017;5:75. doi: 10.1186/s40168-017-0295-1.
49. Dornelles LV, Procianoy RS, Roesch LFW, Corso AL, Dobbler PT, et al. Meconium microbiota predicts clinical early-onset neonatal sepsis in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;7:1-9.

ANEXOS

ANEXO 1

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 UMAE HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NÚMERO 4 "LUIS CASTELAZO AYALA"
 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

"Comparación de la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal"

FOLIO:														
ANTECEDENTES PERINATALES														
Edad materna		Escolaridad		Estado civil		AGO:								
SDG al diagnóstico del embarazo		No. de consultas		FUR:		FPP:								
Enfermedades previas al embarazo:														
No. de USG prenatales		Alteraciones ultrasonográficas												
Patologías en el embarazo		Diagnóstico				Tratamiento								
Amenazas de aborto		Si	No	Esquema de esteroide (Madurez pulmonar)		Si	No	¿Cuál?						
Infecciones en la gestación		Dx	Tx			Cultivos								
ANTECEDENTES DEL RECIÉN NACIDO														
Fecha de Nacimiento		Hora de nacimiento		Vía de nacimiento		Parto		Instrumentado						
Sexo	F	M					Apgar							
Capurro		Peso al nacimiento		Talla al nacimiento										
Maniobras de reanimación neonatal			Básicas		Oxígeno a flujo libre		Ventilación a presión positiva		No. ciclos					
			Intubación endotraqueal		Compresiones torácicas		Medicamentos							
Servicio de ingreso				Motivo de ingreso										
SDR	Si	No	Dosis de surfactante		Tiempo de aplicación									
Días de ventilación mecánica		Días de estancia intrahospitalaria												
Complicaciones asociadas en biometría hemática.		Sepsis neonatal		Aislamiento		Ictericia		Tx						
		Sepsis nosocomial												
		Conteo total de leucocitos				Conteo total de PMN				Conteo de PMN inmaduros				
		Relación I/T de PMN				Relación de I/M de PMN								
		Cambios degenerativos en los PMN				Conteo de plaquetas								
						Tratamiento								
ANOTACIONES Y COMENTARIOS														

ANEXO 2.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 UMAE HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NÚMERO 4 "LUIS CASTELAZO AYALA"
 LISTA DE PRIMERS PARA REALIZAR PCR EN TIEMPO REAL
 "DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL RECIÉN NACIDO CON SEPSIS NEONATAL EN COMPARACIÓN
 CON RECIÉN NACIDOS CLÍNICAMENTE SANOS"

Especie	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplificado (pb)
<i>Bacteroidetes</i> ³⁵	Forward	GGA RCA TGT GGT TTA ATT CGA TAG T	126
	Reverse	AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG	
<i>Firmicutes</i> ³⁵	Forward	GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A	126
	Reverse	AGC TGA CGACAACCATGCAC	
<i>Proteobacterias</i> ³⁶	Forward	TCGTCAGCTCGTGTGTGA	122
	Reverse	GGTAAGGGCCATGATG	
<i>Actinobacterias</i> ³⁷	Act664F	TGTAGCGGTGGAATGCGC	277
	Act941R	AATTAAGCCACATGCTCCGCT	
<i>Lactobacillus</i> ³⁸	Lac 1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	340
	Lac 2	ATTCACCGCTACACATG	
<i>Bifidobacterium</i> ³⁹	F-bifido	CGCGTCYGGTGTGAAAG	244
	R-bifido	CCCCACATCCAGCATCCA	
<i>Streptococcus ssp</i> ⁴⁰	G-Streptc-F	CGATACATAGCCGACCTGAGA	395
	G-Streptc-R	CCACTCTCCCCTYYTGAC	
<i>Prevotella</i> ⁴¹	Forward	GGT TCT GAG AGG AAG GTC CCC	121
	Reverse	TCC TGC ACG CTA CTT GGC TG	
<i>Clostridium leptum,</i> <i>C. cluster IV</i> ⁴¹	Forward	GCA CAA GCA GTG GAG T	239
	Reverse	CTT CCT CCG TTT TGT CAA	
<i>Bacteroidesthetaiotaomicron</i> ⁴²	Forward	TAC AAT TGC CAC AGT ACG GAA CA	73
	Reverse	GCT GAC GAA CGA TGA CCA TAG TTA	
<i>Faecalibacteriumprausnitzii</i> ⁴³	Forward	GGA GGA TTG ACC CCT TCA GT	203
	Reverse	CTG GTC CCG AAG AAA CAC AT	
<i>Bifidobacterium longum</i> ⁴³	Forward	CAG TTG ATC GCA TGG TCT T	106
	Reverse	TAC CCG TCG AAG CCA C	
<i>E. coli</i> ⁴⁴	Ec1	CCGATACGCTGCCAATCAGT	884
	Ec2	ACGCAGACCGTAAGGGCCAGAT	
<i>K. pneumoniae</i> ⁴⁵	Forward	TGGCCCGCGCCCAGGGTTCGAAA	368
	Reverse	GATGTCGTCATCGTTGATGCCGAG	

