



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA
MOLECULAR

“Diagnóstico Molecular de Sepsis Neonatal”

T E S I S

Que presenta

MARCELA PACHECO VÁSQUEZ

Para obtener el grado de

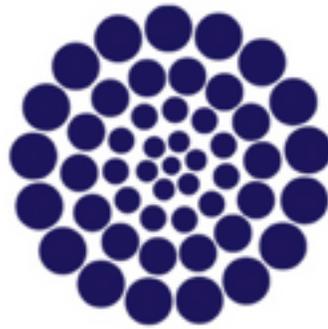
MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA
MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete

Ciudad de México

Agosto, 2019



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

**Programa Nacional de
Posgrados de Calidad, PNPC**

Agradecimiento al Conacyt por el apoyo durante estos años en los que llevé a cabo mi proyecto de Maestría, ya que sin ese aporte no podría haber realizado esta meta. Soy la becaria N° 632396, una de los miles de becarios apoyado por esta institución.

DEDICATORIAS

A mi familia:

Gracias por todo, por haber estado en este camino que recorrí alejada físicamente de ustedes, pero siempre estaban en mi corazón. Nunca acabaré de agradecerles lo mucho que me apoyan y sobre todo que me quieren a pesar de cómo soy. A mis padres, por darme lo mejor de ellos y hacerme sentir especial en sus vidas jaja porque aunque tengo otros tres hermanos, siempre me he sentido la consentida por todos, gracias por haberme dado a esos hermanos juguetones, molestos, amorosos, especiales, los más geniales de este mundo: Kike, Beto y Luisito, a ellos les agradezco todo lo que soy, me han dado la compañía, el amor de hermanos, el echarme porras cuando no creía hacer algo bueno de mí. De verdad gracias, gracias por todo mi querida familia.

A mi otra parte de mi familia, mi tía:

La persona que sin ser su hija me ha tratado y me ha dado todo el amor como si lo fuera y a pesar de que ahora tiene a un ser muy especial con ella, mi primita Karla, de quien ahora soy su hermana, me sigue dando el mismo amor. A mi tía le doy las gracias por darme la parte más dulce del amor, amor sin ser carne de su carne como una madre.

A mis amigos:

A ellos les tengo que dar las gracias por haberme dado la parte más divertida de mi historia, han estado conmigo en cada una de mis etapas y claro otros han aparecido durante este trayecto de la maestría; algunos se han ido para llevar a cabo sus metas, pero nunca han dejado de estar presentes en mi vida y otros me han dado la oportunidad de seguir con ellos en sus nuevos proyectos. Pero sobre todo han estado cuando más los he necesitado sin tener que decir una sola palabra. Ellos son mi otro lado de mi familia.

A una persona especial:

Le quiero y le doy gracias por aparecer en mi vida cuando creía que no tendría oportunidad de conocer a alguien como él algún día. Me ha hecho comprender que no importa si está o no a lo largo de toda la vida que pueda tener, sólo me queda agradecer que ahora esté presente y que pueda disfrutar cada uno de los momentos sin saber si hay un futuro. Sólo él y yo sabemos nuestra historia.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete

Le doy las gracias al Doc por ser el mejor tutor que se puede en el departamento, alguien que no sólo está pendiente de nuestro proyecto sino de nosotros como personas, como alguien que tiene un lugar especial en el laboratorio. No podría haber elegido mejor laboratorio que el suyo. Gracias por haberme dado un espacio.

A mis amigos del laboratorio

Les agradezco haberme dado un lugar en el lab y haberme dado su apoyo en mi proyecto, siempre dando un consejo o un comentario en el momento preciso, ustedes fueron la mejor parte de mi estancia en el laboratorio, son unas personas muy especiales y siempre los voy a recordar, deseo que tengan un futuro brillante y sé que será así. Gracias por darme la oportunidad de conocerlos y por haber pasado momentos muy agradables durante la hora de la comida.

Departamento de Biomedicina Molecular

Tengo que agradecer todo lo que he vivido durante estos dos años al departamento, ya que me dieron la oportunidad de entrar al posgrado, que aunque parecía que no iba a poder llevar a cabo mi maestría creyeron en mí (aunque en realidad no lo sabían), pero gracias por haberme abierto las puertas.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT.....	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. MARCO REFERENCIAL.....	12
4.1 GENERALIDADES DE SEPSIS	12
4.1.1 Sepsis neonatal.....	12
4.1.2 Diagnóstico de sepsis.....	14
4.2 EQUIPOS AUTOMATIZADOS	24
4.2.1 MicroSeq 500	24
4.2.2 Light Cycler Septifast	25
4.2.3 SepsiTtest (Molz ym GmbH).....	25
4.3 GEN 16S RRNA (RRS).....	26
V. ANTECEDENTES	30
VI. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
VII. HIPÓTESIS	33
VIII. OBJETIVOS.....	34
8.1 OBJETIVO GENERAL	34
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
IX. METODOLOGÍA.....	35
9.1 CEPAS BACTERIANAS.....	35
9.2 EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIANO (CULTIVO PURO)	35
9.3 EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIANO EN SANGRE.....	36
9.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA	36
9.5 AMPLIFICACIÓN DE DNA.....	37
9.6 ENSAYO DE HIBRIDACIÓN	37
X. RESULTADOS.....	39
10.1 SONDAS PARA IDENTIFICACIÓN DE LAS PROBABLES BACTERIAS CAUSANTES DE SEPSIS NEONATAL	39
10.2 DNA BACTERIANO E INCORPORACIÓN DE DIG-11-DUTP	41
10.3 ESPECIFICIDAD	42
10.4 SENSIBILIDAD.....	44
XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
XII. CONCLUSIONES	49
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
XIV. ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representación del operón, donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr (16S, 23S y 5S), así como la estructura del ribosoma bacteriano.....	27
Esquema 2. Estructura secundaria del RNAr 16S (Patel, J. 2001).....	28
Esquema 3. Regiones hipervariables dentro del gen 16S rRNA (Bodilis, J. et al., 2012).....	29
Esquema 4. Cebadores empleados en la amplificación de las regiones variables V3-V5 del gen rrs.....	37
Esquema 5. Representación gráfica del ensayo de hibridación para identificar cepas bacterianas.....	38
Esquema 6. Representación gráfica de la evaluación de sensibilidad del método de PCR gen rrs.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento de secuencias de bacterias.....	39
Figura 2. Integridad de DNA bacteriano aislado mediante la técnica de extracción fenol/cloroformo.....	41
Figura 3. Producto de amplificación de las regiones hipervariables V3-V5 de E. coli. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2 y 5, Controles negativos; Carril 3 y 4, producto de PCR; Carril 6 y 7; producto de PCR marcado con DIG-11-dUTP (Flecha negra).....	41
Figura 4. Evaluación de la especificidad de las sondas para la identificación del amplificado marcado del gen rrs de E.coli. La línea punteada indica el punto de corte de detección.....	42
Figura 5. Evaluación de la especificidad de las sondas para la identificación del amplificado marcado del gen rrs de Pseudomonas.....	43
Figura 6. Evaluación de la especificidad de las sondas de Arthrobacter para la identificación del amplificado marcado del gen rrs de Arthrobacter.....	43
Figura 7. Producto de amplificación de diluciones seriadas de cultivo de E. coli. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Control negativo (H ₂ O); Carril 3, Control negativo (Muestra sanguínea con PBS), Carril 4, Dilución 1:10 ¹⁰ , Carril 5, Dilución 1:10 ⁹ , Carril 6, Dilución 1:10 ⁸ , Carril 7, Dilución 1:10 ⁷ , Carril 8, Dilución 1:10 ⁶ , Carril 9, Dilución 1:10 ⁵ , Carril 10, Dilución 1:10 ⁴ , Carril 11, Dilución 1:10 ³ , Carril 12, Dilución 1:10 ² , Carril 13, Dilución 1:10 ¹	45

FIGURA ANEXO 1. Producto de amplificación del gen rrs por extracción por columna. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Control negativo (H₂O), Carril 3, Control negativo (Sangre con PBS), Carril 4, Dilución 1:10⁷, Carril 5, Dilución 1:10⁶, Carril 6, Dilución 1:10⁵ 54

FIGURA ANEXO 2. Producto de amplificación de diluciones seriadas de cultivo de E. coli. Los carriles que se observan fueron: Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Control negativo (H₂O); Carril 3, Dilución 1:10¹⁰, Carril 4, Dilución 1:10⁹, Carril 5, Dilución 1:10⁸, Carril 6, Dilución 1:10⁷, Carril 7, Dilución 1:10⁶, Carril 8, Dilución 1:10⁵, Carril 9, Dilución 1:10⁴, Carril 10, Dilución 1:10³, Carril 11, Dilución 1:10², Carril 12, Dilución 1:10¹, Carril 13, Control positivo (E. coli)..... 54

FIGURA ANEXO 3. Producto de amplificación de 750 pb del gen rrs. Carril 1, Control negativo; Carril 2; Colonia S. agalactiae aislada de paciente; Carril 3, ATCC Streptococcus agalactiae. 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patógenos microbianos asociados a sepsis neonatal (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014). 14

Tabla 2. pediatric Sequential Organ Failure Assessment (pSOFA)..... 16

Tabla 3. Rendimiento diagnóstico de las pruebas para sepsis neonatal. 23

Tabla 4. Secuencias específicas de bacterias para estandarizar el método de identificación de especies bacterianas causantes de la sepsis neonatal. 40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. PCR aplicada en muestras sanguíneas de recién nacidos con diagnóstico de sepsis neonatal (Gómez, H. B., 2009). 31

Gráfica 2. Genotipificación de bacterias en muestras de recién nacidos con diagnóstico clínico de sepsis y recién nacidos sanos (Gómez, H. B., 2009). 32

I. RESUMEN

La sepsis neonatal es una causa importante de morbilidad y mortalidad de recién nacidos, a pesar de que el hemocultivo se considera el “estándar de oro” para llevar a cabo el diagnóstico, su principal desventaja es el tiempo que se requiere para obtener el resultado, es por ello que se han desarrollado alternativas para identificar a la bacteria causante de la sepsis. En ese sentido, hemos desarrollado un método de diagnóstico que se basa en la hibridación de sondas biotiniladas con el producto de amplificación de las regiones variables V3-V5 del gen 16S rRNA. El límite de sensibilidad de este método fue la detección de DNA bacteriano a partir de 50 UFC presentes en una muestra sanguínea de 200 μ l y la hibridación mostró un alto grado de especificidad. Los resultados mostraron que es un método relativamente rápido, ya que permite realizar la identificación bacteriana en aproximadamente 10 horas lo que contribuiría a la selección del tratamiento antibacteriano con base a ello y no solamente a los criterios clínicos.

II. ABSTRACT

Neonatal sepsis is an important cause of morbidity and mortality of newborns, although blood culture is considered the "gold standard" for the diagnosis, its main disadvantage is the time required to obtain the result, that is why alternatives have been developed to identify the bacteria that cause sepsis. In that way, we have developed a diagnostic method that is based on the hybridization of biotinylated probes with the amplification product of the variable regions V3-V5 of the 16S rRNA gene. The sensitivity limit of this method was the detection of bacterial DNA from 50 CFUs present in a 200 μ l blood sample and hybridization showed a high degree of specificity. The results showed that it is a relatively fast method, since it allows bacterial identification in approximately 10 hours, which would contribute to the selection of the antibacterial treatment based on it and not only to the clinical criteria.

III. INTRODUCCIÓN

La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta no regulada del huésped a la infección (Singer M, Deutschman CS, Seymour CW. *et al.*, 2016). La sepsis neonatal afecta a bebés de hasta 28 días de vida y es una causa importante de morbilidad y mortalidad de recién nacidos (Simonsen, K. A. *et al.*, 2014). La incidencia de la sepsis neonatal varía entre las diferentes áreas geográficas (Pérez, R. *et al.*, 2015), aunque se ha estimado que en la población mundial, 2202 neonatos por cada 100 000 nacidos vivos desarrollan sepsis neonatal, con una mortalidad del 11-19% (Fleischmann-Struzek, C. *et al.*, 2018). En México, la sepsis de origen bacteriano que se presenta en los recién nacidos es la segunda causa de muerte y se reporta una incidencia de 4.7 hasta 32.8 eventos por 1000 recién nacidos (Pérez, R. *et al.*, 2015).

Según el momento de la infección, la sepsis neonatal se clasifica en sepsis de aparición temprana y sepsis de aparición tardía, denominada en inglés con las siglas EOS y LOS respectivamente. Esta clasificación ayuda a guiar la terapia con antibióticos ya que implica diferencias en el supuesto modo de transmisión y los organismos predominantes. EOS se define como el inicio de la sepsis en los primeros 3 días de nacido y es principalmente el resultado de la transmisión vertical de bacterias; madres a bebés durante el período intraparto. LOS se define como la infección que ocurre después de 1 semana de vida y se atribuye a la transmisión horizontal de patógenos adquiridos después del nacimiento (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

Los signos y síntomas de la sepsis neonatal incluyen fiebre o hipotermia, dificultad respiratoria que incluye cianosis y apnea, dificultades para comer, letargo o irritabilidad, hipotonía, convulsiones, fontanela abultada, mala perfusión, problemas de sangrado, distensión abdominal, hepatomegalia (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014), dado que el cuadro clínico es muy

general, la sepsis neonatal podría ser indistinguible de otras enfermedades, lo cual hace muy difícil su diagnóstico basado únicamente en la sintomatología. Por lo tanto, el diagnóstico clínico de sepsis neonatal se basa en una combinación de sintomatología y el uso de bio-marcadores que incluyen proteína C reactiva y procalcitonina; citocinas, que incluyen Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Interferón gamma (IFN- γ) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y antígenos de superficie celular, incluida la molécula de adhesión intercelular (ICAM) soluble y CD64. Sin embargo, su uso no ha sido particularmente útil para poder identificar la sepsis neonatal (Simonsen, K. A. *et al.*, 2014).

