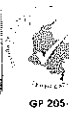




GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO



CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 5

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN PACIENTES CON SIGNOS Y SINTOMAS CLINICO DE SEPSIS NEONATAL TEMPRANA MEDIANTE HEMOCULTIVO Y PCR TIEMPO REAL EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Pinto Rubio	Jorge Enrique
Muñoz Mendez	Wilson Arturo

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Fonseca Becerra	Carlos Eduardo
Ostos Alfonso	Henry

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
----------------------------	--------------------------

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: ESPECIALISTA EN PEDIATRIA

FACULTAD: CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA O POSGRADO: PEDIATRIA

CIUDAD: NEIVA

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2016

NÚMERO DE PÁGINAS:70

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas X_ Fotografías X__ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general_ X_ Grabados___ Láminas___
Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros___

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: Ninguno

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. <u>SEPSIS</u>	<u>SEPSIS</u>	6. _____	_____
2. <u>NEONATAL</u>	<u>NEONATAL</u>	7. _____	_____
3. REACCION EN CADENA POLIMERASA	POLYMERASE CHAIN REACTION	8. _____	_____
4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	9. _____	_____
5. <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

La sepsis neonatal es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de infección sistémica que se confirma al aislar un microorganismo . Se clasifica en sepsis temprana cuando ocurre en las primeras 72 horas de vida, y refleja transmisión vertical mientras que la sepsis neonatal tardía se presenta después de 72 horas de vida y refleja transmisión horizontal .

La prueba de diagnóstico estándar (hemocultivo) para la sospecha de sepsis neonatal tiene limitaciones de sensibilidad y especificidad, y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es una nueva herramienta de diagnóstico de la sepsis neonatal temprana.

Objetivos: Identificar *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en pacientes con signos y síntomas clínico



de sepsis neonatal temprana mediante hemocultivo y PCR en tiempo real en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

Métodos: Previo consentimiento informado se colectaran muestras de sangre con diagnóstico de sepsis neonatal.

Resultados: De 55 neonatos con diagnóstico de sepsis temprana se halló que la mitad de los neonatos pesaban entre 1500 y 2500 gramos al nacer. Se encontró que tan solo 2 hemocultivos (3.64%) fueron positivos para gérmenes diferentes a estreptococo del grupo B (SGB); sin embargo, en las pruebas moleculares, el 36.36% de los neonatos fueron positivos para SGB con RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

En conclusión en nuestra institución los hemocultivos tienen baja sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana en comparación con la RT-PCR para Streptococcus agalactiae.

**ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)**

Neonatal sepsis is a clinical syndrome characterized by signs and systemic infection symptoms which is confirmed when a microorganism is isolated. It's classified as early sepsis when it happens in the first 72 hours of life, and it reflects vertical transmission whereas late neonatal sepsis is presented after 72 hours of life and reflects horizontal transmission.

The standard diagnosis test (hemoculture) for suspected neonatal sepsis has limitations of sensitivity and specificity, and the reaction in an open chain of the polymerase in real time (RT-PCR) is a new diagnosis tool for early neonatal sepsis.

Purpose: To identify streptococcus agalactiae and E.coli in patients with signs and clinic symptoms of early neonatal sepsis through hemoculture and real time PCR in the University Hospital Hernando Moncaleano Perdomo of Neiva.

Methods: With previous consent report blood samples with diagnosis of neonatal sepsis will be collected.

Results: Of 55 neonates with a diagnosis of early neonatal sepsis, half of them weighing between 1500 and 2500g at birth. It was found that only 2 hemoculture test (3,64%) were positives for different germs to streptococcus of group B (SGB); however in molecule test, the 36,36 % of the neonates were positive for SGB with RT-PCR (Real Time Reaction in chain of the polymerase).

In conclusion, in our institution the hemoculture test have low sensitivity and specificity for the diagnosis of early neonatal sepsis compared with the RT-RCP for streptococcus agalactiae.



CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

5 de 5

[Empty box for description of the thesis or degree work]

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: HENRY BARRETO (neonatologo)

Firma:

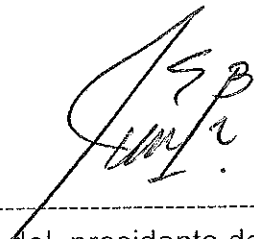
Nombre Jurado: JORGE EDUARDO MANRIQUE (pediatra UCIN)

Firma:

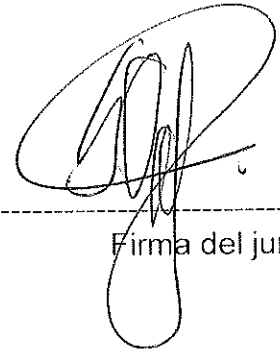
Nombre Jurado: SANDRA ORTIZ (pediatra UCIN)

Firma:

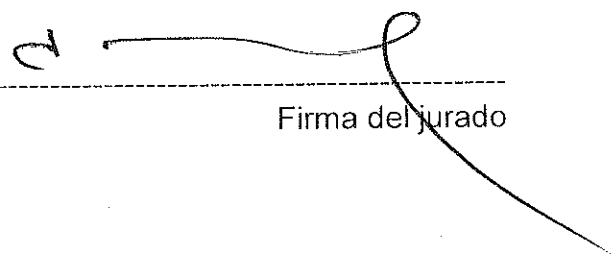
Nota de aceptación:



Firma del presidente del jurado



Firma del jurado



Firma del jurado

Neiva, Febrero del 2016.

GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS							
CARTA DE AUTORIZACIÓN							
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 2

Neiva, febrero 15 del 2016

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

_____**JORGE ENRIQUE PINTO RUBIO**_____, con C.C. No. 75090276 de manizales _____,

_____**WILSON ARTURO MUÑOZ MENDEZ**_____, con C.C. No. 83224571 de tereuel _____,
_____, con C.C. No. _____,
_____, con C.C. No. _____,

autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o _____

titulado IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN PACIENTES CON SIGNOS Y SINTOMAS CLINICO DE SEPSIS NEONATAL TEMPRANA MEDIANTE HEMOCULTIVO Y PCR TIEMPO REAL EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA.





presentado y aprobado en el año 2016 como requisito para optar al título de

ESPECIALISTA EN PEDIATRIA_____;

autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

Ⓞ Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.

• Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS				  		
	CARTA DE AUTORIZACIÓN						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 2

• Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993 "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE: *Jorge Enrique Pinto*
 Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE: *Wilson Arturo Muñoz Méndez*
 Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:
 Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:
 Firma: _____

Neiva 12 de Febrero de 2016

SEÑORES
COMITE DE POSTGRADOS

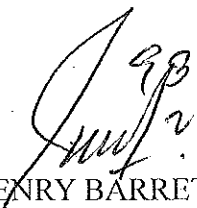
Cordial Saludo

Por medio de la presente, certificamos que el proyecto de grado de los estudiantes de postgrado de pediatría Dres. WILSON ARTURO MUÑOZ MENDEZ Y JORGE ENRIQUE PINTO RUBIO cuyo nombre es "Identificación de Streptococcus agalactiae y Escherichia coli en pacientes con signos y síntomas clínicos de sepsis neonatal temprana mediante hemocultivo y PCR en tiempo real (RT-PCR) en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva" será socializado el día 17 de febrero del 2016 a las 09 am en la Universidad Surcolombiana en la Facultad de Salud y damos certificación de la presente. La aprobación de dicha tesis queda supeditada al visto bueno dado por nosotros el día de la socialización.


Director de Tesis: CARLOS EDUARDO FONSECA
HENRY OSTOS ALFONSO



JORGE EDUARDO MANRIQUE
Pediatría Hospital Universitario Hernando
Moncaleano Perdomo
de plata de Pediatría



HENRY BARRETO
Pediatra Neonatólogo
Jefe de Servicio de UCIN Docente
Hospital Hernando
Moncaleano Perdomo



SANDRA LILIANA ORTIZ
Pediatra Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo
Docente de planta de Pediatría

Neiva 12 de Febrero de 2016

SEÑORES
COMITE DE POSTGRADOS


Cordial Saludo

Por medio de la presente, certificamos que el proyecto de grado de los estudiantes de postgrado de pediatría Dres. WILSON ARTURO MUÑOZ MENDEZ Y JORGE ENRIQUE PINTO RUBIO cuyo nombre es "Identificación de Streptococcus agalactiae y Escherichia coli en pacientes con signos y síntomas clínicos de sepsis neonatal temprana mediante hemocultivo y PCR en tiempo real (RT-PCR) en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva" será socializado el día 17 de febrero del 2016 a las 09.am en la Universidad Surcolombiana en la Facultad de Salud y damos certificación de la presente. La aprobación de dicha tesis queda supeditada al visto bueno dado por nosotros el día de la socialización.