ANEXO 3.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NÚMERO 4 "LUIS CASTELAZO AYALA"
ESPECIFICACIONES DE PCR EN TIEMPO REAL StepOnePlus™, USA



Los sistemas StepOne y StepOnePlus utilizan la reacción en cadena de polimerasa (PCR) de base fluorescente el cual permite:

- Detección cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos mediante análisis en tiempo real.
- Detección cualitativa de objetivos mediante análisis post-PCR.
- Análisis cualitativo del producto de PCR (logrado mediante el análisis de la curva de fusión que se produce después de la PCR).

Características:

- **Colorantes:** VIC™, SYBR™ Green I, ROX™, JOE™, NED, FAM™, TAMRA™
- **Capacidad:** 96 tubos de 0.1 ml, 12 tiras de 8 tubos, 1 placa de 96 pocillos
- **Método de detección:** SYBR, detección de primer-sonda
- **Dimensiones:** 24.6 cm (ancho) x 42.7 cm (profundidad) x 51.2 cm (altura)
- **Sistema óptico:** 4 filtros de emisión, fuente de excitación LED azul, fotodiodo
- **Velocidad máxima de rampa de bloque:** 4,6 °C/s
- **Intervalo de volumen de reacción:** 10-30 µl
- **Velocidad de rampa de la muestra:** Modo rápido: ± 2.2 °C/s, modo estándar: ± 1.6 °C/s.
- **Exactitud de temperatura:** 0.25 °C (de 35 a 95 °C).
- **Intervalo de temperatura (métrico):** 4 a 100 °C.
- **Uniformidad de temperatura:** 0.25 °C (de 35 a 95 °C) de temperatura de visualización/punto de ajuste.
- **Sistema de termociclado:** Sistema basado en Peltier.
- **Peso:** 24 kg.
- **Tipo de pantalla:** LCD Touch Screen
- **Para utilizar con (equipo):** StepOnePlus™

ANEXO 4.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 UMAE HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NÚMERO 4 "LUIS CASTELAZO AYALA"
 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA CADA PRIMER USADOPCR EN TIEMPO REAL
 "DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL RECIÉN NACIDO CON SEPSIS NEONATAL EN COMPARACIÓN
 CON RECIÉN NACIDOS CLÍNICAMENTE SANOS"

Especie	No. ciclos	Activación		Desnaturalizaci		Desnaturalizaci		Alineació		Extensió		Extensió	
		UDG		ón		ón		n		n		n final	
		°C	S	°C	S	°C	S	°C	S	°C	S	°C	S
<i>Bacteroidetes</i> ³⁴	52	50	120	95	60	95	5	60	30	72	60	72	300
<i>Firmicutes</i> ³⁵	52	50	120	95	60	95	5	60	30	72	60	72	300
<i>Proteobacterias</i> ³⁶	40	50	120	95	900	95	5	60	10	72	20	72	300
<i>Actinobacterias</i> ³⁷	40	50	120	95	600	95	15	60	60	72	60	-----	----
<i>Lactobacillus</i> ³⁸	35	50	120	94	120	94	30	61	60	68	420	72	300
<i>Bifidobacterium</i> ³⁹	45	50	120	95	600	94	15	60	60	72	300	-----	----
<i>Streptococcus ssp</i> ⁴⁰	59	50	120	95	180	95	5	69.5	10	72	20	72	600
<i>Prevotella</i> ⁴¹	50	50	120	95	20	95	3	55	30	72	60	72	300
<i>Clostridium leptum,</i> <i>Clostridium cluster</i> <i>IV</i> ⁴²	45	50	120	95	300	95	3	55	30	72	60	72	300
<i>Bacteroidesthetaiot</i> <i>aomicron</i> ⁴³	45	50	120	95	600	95	15	60	60	72	300	-----	----
<i>Faecalibacteriumpra</i> <i>usnitzii</i> ⁴⁴	52	50	120	95	300	95	30	61	30	72	10	72	300
<i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i> ⁴⁵	45	50	120	95	300	95	30	55	20	72	45	72	300
<i>E. coli</i> ⁴⁶	30	50	120	94	300	94	60	55	60	75	120	72	300
<i>K. pneumoniae</i> ⁴⁷	35	50	120	95	300	94	60	55	60	72	60	72	600