El aislamiento de bacterias de la sangre se considera el estándar de oro para el diagnóstico de sepsis puesto que la mayoría de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante esta técnica, sin embargo, lleva 24-48 horas obtener los resultados de cultivo (Shah, Birju A. & Padbury, James F., 2014). De hecho, el hemocultivo puede no ser óptimo en el recién nacido dado que el uso profiláctico de antibióticos para el parto con la finalidad de prevenir la infección por estreptococos del grupo B, reduce la probabilidad de un cultivo positivo (Brozanski, B. S, *et al.*, 2006). Por otra parte la cantidad del inóculo es importante para este ensayo, se requieren aproximadamente de 6 ml de sangre para optimizar los resultados y su sensibilidad se ve disminuida por el bajo volumen de sangre usado, por esto es una de las grandes desventajas de usar el “estándar de oro” en el diagnóstico de sepsis neonatal, pues no es factible obtener ese volumen de sangre de un recién nacido (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

A diferencia del hemocultivo, el uso de las técnicas moleculares como la PCR no requiere del aislamiento de un organismo para su detección (Jordan, J. A. & Durso, M. B. , 2000), pero no se descarta la posibilidad de realizar un cultivo breve para hacer más eficiente el ensayo. La PCR se ha utilizado con bastante éxito para identificar una amplia gama de organismos, incluidas bacterias, levaduras, virus y protozoos (Jordan, J. A. & Durso, M. B. , 2000). Para la

identificación bacteriana se ha utilizado la amplificación de la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S ribosomal (rDNA 16S). Este gen está presente en todas las bacterias, consta de 1500 pb y se distinguen 10 regiones conservadas y 9 regiones variables de este gen (V1-V9). El tamaño de este gen proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar entre género y especie de bacterias y establecer medidas estadísticas válidas, aunque la mayor variabilidad del gen se concentra en las primeras 500 bases, correspondiente al extremo 5' (Bou, G. *et al.*, 2011; Abbott, S.L. & Janda, M. J., 2007; Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M., 2004), por ello el uso del rDNA 16S para detectar bacterias en la sangre tiene el potencial para un diagnóstico rápido y preciso de sepsis y permitirá al clínico evitar el uso innecesario de antimicrobianos (Brozanski, B. S. *et al.*, 2006).

IV. MARCO REFERENCIAL

4.1 Generalidades de sepsis

4.1.1 Sepsis neonatal

La sepsis neonatal sigue siendo una complicación temida y grave, especialmente entre los lactantes prematuros de muy bajo peso al nacer. Como se mencionó anteriormente, la sepsis neonatal se ha clasificado en sepsis de aparición temprana (EOS) y sepsis de aparición tardía (LOS) (Camacho-Gonzalez, A., Spearman, P. W., & Stoll, B. J., 2013). Se debe tener en cuenta la escasa cantidad de microorganismos presentes en la sangre durante un episodio de bacteriemia, que suele oscilar entre 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml a 10^4 UFC/ml, incluso se ha reportado que en un 20% de los casos puede ser de 0,1 UFC/ml. Esta característica hace que no sea posible utilizar el examen directo de la sangre mediante tinciones

para el diagnóstico de la bacteriemia y que sólo las técnicas sensibles pueden ser utilizadas en el diagnóstico rápido (Rodríguez, J.C., *et al.*, 2017).

4.1.1.1 Sepsis de aparición temprana (EOS)

La EOS se define como la aparición de sepsis en los primeros 3 días y es principalmente el resultado de la transmisión vertical de las bacterias de las madres a los lactantes durante el período intraparto (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014). *Streptococcus agalactiae* es el principal microorganismo aislado en estas infecciones; sin embargo, en países en vías de desarrollo las bacterias predominantes son enterobacterias; sin que las razones de estas diferencias estén claramente entendidas (Pérez, O.R. *et al.*, 2015). *E. coli* se asocia frecuentemente con infecciones graves y meningitis y es la causa principal de mortalidad relacionada con sepsis entre los bebés con muy bajo peso al nacimiento, sin embargo, existen otras bacterias que también son causantes de EOS [Tabla 1] (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

4.1.1.2 Sepsis de aparición tardía (LOS)

La LOS se define como una infección que se produce después de una semana de vida y se atribuye a la transmisión horizontal de patógenos adquiridos después del parto y a menudo es más insidioso en el inicio. A medida que los bebés crecen, están expuestos a organismos ambientales que pueden ser patógenos. El contacto con el personal del hospital, los miembros de la familia, las fuentes nutricionales y el equipo contaminado representan oportunidades para la exposición a microorganismos causantes de infecciones. La contaminación de las manos es la fuente más común de infecciones posnatales en los bebés ingresados en el hospital. Los bebés prematuros con muy bajo peso al nacer tienen un riesgo particularmente alto de LOS debido en parte a la falta de madurez del sistema inmunitario, la ventilación mecánica y hospitalización prolongada, el uso de catéteres

permanentes, tubos endotraqueales y otros procedimientos invasivos (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

En un estudio se reportó que el 70% de las infecciones de inicio tardío fueron causadas por organismos Gram positivos, con una contabilidad de estafilococos coagulasa negativa para el 48% de las infecciones. Las tasas de mortalidad fueron más altas en los bebés infectados con *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Serratia marcescens* y *E. Coli* [Tabla 1] (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

Tabla 1. Patógenos microbianos asociados a sepsis neonatal (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

Neonatal sepsis	Microbial pathogens
Early-onset	<ul style="list-style-type: none"> • Group B streptococci • <i>Escherichia coli</i> • <i>Streptococcus viridans</i> • Enterococci • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Other gram-negative bacilli
Late-onset	<ul style="list-style-type: none"> • Coagulase-negative Staphylococci • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Candida albicans</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> • Enterococci • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Group B streptococci

4.1.2 Diagnóstico de sepsis

La sepsis no es una enfermedad específica, por ello en la actualidad, se puede identificar por una gran cantidad de signos y síntomas clínicos en los recién nacidos con sospecha de infección, los cuales varían según la edad gestacional y la gravedad de la infección (Simonsen, K. A. et al., 2014). Debido a que no existe una prueba estándar para identificar la sepsis neonatal, la forma de diagnosticarla se basa en una combinación de manifestaciones clínicas; el uso de bio-marcadores así como hemocultivos y métodos moleculares, incluida la PCR (Simonsen, K. A. et al., 2014).

4.1.2.1 Presentación clínica

La identificación clínica de sepsis es difícil, ya que los signos pueden ser muy similares a los de otras enfermedades potencialmente mortales, como la enterocolitis necrotizante, la enfermedad de la membrana hialina y la asfixia perinatal (Edmond, K., & Zaidi, A. , 2010). Algunos síntomas generales pueden ser letargo, hipotermia y mala alimentación, y los signos inespecíficos pueden incluir anuria y acidosis. Los síntomas respiratorios son comunes y pueden incluir apnea, taquipnea, gruñidos, aleteo nasal y retracciones intercostales. Los síntomas cardíacos pueden incluir cianosis, desaturación, bradicardia, perfusión deficiente e hipotensión. Es importante darse cuenta de que los primeros signos de una infección potencialmente mortales son los cambios sutiles en el estado respiratorio de los recién nacidos, la inestabilidad por la temperatura o los problemas de alimentación (Simonsen, K. A. *et al.*, 2014).

Dado que en la práctica clínica se requiere una herramienta diagnóstica que sustituya a los criterios inespecíficos en la identificación del proceso de sepsis, se ha optado por una nueva escala, denominada SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) (Rodríguez, JC. *et al.*, 2017). Este sistema de puntuación evalúa la gravedad de la disfunción orgánica cuantificando las anomalías de acuerdo con los hallazgos clínicos, los datos de laboratorio (PaO₂, recuento de plaquetas, nivel de creatinina y nivel de bilirrubina) o las intervenciones terapéuticas, todo ello para un cálculo completo. Una de las principales limitaciones del puntaje SOFA es que fue desarrollado para pacientes adultos y contiene medidas que varían significativamente con la edad, lo que lo hace inadecuado para niños, por ello se adaptó y validó una versión pediátrica SOFA (pSOFA) [Tabla 2] en el cual el corte óptimo de pSOFA para discriminar la mortalidad fue una puntuación superior a 8 puntos (Matics, T. J. & Sanchez-Pinto, L. N., 2017; Singer M, Deutschman CS, Seymour CW. *et al.*, 2016).

4.1.2.2 Hemocultivo

A pesar de los grandes avances realizados para mejorar la identificación de microorganismos, el hemocultivo sigue siendo el estándar de oro y la herramienta de primera línea para detectar bacteriemia (Lamy, B. *et al.*, 2016). Su fácil realización lo hace asequible a cualquier centro y es el único método que hasta el momento permite el aislamiento del microorganismo viable, necesario para su identificación y para determinar su sensibilidad a los antibióticos. Su utilidad, sin embargo, está muy asociada a que se realice

Tabla 2. *pediatric Sequential Organ Failure Assessment (pSOFA).*

Variables	Score ^a				
	0	1	2	3	4
Respiratory					
Pao ₂ :Fio ₂ ^b or Spo ₂ :Fio ₂ ^c	≥400 ≥292	300-399 264-291	200-299 221-264	100-199 With respiratory support 148-220 With respiratory support	<100 With respiratory support <148 With respiratory support
Coagulation					
Platelet count, ×10 ³ /μL	≥150	100-149	50-99	20-49	<20
Hepatic					
Bilirubin, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular					
MAP by age group or vasoactive infusion, mm Hg or μg/kg/min ^d					
<1 mo	≥46	<46	Dopamine hydrochloride ≤5 or dobutamine hydrochloride (any)	Dopamine hydrochloride >5 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine bitartrate ≤0.1	Dopamine hydrochloride >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine bitartrate >0.1
1-11 mo	≥55	<55			
12-23 mo	≥60	<60			
24-59 mo	≥62	<62			
60-143 mo	≥65	<65			
144-216 mo	≥67	<67			
>216 mo ^e	≥70	<70			
Neurologic					
Glasgow Coma Score ^f	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine by age group, mg/dL					
<1 mo	<0.8	0.8-0.9	1.0-1.1	1.2-1.5	≥1.6
1-11 mo	<0.3	0.3-0.4	0.5-0.7	0.8-1.1	≥1.2
12-23 mo	<0.4	0.4-0.5	0.6-1.0	1.1-1.4	≥1.5
24-59 mo	<0.6	0.6-0.8	0.9-1.5	1.6-2.2	≥2.3
60-143 mo	<0.7	0.7-1.0	1.1-1.7	1.8-2.5	≥2.6
144-216 mo	<1.0	1.0-1.6	1.7-2.8	2.9-4.1	≥4.2

exclusivamente en pacientes con clínica compatible con sepsis porque la extracción en otras circunstancias incrementa el gasto sanitario y no aporta información clínicamente útil. Su valor práctico en el diagnóstico se ve perjudicado por el retraso en la obtención de resultados y porque no es positivo en todos los pacientes, siendo su rendimiento más bajo en pacientes con tratamiento antibiótico o si la infección se produce por hongos, por bacterias de crecimiento lento o por aquellas con requerimientos especiales de crecimiento. Otro factor limitante clave es la elevada proporción de hemocultivos contaminados por microorganismos pertenecientes a la microbiota de la piel; este proceso genera errores diagnósticos, tratamientos inadecuados y ocasiona un elevado gasto económico para el sistema sanitario (Rodríguez, JC. *et al.*, 2017).

La bacteriemia puede ser continua o intermitente y la secuencia es difícil de predecir, por lo que es necesario tomar más de 1 muestra para el cultivo de sangre. En general no hay conciencia sobre la poderosa influencia que tiene el volumen de sangre en la sensibilidad del hemocultivo. No se ha establecido el mejor volumen necesario para el hemocultivo. Se recomienda un volumen de 10 a 20 ml por muestra para pacientes adultos y 30 ml para pacientes febriles inmunocomprometidos y pacientes con endocarditis. Aunque 1 a 5 ml se considera un volumen óptimo para los niños, es posible que volúmenes tan bajos de sangre reduzcan la sensibilidad de los hemocultivos (Solorzano-Santos, F. *et al.*, 1998).

La identificación de organismos patógenos en neonatos con síndrome de sepsis está plagada de dificultades. La carga bacteriana puede ser baja debido a que las madres reciben antibióticos antes del parto o durante el parto y porque a menudo solo se pueden extraer pequeñas cantidades de sangre de los recién nacidos. Las tasas de contaminación también pueden ser muy altas debido a las dificultades técnicas de la venopunción estéril en bebés pequeños. También puede haber una mala interpretación del papel de los

estafilococos coagulasa negativos (por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis*), ya que estos organismos son flora cutánea normal y organismos patógenos en prematuros y bebés con catéteres de vasos sanguíneos permanentes (Edmond, K., & Zaidi, A., 2010).

Los sistemas automatizados de hemocultivo, a pesar de las mejoras en los medios de crecimiento y la instrumentación, los resultados pueden retrasarse hasta 48 horas. La condición de un neonato con sepsis verdadera puede deteriorarse rápidamente, por lo que el enfoque más común es iniciar un tratamiento con antibióticos de amplio espectro en todos los niños pequeños con sospecha de infección bacteriana. Un hemocultivo negativo después de 48 horas puede permitir el cese de la terapia con antibióticos en un bebé sano, pero en general, los frascos se incuban 5 días antes de informarse como negativos. Si bien es prudente, esta práctica conduce a la exposición a antibióticos en un gran número de recién nacidos para los cuales el tratamiento con antibióticos puede ser innecesario, ya que los hemocultivos son positivos en solo 5% a 10% de los casos sospechosos de sepsis, incluso en instalaciones con muchos recursos (Edmond, K., & Zaidi, A., 2010; Lamy, B., 2016).

La confirmación de organismos patógenos permite una terapia de antibióticos mejor diseñada, es por ello que tras la positividad del hemocultivo sigue siendo obligado realizar una tinción de Gram a partir de una alícuota de dicho hemocultivo para confirmar la presencia de bacteria. Los subcultivos se realizan independientemente del resultado del examen del Gram, incluso aunque no se observe ningún microorganismo en la tinción. Independientemente del método de identificación usado, éste siempre debe acompañarse de la realización de un antibiograma directamente de la sangre del hemocultivo positivo para instaurar el tratamiento o las modificaciones necesarias de la terapia empírica ya establecida (Rodríguez, J.C. *et al.*, 2017).