Director de Tesis: CARLOS EDUARDO FONSECA
HENRY OSTOS ALFONSO



JORGE EDUARDO MANRIQUE
Pediatría Hospital Universitario Hernando
Moncaleano Perdomo
de plata de Pediatría



HENRY BARRETO
Pediatra Neonatólogo
Jefe de Servicio de UCIN Docente
Hospital Hernando
Moncaleano Perdomo



SANDRA LILIANA ORTIZ
Pediatra Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo
Docente de planta de Pediatría

IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN
PACIENTES CON SIGNOS Y SINTOMAS CLINICO DE SEPSIS NEONATAL
TEMPRANA MEDIANTE HEMOCULTIVO Y PCR TIEMPO REAL EN EL
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE
NEIVA.

JORGE ENRIQUE PINTO RUBIO
WILSON ARTURO MUÑOZ MÉNDEZ

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA
NEIVA - HUILA
2016

IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN
PACIENTES CON SIGNOS Y SINTOMAS CLINICO DE SEPSIS NEONATAL
TEMPRANA MEDIANTE HEMOCULTIVO Y PCR TIEMPO REAL EN EL
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE
NEIVA.

JORGE ENRIQUE PINTO RUBIO
WILSON ARTURO MUÑOZ MÉNDEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico
Especialista en Pediatría.

Asesor

CARLOS FONSECA
Pediatra

HENRY OSTOS ALFONSO,
M.D. M.Sc Genética

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA
NEIVA - HUILA
2016

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Neiva, Febrero del 2016.

DEDICATORIA

A Dios, por darnos la oportunidad de vivir y por estar con nosotros en cada paso que damos, por fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestra mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido nuestro soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A Nuestros padres, por darnos la vida, queremos mucho, creer en nosotros.

A Nuestras esposas, Por los ejemplos de perseverancia y constancia que las caracterizan y por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A nuestros hijos, por estar con nosotros y apoyarnos siempre, los queremos mucho.

JORGE ENRIQUE
WILSON ARTURO

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A nuestros directores de tesis, Carlos Eduardo Fonseca Becerra y Henry Ostos Alfonso, por su gran apoyo, motivación y exigencia para la culminación de esta etapa de estudios.

A la Universidad Surcolombiana por darnos la oportunidad de ofrecer esta especialización.

Al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, por facilitar los espacios para realizar esta investigación.

A todos los participantes, Mil Gracias...

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
3. MARCO TEORICO	21
3.1 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR	25
3.2 PCR EN TIEMPO REAL	26
4. METODOLOGIA	28
4.1 TIPO DE ESTUDIO	28
4.2 CODIFICACION Y TABULACION	28
4.3 MUESTRA	29
4.4 CONTROLES DE LA PCR	29
4.5 EXTRACCION DE DNA	29
4.6 PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL	31
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	34
5.1 OBTENCION DE MUESTRAS Y DILIGENCIAMIENTO DE FORMATOS DE RECOLECCION DE DATOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO SUMINISTRADOS A LA MADRE	34
6. ANALISIS DE RESULTADOS	35
6.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR EN TIEMPO REAL	35

		Pág.
6.2	ANALISIS ESTADISTICO	37
6.2.1	Análisis descriptivo	37
6.2.2	Análisis bivariado	41
6.2.3	Análisis multivariado	45
7.	DISCUSION	57
8.	CONCLUSIONES	59
9.	RECOMENDACIONES	61
	BIBLIOGRAFIA	62
	ANEXOS	68

LISTA DE FIGURA

	Pág.
Figura 1 Esquema de desarrollo PCR en tiempo real (empleando sistema taqman). Tomado de: Absolute Quantification started Guide. Applied Biosystems	27

LISTA DE IMAGENES

		Pág.
Imagen 1	Vortex Mixer	30
Imagen 2	Spin column	31
Imagen 3	NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	33
Imagen 4	Equipo Applied biosystems 7300 real-time PCR System	33