ANEXO 5.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (padres o representantes legales de niños o personas con discapacidad)

Nombre del estudio:	Comparación de la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal.
Patrocinador externo (si aplica):	
Lugar y fecha:	UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala", del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
Número de registro institucional:	R-2021-3606-035
Justificación y objetivo del estudio:	JUSTIFICACIÓN: Actualmente, se ha encontrado relación entre la sepsis neonatal y la microbiota intestinal, mediante una disbiosis bacteriana que ocurre en el intestino del recién nacido, disminuyendo géneros bacterianos benéficos como <i>Faecalibacterium</i> , <i>Blautia</i> y <i>Ruminococcus</i> , quienes cumplen una función en la barrera intestinal y la modulación del sistema inmunológico. Por ello es importante conocer y describir la microbiota intestinal de neonatos con sepsis y clínicamente sanos, ya que la diferencia bacteriana entre estas dos poblaciones puede tener un impacto en la salud del recién nacido a corto y largo plazo. OBJETIVO: Comparar la microbiota intestinal en recién nacido sano y que cursen con infección generalizada (sepsis neonatal).
Procedimientos:	1) Se recolectarán datos clínicos del paciente. 2) Se recolectará una muestra de materia fecal fresca y/o el meconio, del pañal dentro de las 48 horas posteriores al nacimiento. 3) Se extraerá el ADN genómico bacteriano a partir de la materia fecal. 4) Se identificará y cuantificará la microbiota intestinal mediante la técnica PCR en tiempo real. 5) Se realizará el análisis estadístico pertinente.
Posibles riesgos y molestias:	En el presente estudio no se requiere obtener otras muestras biológicas que sometan a los pacientes a una intervención; por lo tanto, no hay riesgos ni molestias en la obtención de la materia fecal.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Conocer el tipo de microbiota intestinal del neonato y la posible relación con la salud a corto plazo
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Una vez finalizado el estudio se notificarán los resultados y la interpretación de los mismos.
Participación o retiro:	En cualquier etapa del estudio
Privacidad y confidencialidad:	A los datos personales y la información obtenida se le asignará un folio estructurado específicamente para este estudio (Mbi-21-001), solo el investigador principal conocerá los datos de cada paciente.

Declaración de consentimiento:

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

- No acepto que mi familiar o representado participe en el estudio.
- Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su materia fecal hasta por 01 años tras lo cual se destruirá la misma.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador Responsable: M. en C. M. Dr. Leovigildo Mateos Sánchez

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité Local de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comité.eticainv@imss.gob.mx

Nombre y firma de ambos padres o
tutores o representante legal

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

ANEXO 6.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud **3606**.
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NUM. 4 LUIS CASTELAZO AYALA

Registro COFEPRIS **17 CI 09 010 024**
Registro CONBIOÉTICA **CONBIOETICA 09 CEI 026 2016121**

FECHA **Lunes, 23 de agosto de 2021**

Mtro. Leovigildo Mateos Sánchez

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Comparación de la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal**, que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**:

Número de Registro Institucional

R-2021-3606-035

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

Dr. Oscar Moreno Alvarez
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3606

Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA No.4
“LUIS CASTELAZO AYALA”**

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y NO PLAGIO

Por el presente documento, yo **Luis Fernando Bolaños Aparicio**, alumno de posgrado de la Especialidad en *Neonatología* en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, del IMSS.

Informo que he elaborado el Trabajo de Investigación, tema de tesis denominado “**Comparación de la microbiota intestinal en recién nacido clínicamente sano y con sepsis neonatal**”, y declaro que:

- 1) En este trabajo no existe plagio de ninguna naturaleza y es de carácter original, siendo resultado de mi trabajo personal, el cual no he copiado de otro trabajo de investigación, ni utilizado ideas, fórmulas, ni citas completas “strictu sensu”, así como ilustraciones diversas, obtenidas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa).
- 2) Asimismo, dejo constancia de que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo, por lo que no se ha asumido como propias las ideas vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos como en Internet.
- 3) Asimismo, afirmo que soy responsable de todo su contenido y asumo, como autor, las consecuencias ante cualquier falta, error u omisión de referencias en el documento. Sé que este compromiso de autenticidad y no plagio puede tener connotaciones éticas y legales.

Por ello, en caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a lo dispuesto en la Normatividad que implique al programa.

Luis Fernando Bolaños Aparicio

Ciudad de México, a 16 de febrero de 2022