4.1.2.3 Uso de biomarcadores

Debido a la necesidad por encontrar un biomarcador que permita detectar de forma más rápida la presencia de un cuadro infeccioso, se ha investigado la utilidad de un gran número de moléculas que reflejan cambios bioquímicos en el plasma, indicadores de la activación o regulación de los elementos celulares, que pueden conducir a la liberación de una serie de mediadores y moléculas, con los cuales se pueda diferenciar la sepsis de otras etiologías no infecciosas (Rodríguez, JC. *et al.*, 2017).

4.1.2.3.1 CONTEO SANGUÍNEO COMPLETO (CBC)

Al contrario de los niños mayores y los adultos, el recuento de glóbulos blancos no predice con precisión la infección en los neonatos. Se puede utilizar un recuento total de leucocitos de <5000 a $7500/\text{mm}^3$ para inferir el diagnóstico de sepsis neonatal. Muchos recién nacidos infectados pueden tener recuentos más altos. Sin embargo, la sensibilidad de un recuento de leucocitos bajo es del 29%, aunque la especificidad es tan alta como el 91%. Aunque es importante considerar que hay importantes efectos de la edad gestacional en el recuento de leucocitos en el período neonatal (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

4.1.2.3.2 PROTEÍNA C REACTIVA (PCR)

La PCR es un reactante de fase aguda sintetizado por el hígado. Es una de las pruebas de laboratorio más ampliamente estudiadas, más disponibles y más utilizadas como parte de un grupo de pruebas de diagnóstico complementarias para ayudar a determinar si un niño tiene una infección, en lugar de una prueba única (Camacho-Gonzalez, A. *et al.*, 2013).

Tiene una vida media de 24–48 h y tarda de 10 a 12 h para que cambie significativamente después del inicio de la infección (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014). En los recién nacidos, las mediciones en serie de la PCR en las

primeras 24 a 48 horas de síntomas aumentan la sensibilidad de la prueba, con la sugerencia de que los valores normales de PCR durante este período tienen un valor predictivo negativo del 99% para la determinación de la infección. En contraste, los niveles elevados de PCR pueden ser más difíciles de interpretar, especialmente para el diagnóstico de EOS, porque factores como la ruptura prematura de membranas, fiebre materna, hipertensión inducida por el embarazo, uso de esteroides prenatales y sufrimiento fetal también pueden causar elevación de la PCR (Camacho-Gonzalez, A. *et al.*, 2013).

La PCR se puede considerar como un marcador “específico” pero “tardío” de infección neonatal, puede ser útil para monitorear la respuesta al tratamiento en neonatos infectados. Si los niveles de PCR permanecen persistentemente normales, se correlaciona fuertemente con la ausencia de infección, guiando así la interrupción segura de la terapia con antibióticos. (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

4.1.2.3.3 PROCALCITONINA (PCT)

La PCT es un reactivo de fase aguda producido por hepatocitos y macrófagos. Las concentraciones séricas de PCT comienzan a aumentar 4 h después de la exposición a la endotoxina bacteriana, alcanzan su nivel máximo de 6 a 8 h, y permanecen elevadas durante al menos 24 h. La vida media es de aproximadamente 25 a 30 h, y la concentración sérica no se ve afectada por la edad gestacional (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

Existe controversia sobre los puntos de corte más útiles y se postulan valores situados entre 0,5 ng/ml y 10 ng/ml y en función de los mismos, se comunican valores de sensibilidad variables, entre el 75 y el 98%. Diferentes autores han informado valores de sensibilidad y especificidad superiores al 90% si se utiliza el punto de corte de 2 ng/ml, pero la sensibilidad aumenta al 98% si dicho punto de corte se eleva a 10 ng/ml aunque disminuye la especificidad a un 87% (Rodríguez, JC. *et al.*, 2017). La respuesta PCT es más rápida que

la elevación de PCR, por lo que es una alternativa atractiva para la detección de EOS. Debido a que los niveles de PCT siguen siendo altos en comparación con TNF- α e IL-6, la PCT también es útil para predecir la gravedad de la infección, la respuesta al tratamiento y el resultado (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

4.1.2.3.4 CITOCINAS

Los cambios en los niveles sanguíneos de citocinas ocurren rápidamente en el contexto de la sepsis neonatal, incluso antes de los reactivos de fase aguda. Varias citocinas como la interleucina-1 β (IL-1 β), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-8 (IL-8), el receptor soluble de interleucina-2 (SIL2R) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) se ha demostrado que se elevan temprano en respuesta a la infección bacteriana en los recién nacidos. El aumento ocurre antes de que el recién nacido desarrolle signos o síntomas de sepsis e incluso antes de que las pruebas de laboratorio descritas anteriormente se vuelvan positivas. Las citocinas no cruzan la barrera placentaria y se han encontrado elevaciones en la sangre del cordón umbilical, lo que sugiere la posibilidad de predecir a los bebés que desarrollarán sepsis en las primeras horas de su vida. Además, el análisis de citocinas puede ser útil para predecir una infección de inicio tardío, pero ninguna está actualmente en uso clínico de rutina (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

La IL-6 tiene una aparición temprana durante la sepsis y, en función de su corta vida media, puede ser apropiada para controlar la adecuación de la terapia. De hecho, los niveles de IL-6 alcanzan un máximo de 48 h antes del inicio de la sepsis clínica. Se deben tener en cuenta los niveles específicos de la edad al determinar la importancia de los niveles de IL-6 medidos. La cinética de la IL-6 durante las primeras 48 h de vida en los bebés sanos es diferente en los neonatos prematuros en comparación con la cinética en los recién nacidos a término, lo que sugiere un efecto dependiente de la edad

gestacional sobre los valores de IL-6 durante las primeras 48 h de vida. Utilizando un valor de corte de 30 pg/ml, la IL-6 tiene una sensibilidad media del 78% (mediana, 80%) y una especificidad media del 79% (mediana, 78%) para la detección de sepsis neonatal (Simonsen, K. *et al.*, 2014). Por lo tanto, la IL-6 se puede considerar como un marcador precoz y sensible de infección neonatal. La precisión diagnóstica se mejora aún más combinando IL-6 (temprana y sensible) y PCR (tardía y específica) en las primeras 48 h de presunta sepsis clínica (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

La IL-8 se produce predominantemente por monocitos, macrófagos y células endoteliales en respuesta a diversos estímulos, como el lipopolisacárido y el factor de necrosis tumoral (Franz, A. R. *et al.*, 1999). La IL-8 es una citocina proinflamatoria que ayuda en la activación y la quimiotaxis de los neutrófilos; tiene una cinética similar a la IL-6. Esta citocina no solo sirve como marcador para la sepsis, sino que también se asocia con la gravedad de la infección. La combinación de PCR e IL-8 puede reducir el uso excesivo de antibióticos (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

El TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) es un mediador importante de la respuesta del huésped a la infección. Es una parte de los mecanismos de defensa normales del cuerpo, pero puede tener efectos tóxicos cuando se produce en cantidades excesivas. Sus actividades biológicas primarias incluyen la activación, el shock y la muerte de las células endoteliales (Atici, A., Satar, M., Çetiner, S., & Yaman, A., 1997). Las concentraciones de TNF- α demostraron ser significativamente más altas en infectados en comparación con los recién nacidos no infectados en varios estudio, por ello es usado como biomarcador para detección de sepsis neonatal (Shah, Birju A. & Padbury, J. F., 2014).

Tabla 3. Rendimiento diagnóstico de las pruebas para sepsis neonatal.

Prueba diagnóstica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Hemocultivo	92% con volumen recomendado a 69% con volumen bajo	98% con muestreo único a 91% con 3 muestras
CBC	44	92
Proteína C reactiva	70-93	78-94
PCT	75-98	87-90
IL-6	78	79
IL-8	73	81
TNF-α	79	93
PCR	95	98

4.1.2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Las técnicas moleculares han evolucionado en las últimas décadas como una alternativa para el hemocultivo en el diagnóstico de la infección bacteriana del torrente sanguíneo. La mayoría de los diagnósticos moleculares se basan en la detección de ADN bacteriano en la sangre mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y requieren diferentes pruebas de PCR para cada especie bacteriana (Decuypere, S. *et al.*, 2016). La ventaja de estas técnicas, además de la rapidez, es que son de gran ayuda cuando se trata de microorganismos no cultivables o de difícil crecimiento y cuando la toma de muestras se realiza después de instaurado el tratamiento antimicrobiano. Además, algunas permiten ofrecer información sobre la etiología del proceso y aportar información sobre la sensibilidad antibiótica del patógeno implicado mediante la detección de algunos determinantes de resistencia (Rodríguez, J.C.*et al.*, 2017).

Se han desarrollado varios formatos de PCR para la detección paralela de diferentes bacterias en muestras de sangre. La prueba de PCR es más rápida

que el hemocultivo, pero la sensibilidad a menudo está en el mismo rango que el hemocultivo y muestra una baja reproducibilidad. También hay un límite en el número de especies bacterianas que pueden analizarse simultáneamente, ya que los diferentes ensayos múltiplex de PCR son técnicamente desafiantes debido a las diferencias en las eficiencias de amplificación de los diferentes conjuntos de cebadores y el número limitado de marcadores fluorescentes disponibles. (Decuypere, S. *et al.*, 2016). En general, la mayoría de los métodos recomiendan la recolección de sangre periférica en tubos con EDTA, ya que muestras enviadas en tubos con heparina en general inhiben las reacciones de amplificación (Rodríguez, J.C. *et al.*, 2017).

Desde el descubrimiento de la PCR y la secuenciación del ADN, la comparación de las secuencias de genes de las especies bacterianas mostró que el gen 16S rRNA está altamente conservado dentro de una especie y entre especies del mismo género, y por lo tanto puede usarse como el nuevo "estándar de oro para la identificación de bacterias a nivel de especie". Usando este nuevo estándar, se construyen árboles filogenéticos, basados en las diferencias entre especies, y las bacterias se clasifican y se reclasifican en nuevos géneros. Recientemente, se ha informado el uso de esta técnica para la identificación a nivel de especie de cepas bacterianas que han planteado problemas de identificación para diferentes laboratorios de microbiología clínica, así como el impacto clínico de la identificación precisa de dichos aislamientos (Woo, P. C. Y. *et al.*, 2003).

4.2 Equipos automatizados

4.2.1 *MicroSeq 500*

Debido a la inadecuada automatización en los procedimientos de amplificación y secuenciación, el uso de los métodos basados en la secuencia del gen 16S rRNA en laboratorios de microbiología clínica se limita en gran medida a la identificación de cepas que son difíciles de identificar por

métodos fenotípicos. La utilidad del sistema de identificación bacteriana basado en el ADN ribosomal 16S MicroSeq 500 (rDNA), implica la amplificación y secuenciación de los primeros 527 pb, fragmento de los genes 16S rRNA de las cepas bacterianas y análisis de las secuencias utilizando la base de datos del sistema para la identificación de aislados bacterianos clínicamente significativos con perfiles bioquímicos ambiguos, pero la base de datos del sistema de identificación bacteriana basada en el ADNr 16S MicroSeq 500 tiene que ampliarse para abarcar las especies bacterianas raramente encontradas y lograr una mejor precisión en la identificación bacteriana (Woo, P. C. Y. *et al.*, 2003).

4.2.2 *Light Cyclor Septifast*

Es un método basado en la amplificación por PCR a tiempo real de las regiones ITS (*internal transcribed spacer*) del ADN ribosomal de bacterias y hongos. Su fundamento es la combinación de varias PCR tiempo real con sondas FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y detecta la presencia de los patógenos analizando las curvas de melting. Detecta 25 especies de las bacterias más frecuentes causantes de bacteriemia, tanto gram positivas como gram negativas (Rodríguez, JC., *et al.*, 2017).

4.2.3 *SepsiTest (Molzvm GmbH)*

Utiliza iniciadores de amplio espectro frente al gen bacteriano 16S rDNA y al gen fúngico 18S rDNA en un sistema de PCR a tiempo real. En las muestras positivas la identificación se realiza por secuenciación de los amplicones obtenidos. El ensayo incluye reactivos libres de ADN y un método de extracción que degrada el ADN humano en la muestra y el ADN bacteriano libre, con lo que en teoría sólo se detectarían microorganismos viables.

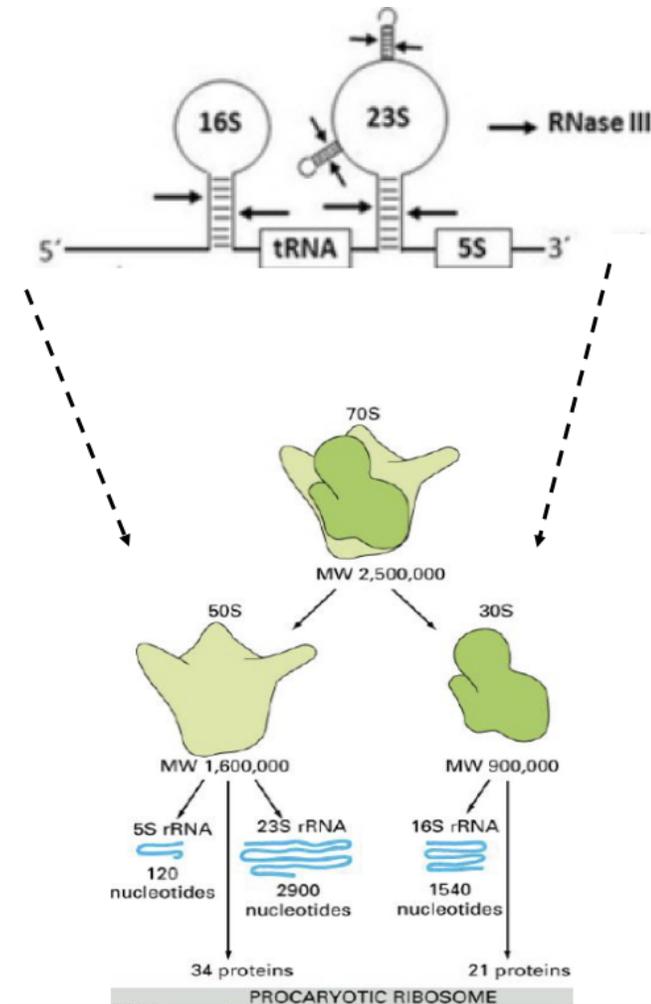
Según el fabricante puede detectar más de 345 especies bacterianas y fúngicas diferentes con una sensibilidad analítica entre 20-460 ufc/ml. Se parte de 1ml de sangre con EDTA y se recomienda realizar la prueba por duplicado.