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1 Rn vs Cycle	35
Grafica 2 Curva standard	36
Grafica 3 Rn vs. Cycle	37
Grafica 4 Distribución edad de nacido en horas	46
Grafica 5 Distribución edad de nacido en horas	47
Grafica 6 Distribución edad gestacional por capurro	47
Grafica 7 Distribución sexo	48
Grafica 8 Distribución región de procedencia	48
Grafica 9 Distribución régimen de seguridad social en salud	49
Grafica 10 Distribución edad materna	49
Grafica 11 Distribución escolaridad materna	50
Grafica 12 Distribución vía del parto	50
Grafica 13 Distribución ruptura prematura de membranas	51
Grafica 14 Distribución antibiótico anteparto	51
Grafica 15 Distribución peso al nacer	52
Grafica 16 Distribución talla al nacer	52
Grafica 17 Distribución hemocultivos	53
Grafica 18 Distribución RT-PCR para SGB	53
Grafica 19 Correlación edades gestacionales por ecografía y capurro	54

	Pág.
Grafica 20 Correlación frecuencia respiratoria y PCR	54
Grafica 21 Correlación Frecuencia respiratoria y conteo de leucocitos	55
Grafica 22 Correlación conteo de leucocitos y PCR	55
Grafica 23 Correlación conteo de leucocitos y procalcitonina	56

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Análisis descriptivo, variables sociodemográficas y antecedentes	38
Tabla 2	Análisis descriptivo, variables clínicas	40
Tabla 3	Análisis descriptivo, variables paraclínicas	41
Tabla 4	Análisis bivariado por prematuridad, variables destacadas	42
Tabla 5	Análisis bivariado para sepsis por SGB, variables destacadas	43
Tabla 6	Análisis multivariado para probabilidad de sepsis por SGB	45

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Instrumento para la recolección de información clínica	69
Anexo B Acta de aprobación comité de ética bioética e investigación	73
Anexo C Consentimiento informado	75

RESUMEN

La sepsis neonatal es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de infección sistémica que se confirma al aislar un microorganismo. Se clasifica en sepsis temprana cuando ocurre en las primeras 72 horas de vida, y refleja transmisión vertical mientras que la sepsis neonatal tardía se presenta después de 72 horas de vida y refleja transmisión horizontal.

La prueba de diagnóstico estándar (hemocultivo) para la sospecha de sepsis neonatal tiene limitaciones de sensibilidad y especificidad, y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es una nueva herramienta de diagnóstico de la sepsis neonatal temprana.

Objetivos: Identificar *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en pacientes con signos y síntomas clínico de sepsis neonatal temprana mediante hemocultivo y PCR en tiempo real en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

Métodos: Previo consentimiento informado se colectaran muestras de sangre con diagnóstico de sepsis neonatal.

Resultados: De 55 neonatos con diagnóstico de sepsis temprana se halló que la mitad de los neonatos pesaban entre 1500 y 2500 gramos al nacer. Se encontró que tan solo 2 hemocultivos (3.64%) fueron positivos para gérmenes diferentes a estreptococo del grupo B (SGB); sin embargo, en las pruebas moleculares, el 36.36% de los neonatos fueron positivos para SGB con RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

En conclusión en nuestra institución los hemocultivos tienen baja sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana en comparación con la RT-PCR para *Streptococcus agalactiae*.

Palabras Claves. Sepsis, Neonatal, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Neonatal sepsis is a clinical syndrome characterized by signs and systemic infection symptoms which is confirmed when a microorganism is isolated. It's classified as early sepsis when it happens in the first 72 hours of life, and it reflects vertical transmission whereas late neonatal sepsis is presented after 72 hours of life and reflects horizontal transmission.

The standard diagnosis test (hemoculture) for suspected neonatal sepsis has limitations of sensitivity and specificity, and the reaction in an open chain of the polymerase in real time (RT-PCR) is a new diagnosis tool for early neonatal sepsis.

Purpose: To identify streptococcus agalactiae and E.coli in patients with signs and clinic symptoms of early neonatal sepsis through hemoculture and real time PCR in the University Hospital Hernando Moncaleano Perdomo of Neiva.

Methods: With previous consent report blood samples with diagnosis of neonatal sepsis will be collected.

Results: Of 55 neonates with a diagnosis of early neonatal sepsis, half of them weighing between 1500 and 2500g at birth. It was found that only 2 hemoculture tests (3,64%) were positives for different germs to streptococcus of group B (SGB); however in molecule test, the 36,36 % of the neonates were positive for SGB with RT-PCR (Real Time Reaction in chain of the polymerase).