Recientemente se ha introducido una versión que analiza 10 ml de sangre para aumentar la sensibilidad (Rodríguez, J.C., *et al.*, 2017).

4.3 Gen 16S rRNA (*rrs*)

Durante muchos años, la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S (ARNr) ha servido como una herramienta importante para determinar las relaciones filogenéticas entre las bacterias y, por lo tanto, como un objetivo útil para la identificación clínica (Patel, J. 2001; Bodilis, J. *et al.*, 2012).

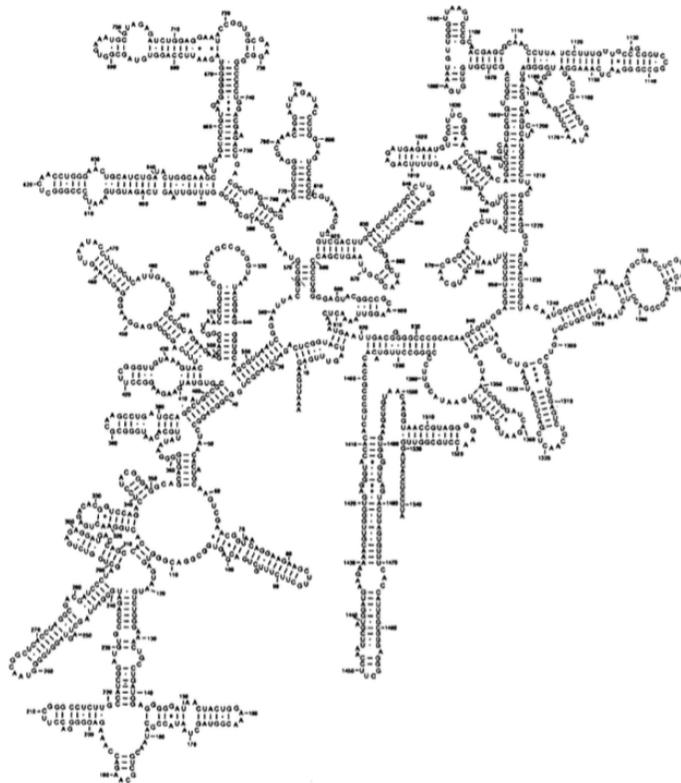
En bacterias, los genes de ARNr 5S (*rrf*), 16S (*rrs*) y 23S (*rrl*) se organizan en un grupo de genes unidos entre sí por regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) que contienen ARNt y regiones adyacentes conservadas. El grupo se expresa como un solo operón, y las moléculas de ARN individuales transcritas se procesan mediante al menos tres ARNasas diferentes en ARNr y ARNt. El número y la ubicación de los operones rRNA (*rrn*) es muy diverso: pueden estar presentes en 1 a 15 copias en genomas procarióticos y más del 80% de los genomas bacterianos secuenciados tienen más de un operón (Espejo, R. T. & Plaza, N., 2018). El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de *small*), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M., 2004). (Esquema 1)



Esquema 1. Representación del operón, donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr (16S, 23S y 5S), así como la estructura del ribosoma bacteriano.

Las secuencias del gen 16S rRNA han sido usadas por varias razones; una de ellas es que este gen está presente en todas las bacterias, por ello se considera el estándar de oro para la determinación de relaciones filogenéticas y diversidades ambientales, porque se conserva universalmente en todos los organismos y se cree que está débilmente afectado por la transferencia horizontal de genes. El número de copias del gen 16S rRNA en un aislado varía mucho entre los géneros; en segundo lugar, la función del rRNA 16S se ha mantenido constante durante un largo periodo por lo que es más probable que los cambios de secuencia reflejen cambios aleatorios que los cambios seleccionados que alterarían la función de la molécula, es decir, la traducción

es un mecanismo complejo y preciso, el cual funciona con una frecuencia de error inferior a un error por cada mil codones traducidos. Los cambios de secuencia aleatorios son una medida más precisa del tiempo. Finalmente, el factor más obvio que hace que una molécula sea una buena medida de la relación filogenética es el tamaño, que equivale aproximadamente al contenido de información; el gen 16S rRNA es lo suficientemente grande (aproximadamente 1.500 pb), pero lo más importante es que la molécula consta de aproximadamente 50 dominios funcionales (Esquema 2) (Watanabe, N. *et al.*, 2018; Janda, J. M. & Abbott, S. L., 2007; Olsen, G. J., & Woese, C. R. 1993; Bodilis, J. *et al.*, 2012).



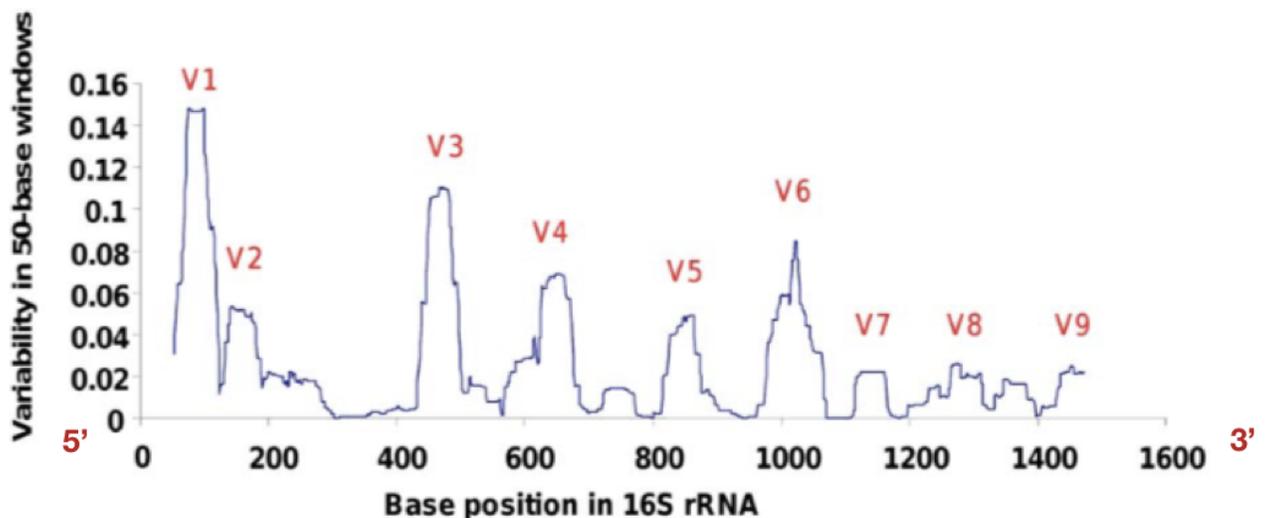
Esquema 2. Estructura secundaria del rRNA 16S (Patel, J. 2001)

El número de dominios es importante porque la introducción de cambios seleccionados en un dominio no afecta mucho a las secuencias en otros dominios. A medida que aumenta el número de dominios, menor es el impacto

que tienen los cambios seleccionados en las relaciones filogenéticas. Estas características se encuentran entre las razones por las cuales Woese se refirió al rRNA como el "cronómetro molecular definitivo" (Patel, J. 2001).

Desafortunadamente, la secuencia del gen 16S rRNA no es una medida perfecta de la divergencia de secuencia global entre bacterias. Las especies con este nivel de relación típicamente tienen una identidad de secuencia del 97% o superior del gen 16S rRNA. Es poco probable que las cepas con menos de 97.5% de identidad de secuencia del gen 16S rRNA estén relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, hay una serie de cepas que comparten una similitud de ADN inferior al 50% por reasociación y, por lo tanto, se clasifican como especies distintas, pero comparten la identidad de la secuencia del gen 16S rRNA del 99% al 100% (Patel, J. 2001).

La secuencia del gen 16S rRNA muestra un patrón alternativo de regiones conservadas e hipervariables (Esquema 3). Dado que las regiones conservadas permiten el diseño de cebadores universales (en la medida de lo posible) para amplificaciones por PCR, las regiones hipervariables aumentan la variabilidad y, por lo tanto, a priori, la resolución de este marcador taxonómico (Bodilis, J. *et al.*, 2012; Valenzuela-Gonzalez, F., 2015)

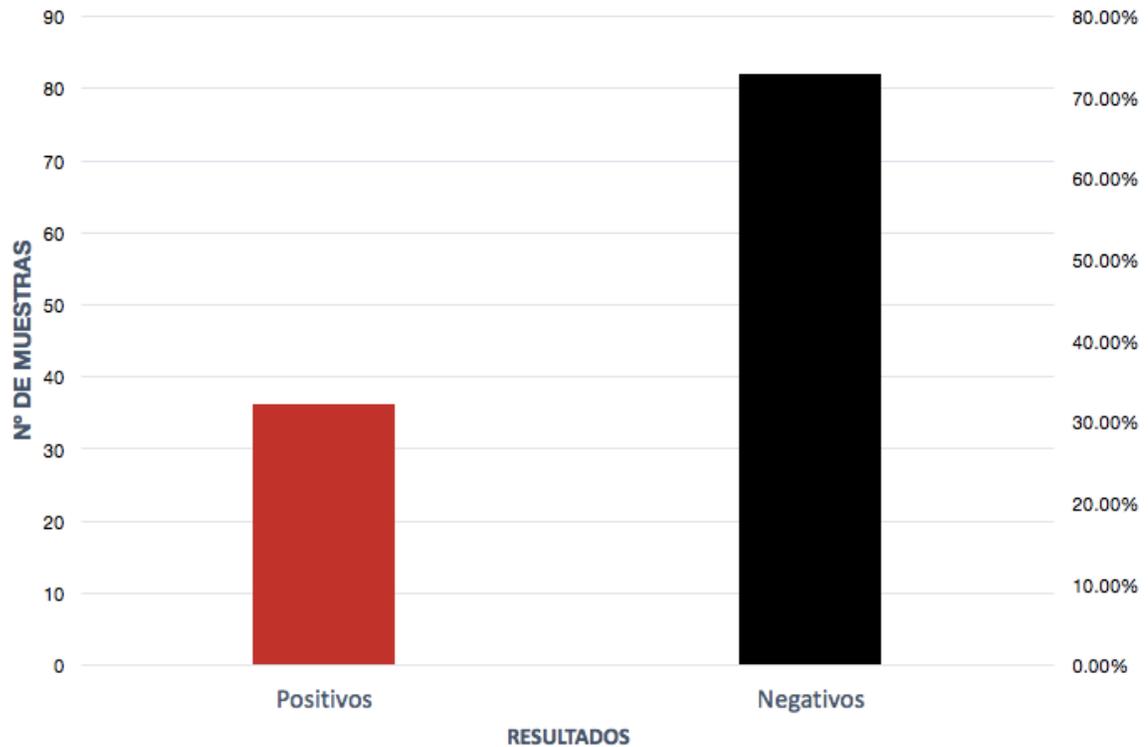


Esquema 3. Regiones hipervariables dentro del gen 16S rRNA (Bodilis, J. *et al.*, 2012).

V. ANTECEDENTES DIRECTOS

La identificación bacteriana basada en la secuencia del rDNA 16S fue implementada en nuestro laboratorio para detectar a las especies bacterianas causantes de la sepsis neonatal en la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional de México (SEDENA) durante el periodo comprendido entre Septiembre del 2007 a Septiembre del 2008. En este estudio se recolectaron muestras de recién nacidos con cuadro clínico de sepsis neonatal y se identificó la presencia de bacteriemia mediante PCR; basados en el mapa del gen *rrs*, el cual tiene un tamaño de 1500 pb, la región universal o conservada entre géneros y especies bacterianos se encuentra hacia el extremo 3' y las 9 regiones variables se encuentran a lo largo de todo el mapa del gen. La región variable más grande se encuentra hacia el extremo 5' (Esquema 5), por lo tanto el diseño de los iniciadores fue planeado para abarcar hasta tres regiones variables (V3-V5) flanqueadas por regiones conservadas; se obtuvo un producto de aproximadamente 700 pb que codifican para el RNA ribosomal 16S, para posteriormente realizar la secuenciación del amplicón. De esta manera se estableció el género y la especie de las posibles bacterias causantes de la sepsis neonatal (Gómez, H. B., 2009).

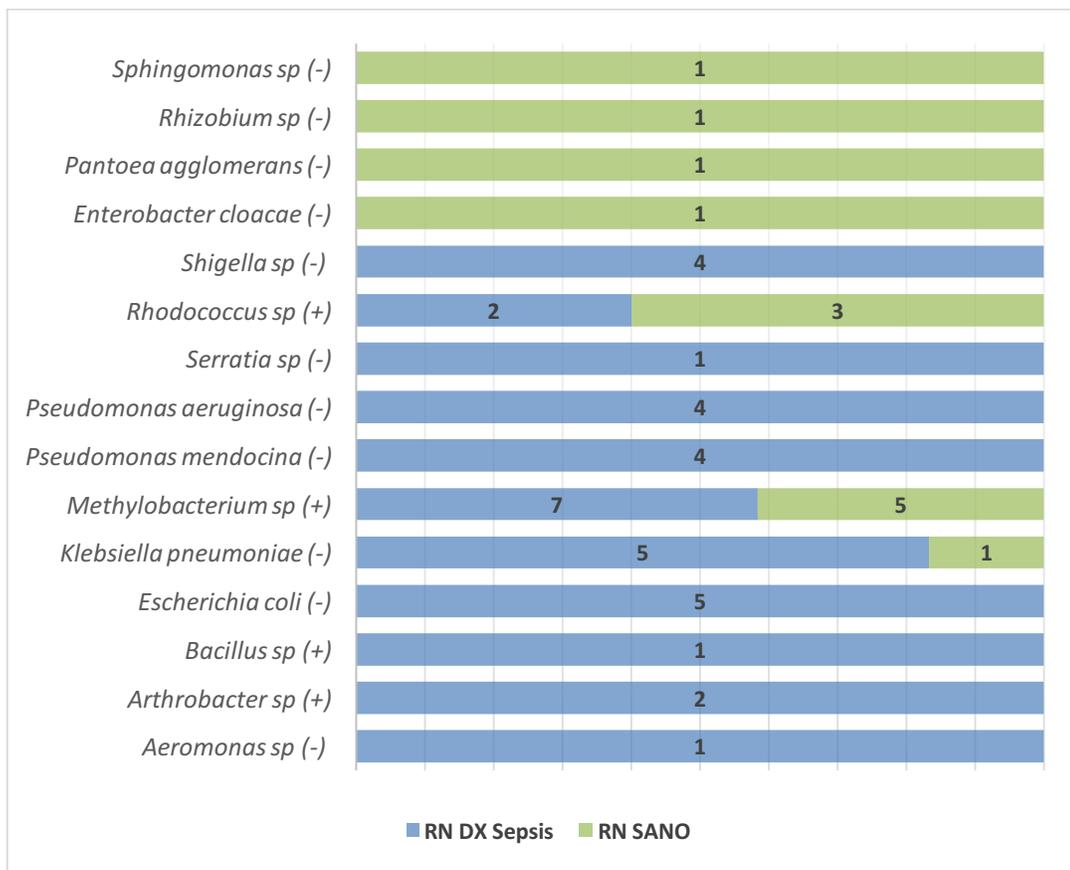
Se analizaron 118 muestras de las cuales 36 (30.5%) resultaron positivas y 82 (69.5%) negativas (Gráfica 1). También se analizó una muestra de 84 recién nacidos sanos, en 13 (15.5%) de ellos se identificó DNA bacteriano.



Gráfica 1. PCR aplicada en muestras sanguíneas de recién nacidos con diagnóstico de sepsis neonatal (Gómez, H. B., 2009).

En la gráfica 2 se observa la frecuencia de las diferentes bacterias que se identificaron como causantes de la sepsis neonatal, mostrando a *Methylobacterium sp.* como la más frecuente, otras también identificadas fueron *Rhodococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella sp.* Algunas otras que no habían sido reportadas previamente en los hemocultivos de los recién nacidos en la Clínica de Especialidades de la Mujer fueron *Arthrobacter sp.* y *Bacillus sp.*, y las menos frecuentes fueron *Serratia sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium sp.* y *Sphingomonas sp.*, *Enterobacter cloacae*.

Mediante esta herramienta de biología molecular se identificaron más y diferentes bacterias que las reportadas por los métodos microbiológicos convencionales, por lo que se demostró que la secuenciación del gen *rrs* que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal es una técnica rápida, sensible y específica para detectar el agente causal en un paciente con cuadro clínico de sepsis (Gómez, H. B., 2009).



Gráfica 2. Genotipificación de bacterias en muestras de recién nacidos con diagnóstico clínico de sepsis y recién nacidos sanos (Gómez, H. B., 2009).

VI. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sepsis neonatal es una causa importante de morbilidad y mortalidad de recién nacidos, para su diagnóstico se han implementado tanto métodos convencionales, biomarcadores, así como técnicas moleculares basados en la amplificación y secuenciación de las regiones variables del gen *rrs*. A pesar de que hay equipos automatizados basados en el uso de técnicas moleculares, la gran limitante de todos ellos es el tiempo que lleva en obtener el resultado. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de implementar un método con alta sensibilidad, especificidad, exactitud predictiva positiva y negativa así como rapidez que sea capaz de detectar la infección en una etapa temprana. Debido a esto el desarrollo de una metodología rápida de amplificación de ácidos nucleicos que permita la detección directa y la identificación de especies de organismos en muestras clínicas ahorraría tiempo, lo que brindaría un tratamiento adecuado para los pacientes con sepsis neonatal evitando el uso innecesario de antibióticos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿sería posible la implementación de un método de identificación bacteriana en neonatos con alta sensibilidad y especificidad que permita un rápido diagnóstico y la aplicación del tratamiento oportuno para la sepsis neonatal?

VII. HIPÓTESIS

La genotipificación bacteriana a través del gen *rrs* podría ser usada para desarrollar un método rápido de identificación específica y directa de las diferentes bacterias causantes de sepsis neonatal.

VIII. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de detección para identificar las especies bacterianas causantes de la sepsis neonatal basado en el empleo de las regiones variables del gen *rrs* que establecen género y especie de las bacterias.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar las sondas que mediante un ensayo de hibridación permitan identificar las regiones variables V3-V5 (específicas de especie) del rDNA 16S
- Evaluar especificidad y sensibilidad del ensayo de hibridación empleando cepas bacterianas identificadas con técnicas usadas en microbiología clínica.
- Evaluar especificidad y sensibilidad del ensayo de hibridación empleando muestras de sangre de recién nacidos con diagnóstico de sepsis neonatal.

IX. METODOLOGÍA

9.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas en este estudio fueron obtenidas de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), identificadas por medio de la tinción de Gram, requerimientos nutricionales y pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, entre otras. Las bacterias fueron: *Arthrobacter nicotianae* [ATCC 15236], *Bacillus subtilis* [ATCC 19659], *Methylobacterium extorquens* [ATCC 8457], *Rhodococcus fascians* [ATCC 35014], *Serratia marcescens* [ATCC 990].

9.2 Extracción de DNA bacteriano (cultivo puro)

La extracción de DNA se obtuvo a partir de un cultivo de 5 ml de 18 horas de crecimiento de la cepa bacteriana de estudio. Se centrifugó a 13000 X g por 5 minutos y desechó todo el sobrenadante. El paquete bacteriano se disolvió en 750 µl de la solución TES (Tris 50mM, EDTA 1mM, SDS 1%), enseguida se agregaron 10 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente se agregaron 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló en el vórtex durante 5 min e incubó a 56°C durante 30 min. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA con 500 µl de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 13000 X g, a 4°C durante 15 minutos (Se repitió la extracción por segunda ocasión). Se recuperó la fase acuosa, y se precipitó el DNA con NaCl 0.2 M más un volumen de isopropanol frío. Posteriormente se mezcló por inversión hasta la aparición de la hebra de DNA. Se centrifugó a 13000 X g durante 10 min y se removió el sobrenadante. Se lavó el DNA con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 13000 X g durante 15 min y se removió el sobrenadante. El DNA precipitado se disolvió en un volumen apropiado de agua inyectable y se almacenó a -20°C hasta su uso (Modificado Sambrook y col., 1994).

9.3 Extracción de DNA bacteriano en sangre

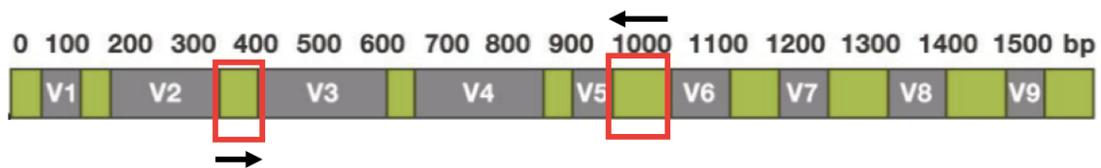
La extracción de DNA a partir de las muestras sanguíneas se realizó transfiriendo 200 µl de la muestra de sangre total (recolectada en tubo con anticoagulante EDTA) a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y las células se resuspendieron en 750 µl de la solución TES (Tris 50mM, EDTA 1mM, SDS 1%). Después, se agregaron 10 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente se agregaron 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló en el vórtex durante 5 min e incubó a 56°C durante 30 min. La extracción de DNA se realizó la extracción con 500 µl de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 13000 X g, a 4°C durante 15 minutos (Se repitió la extracción por segunda ocasión). Se recuperó la fase acuosa, y se precipitó el DNA con NaCl 0.2 M más un volumen de Isopropanol frío. Posteriormente se mezcló por inversión hasta la aparición de la hebra de DNA. Se centrifugó a 13000 X g durante 10 min y se removió el sobrenadante. Se lavó el DNA con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 13000 X g durante 15 min y se removió el sobrenadante. Se disolvió el DNA en un volumen apropiado de agua inyectable y se almacenó a -20°C hasta su uso (Modificado Sambrock y col., 1994).

9.4 Cuantificación de la concentración de DNA

Para cuantificar el DNA extraído, en un espectrofotómetro se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm. Mientras que la relación entre las absorbancias 260/280 y 260/230 proporcionó un estimado para evaluar la pureza del DNA y su integridad se observó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio.

9.5 Amplificación de DNA

La amplificación del gen *rrs* marcado con digoxigenina, se realizó de la siguiente manera, a 100 ng de DNA bacteriano extraído de cultivo, se le adicionaron 24.5 µl de una mezcla de reacción que contenía 2.5 µl de buffer para PCR 10X, (100 mM Tris-HCl [pH8.3], 500 mM KCl), 2.5 µl de MgCl₂ a concentración de 50 mM, 0.5 µl de dTTP a concentración 2.0 mM , 1.8 µl de los iniciadores a concentración de 10 µM y 0.2 µl de DIG-11-dUTP, además se adicionaron 15.16 µl de agua estéril y 0.2 U de taq polimerasa recombinante. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador y se sometió a las siguientes condiciones: Desnaturalización a 96°C por 2:30 min. Seguidos de 45 ciclos de amplificación: Desnaturalización a 94° C 30 seg, alineación a 62°C 30 seg y elongación a 72°C 30 seg y al término de los ciclos se dio una extensión final de 72°C durante 5 min. Como control negativo de la PCR se empleó la misma mezcla de reacción sometida a las mismas condiciones pero sin DNA (Gómez, H. B., 2009). Esquema 4.



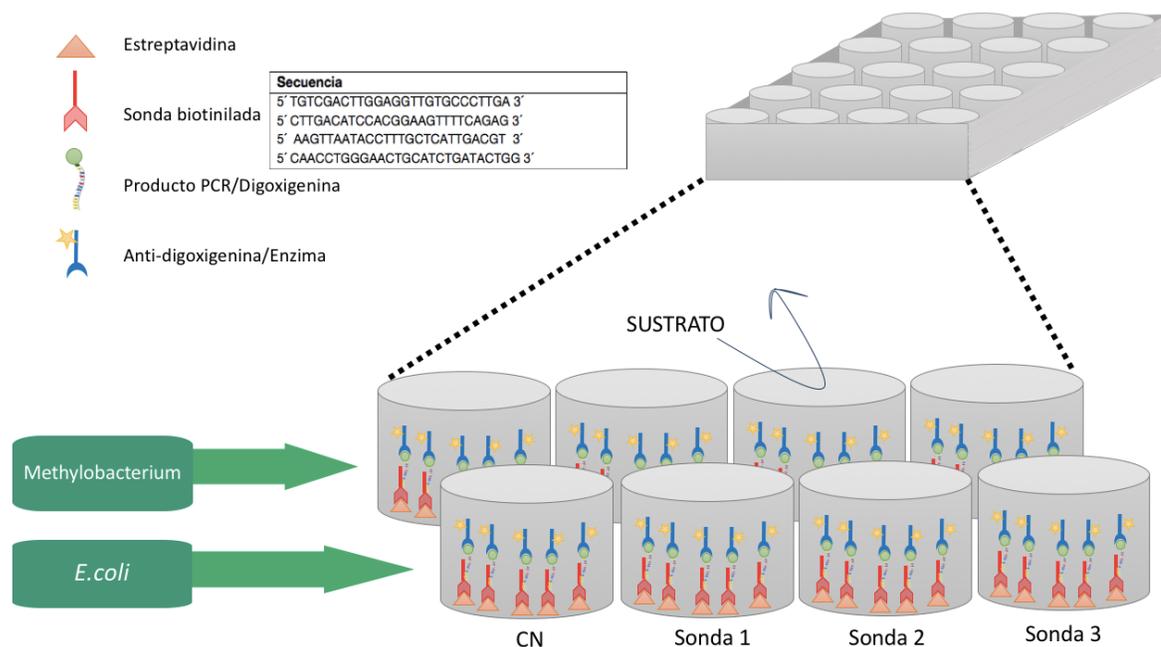
Esquema 4. Cebadores empleados en la amplificación de las regiones variables V3-V5 del gen *rrs*.

9.6 Ensayo de hibridación

El amplicón marcado con DIG-11-dUTP se empleó para hibridar con sondas biotiniladas diseñadas para diferenciar entre *E. coli*, *Klebsiella*, *P. Aeruginosa*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Aeromonas hydrophilia*, *Rhodococcus sp.*, *Methylobacterium extorquens*, *Shigella sp*:

Brevemente, placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina, se incubaron durante 1 hora a 37°C con cada una de las sondas a una concentración de

0,1 ng/ml, después se realizaron cinco lavados con tampón de fosfato 6,7 mM (pH 6,4) que contenía NaCl 130 mM y Tween 20 al 0,1%. Posteriormente se incubaron con solución de pre-hibridación (tampón de fosfato 6,7 mM (pH 6,4) que contenía NaCl 130 mM, Tween 20 al 0,1% y leche 5%) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, 20 µl del producto de amplificación se desnaturalizaron a 98°C durante 10 min, se diluyeron en 200 µl de solución de hibridación (1 SSC [1 SSC es 0.15 M NaCl más 0.015 M citrato de sodio], 2 solución de Denhardt, 1 mM EDTA [pH 8.0], Tris 10 mM [pH 7,5]), y se incubaron en los pocillos durante 1 h a 60 ° C. Después de cinco lavados, se añadió un anticuerpo monoclonal anti-DIG conjugado con peroxidasa de rábano picante (150 mU/ml) y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, después de cinco lavados, se añadió el sustrato cromogénico. La reacción colorimétrica se leyó a 450 nm a los 15 minutos usando un espectrofotómetro (Rossi, Maria C. *et al.*, 2000). Esquema 5.