In conclusion, in our institution the hemoculture test have low sensitivity and specificity for the diagnosis of early neonatal sepsis compared with the RT-RCP for streptococcus agalactiae.

Key words. Sepsis, Neonatal, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli

INTRODUCCION

La sepsis neonatal es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de infección sistémica que se confirma al aislar un microorganismo ya sea bacterias, hongos, virus o parásitos de un sitio estéril y que se manifiesta dentro de los primeros 28 días de vida. (Coronell, Wilfrido y cols. 2009.)

Según el momento en el que ocurre la infección, la sepsis neonatal se puede clasificar en: Temprana cuando ocurre en las primeras 72 horas de vida; refleja transmisión vertical (por ejemplo, la infección por *Streptococcus* del grupo B o *agalactiae*). (Coronell, Wilfrido y cols. 2009.) Sepsis neonatal tardía; Se presenta luego de las primeras 72 horas de vida; refleja transmisión horizontal de la comunidad o intrahospitalaria (por ejemplo, la infección de vías urinarias nosocomiales). (Khalid N, Haque. 2005.)

Los microorganismos más frecuentemente aislados de los cultivos en la sepsis neonatal temprana (EOS) depende del área geográfica, por ejemplo en Estados Unidos son el *Streptococcus* del grupo B, *E. coli* y otros *Streptococcus*, pero en los países en desarrollo son *Klebsiella*, *S. aureus* y *E.coli*. En los Estados Unidos entre los neonatos con muy bajo peso al nacer los agentes etiológicos más frecuentes son: *E. coli*, *Staphylococcus coagulasa* negativos, y *Streptococcus* del grupo B. (Falciglia, Gustave. 2012).

El *Streptococcus* del grupo B es una bacteria gram-positiva encapsulada de la cual han sido identificados 10 serotipos diferentes. Comúnmente coloniza los tractos gastrointestinal y genital (aproximadamente el 20% de las gestantes en E.E.U.U. están colonizadas con EGB). La trasmisión ocurre tarde en el embarazo, durante el trabajo de parto o intraparto; Algunos factores de virulencia determinantes en la habilidad de causar enfermedad invasiva son: La cápsula de polisacáridos: que ayuda en la protección contra la fagocitosis, fimbrias: que permiten la adherencia a las células epiteliales del huésped y la migración transepitelial, y la C5a peptidasa que inhibe la C5a humana que es un quimioatrayente de neutrófilos. (Camacho G. Andrés. 2013). En países como Estados Unidos, a pesar de la implementación universal de la profilaxis antibiótica intraparto (PAI), la enfermedad de aparición temprana por EGB sigue siendo la principal causa de EOS en los recién nacidos a término. (Falciglia, Gustave. 2012). *Escherichia coli* son bacilos gram-negativos anaerobios facultativos encontrados universalmente en el tracto gastrointestinal humano y comúnmente en el tracto urinario y genital materno. Existen cientos de tipos antigénicos de *E.coli* dado por las múltiples combinaciones de los distintos antígenos (K, H y O); las cepas con el antígeno K1 de la cápsula de polisacáridos han sido asociadas más comúnmente

con el desarrollo de sepsis neonatal y meningitis. (Camacho G. Andrés. 2013). Es considerada la segunda causa más común de sepsis neonatal en recién nacidos a término y la causa más común en los recién nacidos con muy bajo peso al nacer en los Estados Unidos. (Falciglia, Gustave. 2012).

Los factores de riesgo para Sepsis neonatal temprana son entre otros el parto prematuro, la escasa edad gestacional, el bajo peso al nacer del neonato, la ruptura prematura o prolongada de membranas ovulares, la colonización materna con la bacteria EGB, infección del tracto urinario materno, corioamnionitis, fiebre intraparto, y una historia de múltiples embarazos. (Falciglia, Gustave. 2012)

Los neonatos pretérmino están relativamente inmunocomprometidos por dos factores principales: la inmadurez del sistema inmune y el escaso paso placentario de anticuerpos maternos lo cual los predispone a un mayor riesgo tanto de infección temprana (menor a 3 días de vida) como tardía (mayor a 3 días de vida). (Camacho G. Andrés. 2013).