Esquema 5. Representación gráfica del ensayo de hibridación para identificar cepas bacterianas.

El límite de detección del ensayo de hibridación de PCR, se estimó empleando una serie diluciones de DNA bacteriano. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para evaluar la reproducibilidad. Cada ensayo de hibridación de PCR se realizó con controles positivos y negativos (DNA humano y agua destilada) en condiciones de esterilidad para evitar resultados falsos positivos (Rossi, Maria C. *et al.*, 2000).

X. RESULTADOS

10.1 Sondas para identificación de las probables bacterias causantes de sepsis neonatal

Para el diseño de sondas se realizó un alineamiento de las secuencias de las bacterias que fueron identificadas con mayor frecuencia en las muestras sanguíneas obtenidas de neonatos que cumplieron los criterios clínicos para diagnóstico de sepsis neonatal temprana en la Clínica de Especialidades de la Mujer durante el periodo comprendido entre Septiembre del 2007 a Septiembre del 2008 (Figura 1). A partir del alineamiento, se eligieron 4 sondas de 26-28 pb que corresponden únicamente a cada una de las bacterias (Tabla 4).

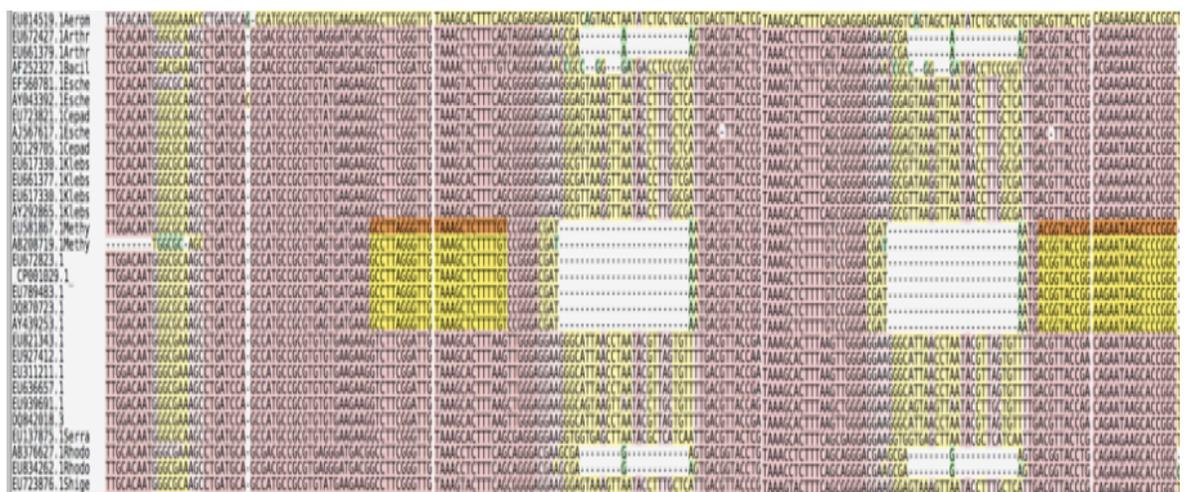


Figura 1. Alineamiento de secuencias de bacterias.

Tabla 4. Secuencias específicas de DNA bacteriano empleadas en el método de hibridación para la identificación de especies bacterianas causantes de la sepsis neonatal.

Sonda	Número	Secuencia	Tm (°C)
<i>E. coli</i>	1	5' TGTCGACTTGGAGTTGTGCCCTTGA 3'	66.4
	2	5' CTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAG 3'	63.2
	3	5' AAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGT 3'	58.5
	4	5' CAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGG 3'	66.5
<i>Klebsiella</i>	1	5' GGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAA 3'	66.4
	2	5' GAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC 3'	64.8
	3	5' GTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAA 3'	64.8
	4	5' GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCA 3'	64.8
<i>P. aeruginosa</i>	1	5' CTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTT 3'	64.8
	2	5' AGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTG 3'	68.0
	3	5' ATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGAT 3'	61.6
	4	5' TTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA 3'	60.1
<i>Arthrobacter sp.</i>	1	5' GTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGA 3'	69.5
	2	5' AGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTG 3'	64.8
	3	5' AACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGA 3'	63.2
	4	5' TGCAGAAGAAGCGCCGGCTAAACTAC 3'	66.4
<i>Bacillus cereus</i>	1	5' GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG 3'	69.5
	2	5' ACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA 3'	61.6
	3	5' TAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCT 3'	64.8
	4	5' ACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG 3'	66.4
<i>Serratia marcescens</i>	1	5' GGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC 3'	60.1
	2	5' GGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCT 3'	63.2
	3	5' TGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAA 3'	63.2
	4	5' TAGCACTGTTCATTGACGTTACTCGC 3'	63.2
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	5' TGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGC 3'	61.6
	2	5' GGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGC 3'	68.0
	3	5' TTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA 3'	60.1
	4	5' ATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCAA 3'	58.5
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	1	5' ACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATG 3'	64.8
	2	5' TCAACCTGGGAATTGCATTTAAAAC 3'	58.5
	3	5' ATGCCTAATACGTATCAACTGTGACG 3'	61.6
	4	5' GGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCG 3'	71.1
<i>Rhodococcus sp.</i>	1	5' CGTGAAAAGTGGGGCTCAACCCCAA 3'	66.4
	2	5' GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA 3'	64.8
	3	5' CGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC 3'	71.1
	4	5' CGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCC 3'	67.4
<i>Methylobacterium extorquens</i>	1	5' ACTGGTTGGCTTGAGACCGGAAGAGG 3'	68.0
	2	5' ACGGTACCGGAAGAATAAGCCCCGCG 3'	69.5
	3	5' GCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGT 3'	61.6
	4	5' CACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCG 3'	72.7
<i>Shigella sp.</i>	1	5' CAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTG 3'	64.8
	2	5' TTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGG 3'	63.2
	3	5' AAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGT 3'	58.5
	4	5' GCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGA 3'	68.0

10.2 DNA bacteriano e incorporación de DIG-11-dUTP

La pureza del DNA se determinó por medio de la relación entre las lecturas de longitud de onda 260/280 nm, estableciéndose dentro de los límites de 1.8-2.0, así como la relación de la longitud 260/230 nm dentro de los límites de 1.5-2.2, establecidos como criterios de alta pureza; además se evaluó la integridad del DNA bacteriano por medio de electroforesis y como se muestra en la Figura 2, se observa una banda de alto peso molecular que indica que el DNA extraído de las diferentes cepas estaba íntegro. En la Figura 3 se observa el producto de amplificación de las regiones variables V3-V5 marcado con digoxigenina; se puede observar un ligero incremento del peso molecular en comparación al producto de amplificación que no contenía digoxigenina.

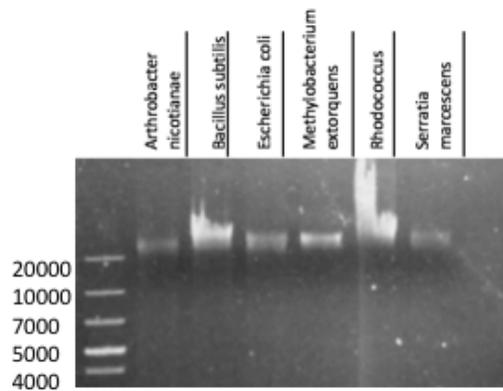


Figura 2. Integridad de DNA bacteriano aislado mediante la técnica de extracción fenol/cloroformo.

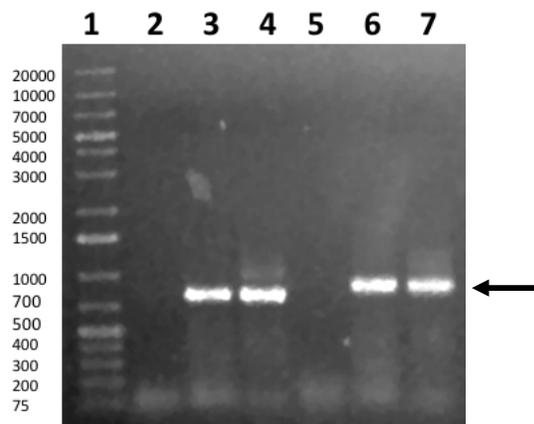


Figura 3. Producto de amplificación de las regiones hipervariables V3-V5 de *E. coli*. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2 y 5, Controles negativos; Carril 3 y 4, producto de PCR; Carril 6 y 7; producto de PCR marcado con DIG-11-dUTP (Flecha negra)

10.3 Especificidad

Las sondas enlistadas en la Tabla 4, fueron probadas para definir su capacidad de identificar específicamente a cada una de las cepas bacterianas. En la figura 4 se observan las absorbancias obtenidas del ensayo de hibridación entre el amplificado del gen *rrs* de *E. coli* con las sondas correspondiente a diversas cepas. Se observa señal positiva con las sondas S1 y S2 de *E. coli* y ninguna hibridación con las sondas de *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* y solamente una baja reactividad con las sondas S2 y S3 de *Pseudomonas*.

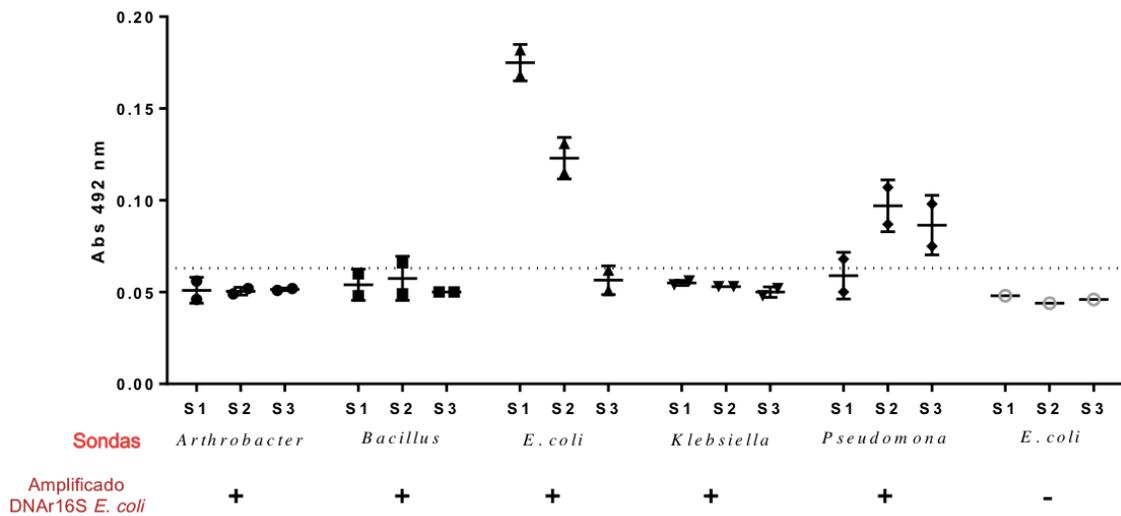


Figura 4. Evaluación de la especificidad de las sondas para la identificación del amplificado marcado del gen *rrs* de *E. coli*. La línea punteada indica el punto de corte de detección.

En la figura 5 se observa el resultado obtenido en el ensayo de hibridación entre el amplificado de *Pseudomonas* con las diversas sondas. Se puede observar la señal positiva con las sondas S1, S2 y S3 de *Pseudomonas* y ninguna hibridación con las sondas de *Bacillus*, *E. coli*, *Klebsiella*. Apenas una baja señal con la sonda S1 de *Arthrobacter*, pero ninguna con las sondas S2 y S3 de esa bacteria.

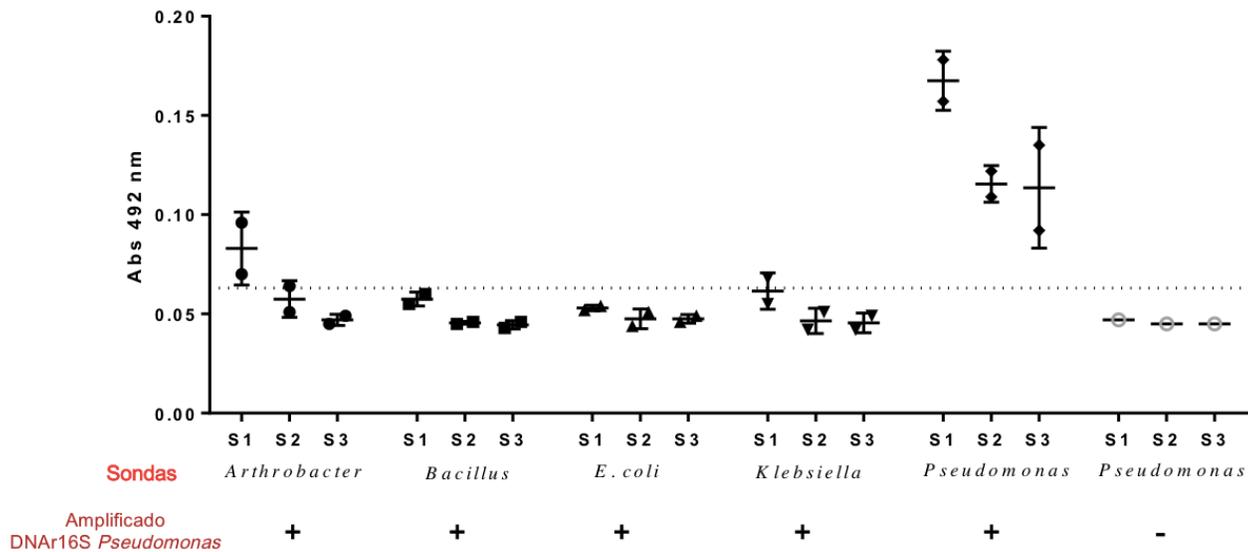


Figura 5. Evaluación de la especificidad de las sondas para la identificación del amplificado marcado del gen rrs de Pseudomonas.

En la figura 6 se muestra el resultado de la hibridación entre los amplificados de *Arthrobacter*, *Rhodococcus* y *Serratia* con las tres sondas de *Arthrobacter* y sus tres sondas específicas (S1, S2, S3) mientras que un resultado de hibridación negativo con los amplificados de las otras dos bacterias.

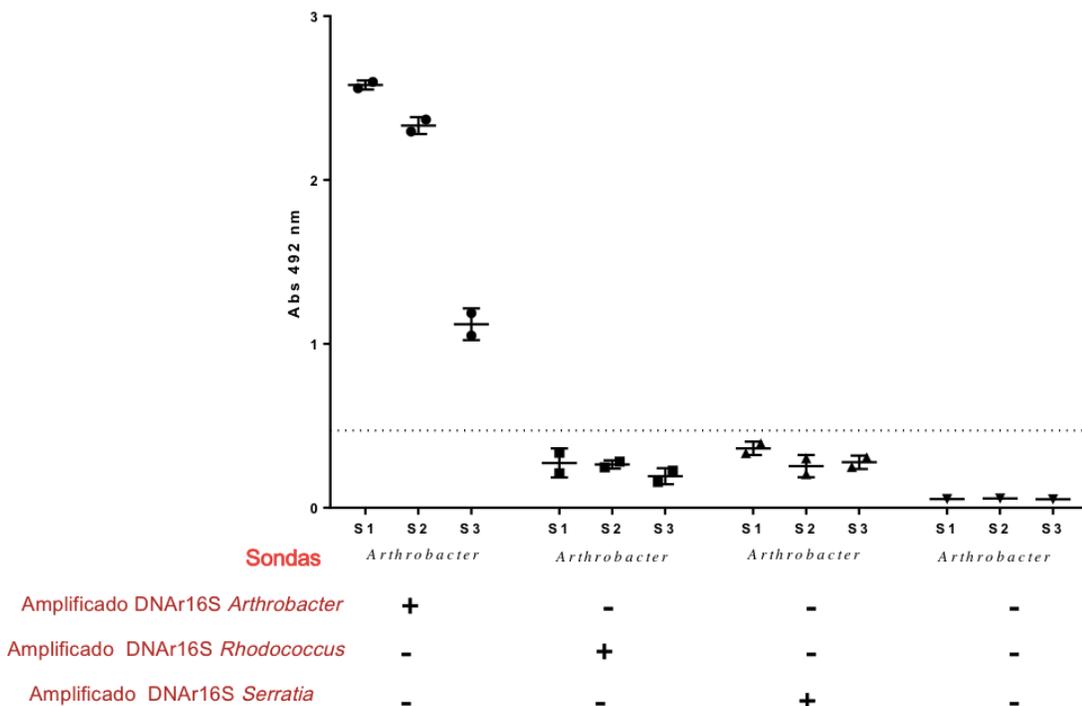
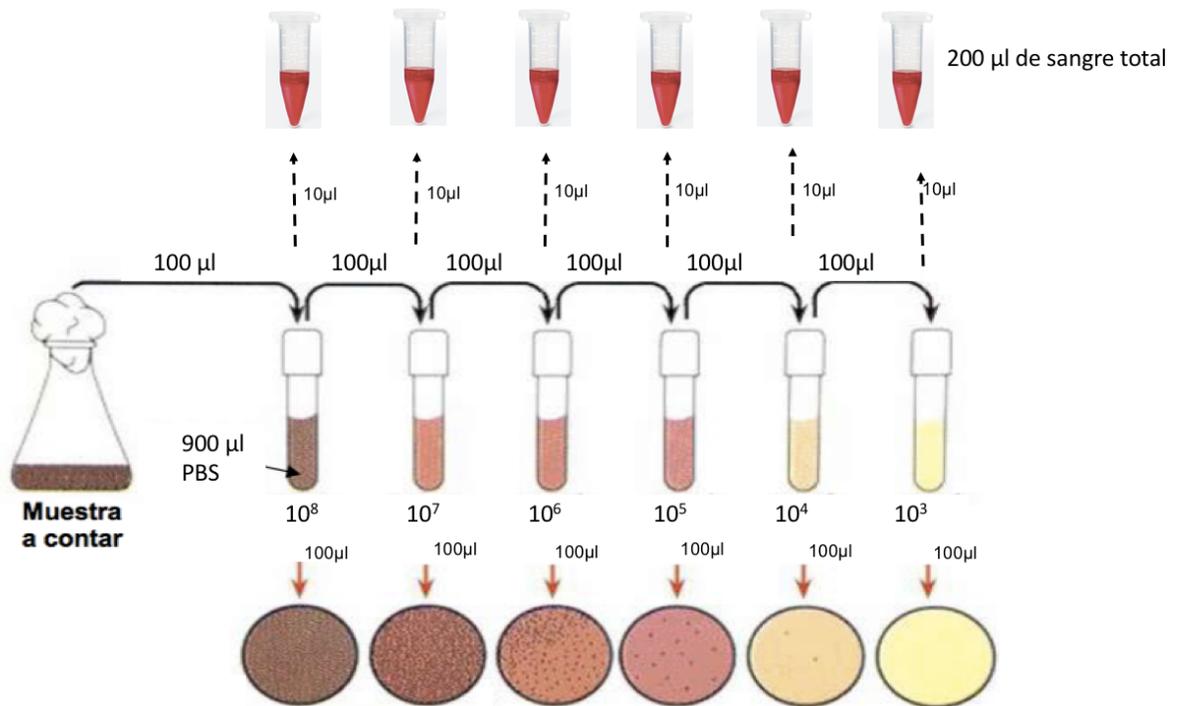


Figura 6. Evaluación de la especificidad de las sondas de *Arthrobacter* para la identificación del amplificado marcado del gen rrs de *Arthrobacter*.

10.4 Sensibilidad

Para determinar la sensibilidad de nuestro ensayo de hibridación, se realizó una serie de diluciones de una concentración conocida de bacterias, las cuales posteriormente se mezclaron con 200 μl de sangre periférica provenientes de un individuo sano. En el esquema 6 se muestra el patrón de las diluciones. En la figura 7 se observa el producto de amplificación esperado de aproximadamente 700 pb a partir de la dilución 1×10^6 , lo que corresponde a 200 UFC/ml.



Esquema 6. Representación gráfica de la evaluación de sensibilidad del método de PCR gen rrs.

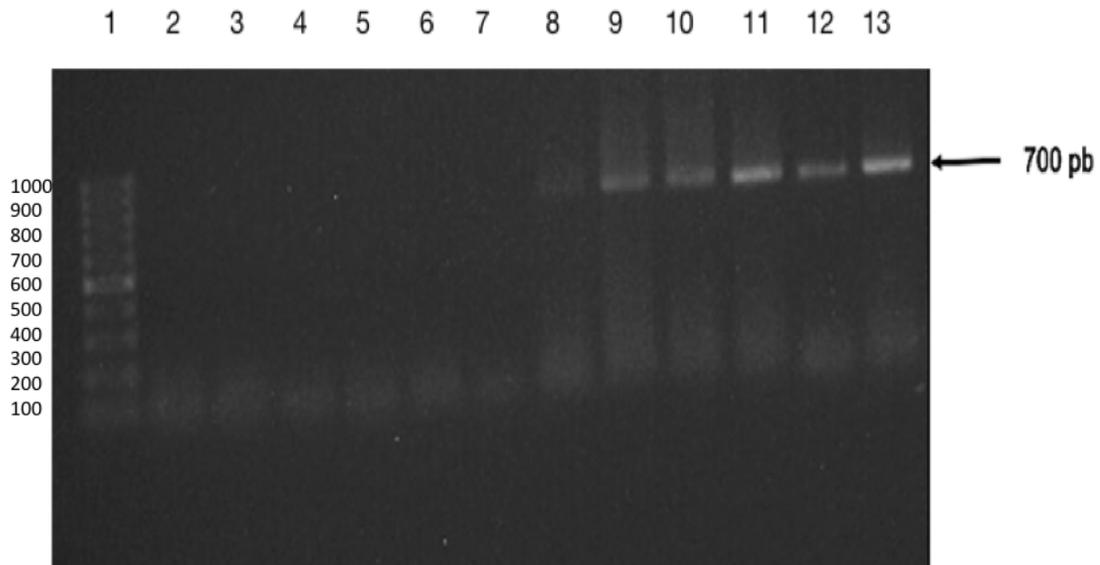


Figura 7. Producto de amplificación de diluciones seriadas de cultivo de *E. coli*. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Control negativo (H_2O); Carril 3, Control negativo (Muestra sanguínea con PBS), Carril 4, Dilución $1:10^{10}$, Carril 5, Dilución $1:10^9$, Carril 6, Dilución $1:10^8$, Carril 7, Dilución $1:10^7$, Carril 8, Dilución $1:10^6$, Carril 9, Dilución $1:10^5$, Carril 10, Dilución $1:10^4$, Carril 11, Dilución $1:10^3$, Carril 12, Dilución $1:10^2$, Carril 13, Dilución $1:10^1$.

XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La identificación del agente patógeno causante de la sepsis neonatal, ya sea de aparición temprana o tardía es muy importante ya que depende de ello un que se aplique un tratamiento adecuado y oportuno al recién nacido.

Como se ha mencionado en la literatura, el diagnóstico de sepsis es complicado, puesto que no sólo depende de las manifestaciones clínicas, las cuales son inespecíficas sino del aislamiento de la bacteria causante de la infección. A pesar de que el hemocultivo sigue siendo el estándar de oro para aislar al agente patógeno, el tiempo para determinar si el resultado es positivo o negativo puede variar, desde horas hasta días, además que se reporta que sólo del 5 al 10% de los hemocultivos son positivos en casos con sospecha de sepsis (Edmond, K., & Zaidi, A., 2010; Lamy, B., 2016) por ello se fueron implementando diferentes técnicas para disminuir el tiempo en el que se puede determinar al agente infeccioso, desde equipos automatizados para

realizar el hemocultivo así como equipos automatizados para realizar PCR y secuenciación de manera conjunta, aunque se han obtenido buenos resultados (Fontanals, D. *et al.*, 1998; Brozanski, B. S. *et al.*, 2006) se siguen buscando otros métodos para la identificación bacteriana, algunos más sofisticados que otros y cada vez más sensibles.

La sensibilidad es esencial en la implementación de un método diagnóstico ya que la cantidad de bacteria que se puede encontrar en torrente sanguíneo de un neonato con sepsis puede ser incluso < 1 UFC/ml (Rodríguez, J. C., Guna, R, Larrosa, N., Arriaza, M. 2017). La cantidad de muestra requerida para “el estándar de oro” es de 1 a 5 ml de sangre de recién nacidos para obtener resultados óptimos, sin embargo, la extracción de dicho volumen de sangre es difícil en muchos pacientes pediátricos debido a su bajo volumen intravascular, especialmente en los recién nacidos de muy bajo peso al nacer. Así, muchos pediatras obtienen solo una muestra de sangre, generalmente de 1 ml o menos, pero el uso de volúmenes pequeños pueden reducir la sensibilidad del método; Solorzano-Santos *et al.* evaluaron la utilidad de un sistema de hemocultivo de volumen modificado para diagnosticar bacteriemia en recién nacidos y bebés, ellos realizaron el micro-hemocultivo con 0.2 ml de muestra, este sistema presentó una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99%, pero aunque se obtuvieron buenos resultados, el tiempo en el que se reportó un micro-hemocultivo positivo fue hasta de 7 días. El método de diagnóstico que hemos desarrollado, tiene las ventajas de que sólo se requieren 0.2 ml de muestra de sangre periférica para extraer el posible DNA bacteriano presente en esa muestra y otra ventaja es que en aproximadamente 10 horas se puede obtener un resultado.

No obstante que este método de hibridación permite la identificación bacteriana, al momento su limitante es la extracción del DNA, el método de fenol/cloroformo que empleó, permitió recuperar DNA a partir de 200 UFC/ml, lo que generaría un resultado falso negativo cuando el paciente presentara un menor número de UFC durante la bacteriemia. En un intento de incrementar

la eficiencia en la extracción de DNA se usó el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit A1125 así como un método de purificación por columna, FavorPrep™ Stool DNA Isolation Mini Kit (Anexo figura 1 y 2), sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados por lo que se decidió continuar trabajando con el protocolo de extracción ya establecido de fenol/cloroformo.

De acuerdo a los datos obtenidos de la Clínica de Especialidades de la Mujer de la SEDENA, la mayoría de las bacterias causantes de sepsis son del género de enterobacterias; en ese estudio no se identificó ningún caso causado por *Streptococcus* del grupo B, el cual se reporta como principal causa de sepsis en países como Estados Unidos (Shah, Birju A. y Padbury, James F. 2014; Camacho-Gonzalez, A., Spearman, P. W., y Stoll, B. J. ,2013). Los resultados reportados por Pérez, O. R. et al. en 2015, coinciden con los de nuestro estudio, ya que también, identificaron a las enterobacterias como los principales agentes bacterianos causantes aislados en sepsis neonatal, sin embargo, se desconoce la razón de la diferencia de distribución geográfica de las especies causantes de sepsis (Ganatra, H. A., Stoll, B. J., y Zaidi, A. K. M., 2010).

Para descartar la posibilidad de una incorrecta elección de los iniciadores para la amplificación de las regiones variables (V3-V5) del gen *rrs* de *Streptococcus* del grupo B, se realizó la amplificación del gen *rrs* de dicha cepa, empleando los cebadores que nosotros diseñamos para amplificar esas regiones variables, el resultado fue positivo, por lo que excluye nula complementariedad de los cebadores para el 16S rRNA de *Streptococcus* y abona en el sentido que ninguno de los pacientes cursaban una sepsis causada por *Streptococcus* del grupo B (Anexo figura 3).