La colonización bacteriana de la gestante en cérvix, vagina y recto hace que un microorganismo (EGB, enterococo del grupo D, bacterias aeróbicas gram negativas, y anaerobios como bacteroides), ascienda a la cavidad amniótica a través de membranas intactas o rotas causando corioamnionitis. La corioamnionitis clínica o subclínica puede iniciar una marcada respuesta inflamatoria con la liberación de citoquinas que contribuye al trabajo de parto pretérmino y ruptura prematura de membranas. (Gleason, Christine y Devaskar, Sherin)

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

La sepsis neonatal temprana (EOS) es la tercera causa más común de muerte en recién nacidos con aproximadamente 500.000 muertes a nivel mundial cada año. (Duke T., Kelly J., Subhi R., Downie L., 2013). Esta enfermedad es un desafío diagnóstico porque sus signos y síntomas no son específicos y muchos síndromes inflamatorios de causa no infecciosa la simulan. Actualmente no existe ningún test lo suficientemente sensible y específico para comprobar la infección del torrente sanguíneo. (Richard A. Polin. 2012)

La Sepsis neonatal representa un grave problema de salud, corresponde a la principal causa de complicaciones y fallecimientos en las unidades de cuidados intensivos neonatales. (Ministerio de Salud y Protección Social y COLCIENCIAS. 2013).

La Sepsis neonatal no es una enfermedad de notificación obligatoria, por tanto es muy difícil estimar la carga verdadera a nivel nacional, departamental y municipal de esta entidad. La ausencia de información es debido a la falta de programas que aseguren la vigilancia de sus diferentes patógenos causales. (Ministerio de salud y protección social. Plan Decenal de Salud Pública, PDSP, 2012 – 2021)

Las cinco primeras causas de mortalidad infantil en el año 2010 en Colombia son: trastornos respiratorios, malformaciones congénitas, otras afecciones originadas en el periodo neonatal, Sepsis bacteriana del recién nacidos e infecciones respiratorias agudas. (Cifuentes, Yolanda *et al.* 2005.)

En el año 2010 en el Departamento del Huila la Sepsis neonatal representó la segunda causa de muerte en los niños y niñas menores de 5 años. (Gobernación del Huila. 2011)

Los métodos moleculares en el diagnóstico de Sepsis neonatal son: hibridización de ácidos nucleicos, amplificación, detección del ADN postamplificación y métodos no basados en ácidos nucleicos como la proteómica. (Jordan, J. 2010)

Dentro de los métodos de amplificación encontramos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual ha sido ampliamente usada en laboratorios de investigación y en algunos laboratorios clínicos para identificar el/los patógeno(s) de Sepsis neonatal. (Edmond, K. 2010)

La alta sensibilidad de la PCR permite la detección de ADN bacteriano incluso cuando las concentraciones son bajas. Los ensayos convencionales están siendo reemplazados por los nuevos sistemas en tiempo real, los cuales son más rápidos y se asocian con menores tasas de contaminación. La PCR en tiempo real está basada en la medida de una señal fluorescente generada durante cada ciclo de amplificación, esto produce resultados cuantitativos de la carga bacteriana en 30 minutos. (Jordan JA, Durso MB. 2005)

Los inconvenientes con la prueba de PCR en tiempo real es que el espécimen debe ser recolectado de una venopunción estéril lo cual es difícil en los neonatos, su baja sensibilidad cuando el conteo de leucocitos en el neonato es alto, su costo elevado y su utilización solamente por personal entrenado. (Benjamin DK Jr, Miller W, Garges H, Benjamin DK, McKinney RE Jr, *et al.* 2010)

A pesar de contar con datos clínicos y hematológicos es difícil identificar definitivamente a un neonato con Sepsis. Este hecho nos motiva a buscar otras rutas que permitan llegar con mayor precisión al diagnóstico, de lo contrario se producen 2 situaciones perjudiciales para el neonato: iniciar tempranamente con antibióticos que quizá no se justifiquen y someterlos a riesgos por infecciones con cepas multirresistentes o empezar tardíamente el tratamiento y causar la muerte del paciente. (Polanco, Diana. 2004)

Por estas razones la utilización de pruebas complementarias al estándar de oro (hemocultivo) como la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) permitirá establecer el diagnóstico de sepsis neonatal temprana en un menor tiempo contribuyendo a una menor utilización de antibióticos empíricos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en pacientes con signos y síntomas clínico de sepsis neonatal temprana mediante hemocultivo y PCR tiempo real en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la frecuencia de infección de *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en los neonatos con Sepsis neonatal temprana con hemocultivo positivo y PCR en tiempo real.