A pesar de que existen otros genes bacterianos con secuencias conservadas que podrían ser usados para la identificación bacteriana, el gen 16S rRNA fue el de elección para llevar a cabo este método debido a sus características: de tamaño, así como de secuencia conservada y aunque a través del tiempo ha sufrido mutaciones, ha permitido llevar a cabo la taxonomía bacteriana tanto

alejada como cercana entre géneros; además cabe resaltar que hoy en día hay una amplia base de datos del gen *rrs* con la cual ha sido posible la identificación de bacterias causantes de infecciones en muestras biológicas por medio de la comparación de sus secuencias, inclusive en aquellos casos donde el empleo del hemocultivo no hubieran logrado el crecimiento bacteriano para su identificación.

Para optimizar el ensayo de hibridación se evaluaron las diferentes condiciones que podrían disminuir la efectividad en la identificación bacteriana, entre las cuales se destaca la temperatura de hibridación; se resalta que la temperatura de alineamiento (T_m) calculada varió desde 58.5°C hasta 72.7°C, el cual podría ser un paso limitante para un mejor rendimiento del ensayo de hibridación, experimentalmente se determinó que 60°C como temperatura de hibridación permitiría los mejores resultados, sin embargo, se observa cierta variabilidad en los datos (figura 4 y 5) tanto de hibridación cruzada como incompleto apareamiento entre la sonda y el amplificado, ello podría deberse a que las regiones variables pueden sufrir mutaciones o incorporación de material por transferencia horizontal (Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L., y Quillet, L. 2012), por ello la sonda no logra un alineamiento del 100% con el producto de amplificación. Por lo tanto, la diferencia para el reconocimiento de especies a menudo se limita a sólo dos emparejamientos de pares de bases (De Beenhouwer, H., Liang, Z., De Rijk, P., Van Eekeren, C. Y Portaels, F. 1995).

Otra de las consideraciones que es importante resaltar es que a pesar de que este ensayo de hibridación permite identificar la bacteriana, no proporciona información acerca de la resistencia o sensibilidad de la bacteria ante diferentes antibióticos, sin embargo, la adaptación de este método a la búsqueda de la presencia de genes relacionados a la resistencia aportaría más datos al diagnóstico.

A pesar de que nuestro ensayo aún no se valida empleando muestras sanguíneas de neonatos con sospecha de sepsis, existen estudios que

sustentan la funcionalidad de nuestro método de identificación, basados ellos en el ensayo de hibridación por PCR, tales como el realizado por Rossi, Maria C., et al para el diagnóstico de tuberculosis a través de la identificación de *M. tuberculosis* and *M. Avium*, en ese caso, el método tiene una especificidad y sensibilidad del 100% de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de muestras de cultivo. De igual manera otro estudio realizado con éxito lo llevó a cabo Beenhouwer, H., et al ellos identificaron siete diferentes especies de *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. genavense* y *M. chelonae*). Por otro lado, Calsamiglia M, et al usaron el ensayo de hibridación para la detección de *Haemophilus parasius*, mostraron que este ensayo es más sensible que la detección del microorganismo por cultivo.

Es fundamental mencionar que la implementación de este ensayo de hibridación a pesar de su especificidad para identificar a un agente bacteriano, no sugiere descartar el uso del hemocultivo para lograr el aislamiento del patógeno y su posterior uso para realizar el antibiograma. Por lo tanto, podría complementar el diagnóstico, así mismo se podría utilizar con fines epidemiológicos.

XII. CONCLUSIONES

Nuestro método de identificación bacteriana basado en la hibridación de sondas específicas y el producto de amplificación de las regiones variables V3-V5 del gen 16S rRNA ofrece la oportunidad de identificar de manera específica las bacterias que probablemente sean la causa de sepsis neonatal. Este método de hibridación permite dar un diagnóstico temprano y consecuentemente contribuye para la elección de un tratamiento adecuado, aspecto de vital importancia ya que hoy en día la resistencia a antibióticos se debe a su uso indiscriminado.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, Sharon L. y Janda, Michael J. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9), 2761- 2764.
doi:10.1128/JCM.01228-07
- Atici, A., Satar, M., Çetiner, S., & Yaman, A. (1997). Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha in Neonatal Sepsis. *American Journal of Perinatology*, 14(07), 401-404.
doi:10.1055/s-2007-994168
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J.A y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (8), 601-608.
doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L., y Quillet, L. (2012). Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the 16S rRNA Gene in *Pseudomonas*. *PLoS ONE*, 7(4), e35647, 1-14
doi:10.1371/journal.pone.0035647
- Brozanski, B. S., Jones, J. G., Krohn, M. J y Jordan, J. A. (2006). Use of polymerase chain reaction as a diagnostic tool for neonatal sepsis can result in a decrease in use of antibiotics and total neonatal intensive care unit length of stay. *Journal of Perinatology*, 26, 688-692.
doi:10.1038/sj.jp.7211597
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., Solano, G., & Rapp-Gabrielson, V. (1999). *Development of an Oligonucleotide-Specific Capture Plate Hybridization Assay for Detection of Haemophilus Parasuis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(2), 140-145.
doi:10.1177/104063879901100206
- Camacho-Gonzalez, A., Spearman, P. W., y Stoll, B. J. (2013). Neonatal Infectious Diseases. *Pediatric Clinics of North America*, 60(2), 367-389.
doi:10.1016/j.pcl.2012.12.003
- De Beenhouwer, H., Liang, Z., De Rijk, P., Van Eekeren, C. Y Portaels, F. (1995). Detection and Identification of Mycobacteria by DNA Amplification and Oligonucleotide-specific Capture Plate Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (11), 2994-2998

- Decuypere, S., Meehan, C. J., Van Puyvelde, S., De Block, T., Maltha, J., Palpouguini, L., Tahita, M., Tinto, H., Jacobs, J., y Deborggraeve, S. (2016). Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S Metagenomics Approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), 1-12 doi:10.1371/journal.pntd.0004470
- Del Rosario Rodicio, M., y del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. doi:10.1016/s0213-005x(04)73073-6
- Edmond, K., y Zaidi, A. (2010). New Approaches to Preventing, Diagnosing, and Treating Neonatal Sepsis. *PLoS Medicine*, 7(3), e1000213. 1-8 doi:10.1371/journal.pmed.1000213
- Espejo, R. T., y Plaza, N. (2018). Multiple Ribosomal RNA Operons in Bacteria; Their Concerted Evolution and Potential Consequences on the Rate of Evolution of Their 16S rRNA. *Frontiers in Microbiology*, 9. Article 1232, 1-6. doi:10.3389/fmicb.2018.01232
- Fleischmann-Struzek, Goldfarb, D., Schlattmann, P., Schlapbach, L., Reinhart, K. y Kisoorn, N. (2018). The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *The Lancet Respir Med*, 6, 223-230. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8.
- Fontanals, D., Sanfeliu, I., Pons, I., Mariscal, D. y Torra, M. (1998). Evaluation of the BacT/Alert and VITAL blood culture systems for the diagnosis of bacteremia. *Clinical Microbiology and Infection*, 4(2), 88-93. doi:10.1111/j.1469-0691.1998.tb00361.x
- Ganatra, H. A., Stoll, B. J., y Zaidi, A. K. M. (2010). International Perspective on Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clinics in Perinatology*, 37(2), 501-523. doi:10.1016/j.clp.2010.02.004
- Gómez, H. B. (2009). Identificación de especies bacterianas comunes y poco comunes en la sepsis de inicio temprano mediante el análisis de tres regiones variables del gen de la bacteria rRNA 16S (Tesis de Maestría). *Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Biomedicina Molecular*.

- Jordan, J.A. y Durso, M.B. (2000). Comparison of 16S rRNA Gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), 2574-2578.
- Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J and Tattevin P (2016) How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Frontiers in Microbiology*. 7, Article 697, 1-13
doi: 10.3389/fmicb.2016.00697
- Matics, T. J., y Sanchez-Pinto, L. N. (2017). Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Children. *JAMA Pediatrics*, 171(10), 1-9.
doi:10.1001/jamapediatrics.2017.2352
- Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB Journal*, 7(1), 113–123.
doi:10.1096/fasebj.7.1.8422957
- Patel, J. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4), 313–321.
doi:10.1054/modi.2001.29158
- Pérez, O. R., Lona, J. C., Quiles, M., Verdugo, M. Á., Ascencio, E. P., y Benítez, E. A. (2015). Sepsis neonatal temprana, incidencia y factores de riesgo asociados en un hospital público del occidente de México. *Revista Chilena de Infectología*, 32(4), 447-452.
doi:10.4067/s0716-10182015000500003
- Rodríguez, J. C., Guna, R, Larrosa, N., Arriaza, M. (2017). Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. 1-66.
- Rossi, Maria C., Gori, A., Zehender, G., Marchetti, G., Ferrario, G., Maddalena, C., Catozzi, L., Bandera, A., Esposti, A. y Franzetti, F. (2000). A PCR-Colorimetric Microwell Plate Hybridization Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* from Culture Samples and Ziehl-Neelsen-Positive Smears. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (5), 1772-1776.

- Shah, Birju A. y Padbury, James F. (2014). Neonatal sepsis. An old problem with new insights. *Virulence*, 5 (1), 170-178.
doi: 10.4161/viru.26906
- Shane, A. L., Sánchez, P. J. y Stoll, B. J. (2017). Neonatal sepsis. *The Lancet*, 390, 1770-1780.
doi:10.1016/s0140-6736(17)31002-4
- Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F. y Davies, H. D. (2014). Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (1), 21-47.
doi:10.1128/cmr.00031-13
- Singer, M., Deutschman, C.S., Warren C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J-D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R. S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L. y Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA Clinical Review & Education*, 315(8), 801–810.
doi:10.1001/jama.2016.0287
- Solorzano-Santos, F., Miranda-Novales, M. G., Leanos-Miranda, B., Diaz-Ponce, H., Palacios-Saucedo, G. (1998) A Blood Micro-Culture System for the Diagnosis of Bacteremia in Pediatric Patients, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30(5), 481-483. doi:10.1080/00365549850161485
- Valenzuela-Gonzalez, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313.
doi:10.7773/cm.v41i4.2492
- Woo, P. C. Y., Ng, K. H. L., Lau, S. K. P., Yip, K. -t., Fung, A. M. Y., Leung, K. -w., Tam D. M. W., Que T. -I. Y Yuen, K. -y. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 1996–2001.
doi:10.1128/jcm.41.5.1996-2001.2003

XIV. ANEXOS

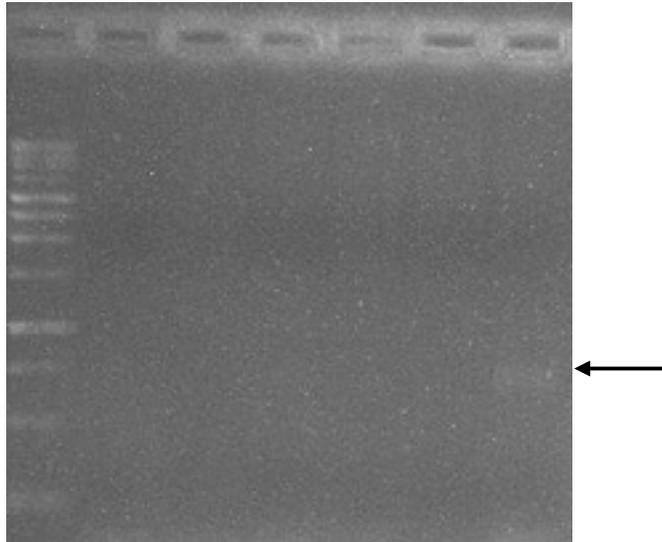


FIGURA ANEXO 1. Producto de amplificación del gen *rrs* por extracción por columna. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Control negativo (H_2O), Carril 3, Control negativo (Sangre con PBS), Carril 4, Dilución $1:10^7$, Carril 5, Dilución $1:10^6$, Carril 6, Dilución $1:10^5$

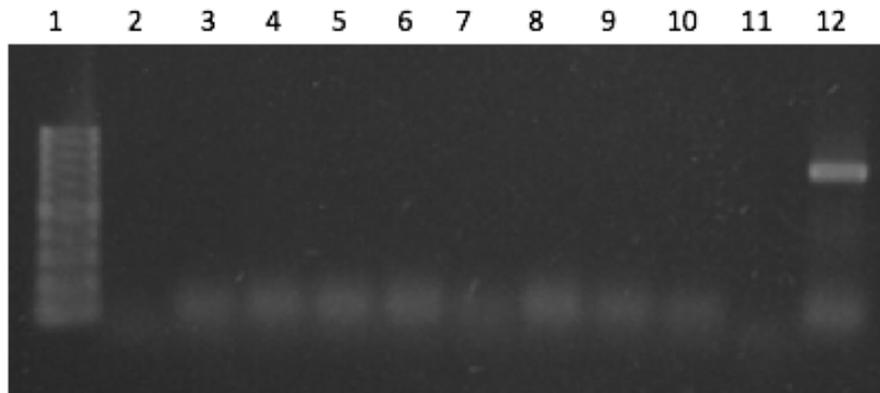


FIGURA ANEXO 2. Producto de amplificación de diluciones seriadas de cultivo de *E. coli*. Los carriles que se observan fueron: Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Control negativo (H_2O); Carril 3, Dilución $1:10^{10}$, Carril 4, Dilución $1:10^9$, Carril 5, Dilución $1:10^8$, Carril 6, Dilución $1:10^7$, Carril 7, Dilución $1:10^6$, Carril 8, Dilución $1:10^5$, Carril 9, Dilución $1:10^4$, Carril 10, Dilución $1:10^3$, Carril 11, Dilución $1:10^2$, Carril 12, Dilución $1:10^1$, Carril 13, Control positivo (*E. coli*)

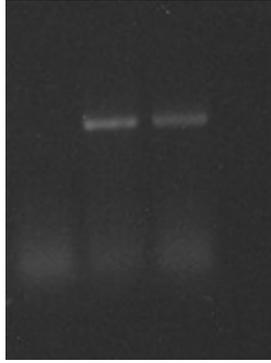


FIGURA ANEXO 3. *Producto de amplificación de 750 pb del gen rrs. Carril 1, Control negativo; Carril 2; Colonia S. agalactiae aislada de paciente; Carril 3, ATCC Streptococcus agalactiae.*