Describir los factores de riesgo encontrados para Sepsis neonatal temprana.

Sustentar la estandarización del método diagnóstico molecular de reacción en cadena polimerasa en tiempo real patógeno-específico como prueba complementaria del diagnóstico de sepsis neonatal temprana.

3. MARCO TEORICO

La respuesta inmune inicial a patógenos se genera por medio de la unión o ligados (microorganismos o productos celulares) a sus respectivos receptores (extra o intracelulares). Las uniones pueden ser ya sea los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) cuyo prototipo es el Lipopolisacáridos (LPS) o los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como las proteínas del shock térmico y el ácido úrico. (Wynn, J. Y Wong, H. 2010)

Los receptores se conocen como receptores de reconocimiento de patrón. Entre ellos están los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD, receptores tipo RIG-1. El primer tipo de receptor es tanto intra como extracelular y los dos últimos son intracelulares. (Trinchieri G, Sher A. 2010)

El Estreptococo del grupo B (EGB) es un patógeno intracelular reconocido por las células dendríticas convencionales y transportado al compartimento fagolisosómico donde es degradado por hidrolasas y allí su ARN es liberado. Este ARN es censado por el TLR7 induciendo la producción de Interferon tipo I. En los macrófagos el EGB genera una señal a través de la vía TBK1/IRF3 (Quinasa activadora de NF- κ B/factores reguladores de interferon) de una manera independiente a TLR para inducir la producción de Interferon tipo I. (Mancuso, G. 2009)

La unión entre los patógenos o productos celulares con los receptores de reconocimiento de patrón genera unas señales moleculares intracelulares (por medio de segundos mensajeros) que en últimas induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, interferon gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)[21], factores de la coagulación, proteínas del complemento (C3a y C5a) y quemoquinas como por ejemplo IP-10, CCL5 (RANTES), MCP-1, MIP-1, e IL-8. (Ng P.C., Li K., Chui K.M., et al. 2010)

La producción de citoquinas proinflamatorias lleva a la activación de las células endoteliales. Estas células cuando se activan expresan mayores niveles de moléculas de adhesión celular como P-L-E-selectina y CD11b/CD18, quemoquinas, sustancias vasoactivas, se activa el complemento y se desarrolla un estado procoagulante, todos estos sucesos facilitan el reclutamiento de leucocitos, su diapédesis y migración extravascular. (Figueras J., Gomez L., Rodriguez J.M., et al. 2010)

La homeostasis inflamatoria hace que en la infección ocurra un incremento en la producción de citoquinas antiinflamatorias como TGF- β , IL-4, IL-10, IL-11, e IL-13 impidiendo la acción de las citoquinas proinflamatorias. (Sikora J.P., Chlebna D., Krzyzanska A. 2010). De igual modo en la Sepsis neonatal se sintetizan citoquinas solubles específicas y antagonistas de receptores de citoquinas proinflamatorias como sIL-6R, sIL2, and IL-1ra, sRAGE (RAGE soluble) y TNFR2 (el cual regula la concentración del TNF- α) que reducen la intensidad de la respuesta inflamatoria, de lo contrario ocurriría una inflamación sistémica, daño tisular y muerte (Spear M.L., Stefano J.L., Fawcett P., *et al.* 2010)

Rol del sistema del complemento: Es un importante componente de la inmunidad innata por medio de su actividad microbicida, opsonizante, quimiotáctica y anafiláctica. En la Sepsis neonatal la activación mediada por el complemento de los leucocitos genera el incremento en su superficie celular de receptores como: CR1 [CD35], CR3 [Mac-1, D11b/CD18]; la unión entre estos receptores y las proteínas del complemento incrementa la inflamación, la agregación plaquetaria, la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno. (Berger M., O'Shea J., Cross A.S, *et al.* 2010). La presencia de microbios en el neonato causa el incremento de otras proteínas innatas de defensa como las colectinas, lactoferrina, fosfolipasa A2, reactantes de fase aguda como procalcitonina, proteína C reactiva, amiloide sérico A, haptoglobulina, fibronectina y anticuerpos principalmente IgM. (Levy O. 2010)

Durante la infección el endotelio y diferentes células inmunes expresan de manera abundante el factor tisular el cual activa diferentes proteínas de la coagulación causando la formación de trombos en la microvasculatura. A su vez las proteínas anticoagulantes se inactivan y en los microtrombos se consumen las plaquetas provocando trombocitopenia, poniendo al neonato en riesgo de sangrado. La citotoxicidad de las células NK (asesinas naturales) es deficiente en Sepsis. Los mastocitos responden a la invasión de patógenos por medio de la producción de histamina causando vasodilatación y alterando la función inmune adaptativa al generar predominantemente un fenotipo inmunosupresor Th2. El neutrófilo es el medio de defensa celular más importante en la Sepsis neonatal. En esta entidad se produce neutropenia junto con disminución de su apoptosis y función, lo cual incrementa el riesgo de muerte. (Engle W.A., McGuire W.A., Schreiner R.L., *et al.* 2010)

En el Instituto materno infantil de Bogotá se llevó a cabo un estudio para conocer el perfil microbiológico de aislamiento en unidades neonatales donde se identificaron 560 hemocultivos positivos, de los cuales los gram positivos fueron 486 y los gram negativos 59. De estos últimos la distribución fue: Klebsiellas (45,8%), E. coli (23,7%), Serratia (11,9%) y otros (18,6%). La principal limitación

de este estudio es que no diferenció las infecciones neonatales en tempranas o tardías. (Cifuentes, Yolanda et al. 2005)

En el Hospital Universitario de Neiva se han realizado muchos estudios para saber la incidencia y prevalencia de la Sepsis neonatal temprana. En el año 2004 se halló que del 20 a 25% de los neonatos que ingresaron a la unidad de recién nacidos tenían diagnóstico de Sepsis neonatal temprana. (Polanco, Diana. 2004)

En un estudio del 2003 al 2006 se describió una incidencia de Sepsis entre los recién nacidos de 1500 a 200 gramos del 50%. (Fonseca, Carlos. 2006). La incidencia de Sepsis neonatal temprana en neonatos con antecedente de ruptura prematura de membranas fue de 23% del 1 de enero hasta el 30 de abril de 2007. (Ibáñez, Carlos Ferney et al. 2007)

Del 1 de enero de 2007 a 1 de junio de 2007 se presentaron 60 casos de Sepsis neonatal temprana y se encontró una considerable cantidad de hemocultivos negativos (82,1%) versus positivos (17,9%). (Rodríguez, C.; Barrera, L. y Lozano, A. 2007)

La Sepsis neonatal fue la segunda patología más frecuente con 18 casos presentada por los neonatos hijos de madres pertenecientes al programa de alto riesgo obstétrico durante el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de enero al 28 de febrero de 2007. (Díaz, Elizabeth et al. 2007)

En un estudio descriptivo observacional de 112 prematuros nacidos entre agosto de 2006 a enero de 2007 se presentaron 22 casos de Sepsis neonatal temprana siendo el séptimo diagnóstico más frecuente en esta población. (Andrade, C.; Motta, Y. y Motta, A. 2007)

El diagnóstico de sepsis de aparición temprana, es una enfermedad grave con alta prevalencia en los recién nacido preterminos, su diagnóstico oportuno se obstaculiza por la sensibilidad subóptima y el tiempo de los resultados de los de hemocultivo. La Detección del patógeno infectante directamente en la sangre por PCR en tiempo real proporcionaría un resultado mucho más rápido. Por desgracia, los ensayos basados en PCR informados hasta ahora

Requiere de mano de obra experta y, a menudo carecen de la identificación de especies directas. Se ha desarrollado una PCR-en tiempo real multiplex de diagnóstico de sepsis neonatal temprana que es fácil de usar, es aplicable en los volúmenes sanguíneos pequeños y proporciona a las diferentes especies los resultados dentro de 4 horas. Los ensayos de PCR específicos para cada especie fueron seleccionados o desarrollados utilizando herramientas bioinformáticas para la detección de los patógenos etiológicos más frecuentes: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* *Serratia marcescens*. Los ensayos de PCR mostraron 100% de especificidad, la cobertura total de los patógenos diana y un límite de detección de sepsis neonatal temprana de ≤ 10 CFU eq./reaction. Estos valores de LOD se mantuvieron en el formato de multiplex o cuando se aisló el ADN bacteriano a partir de sangre. La evaluación clínica mostró una alta concordancia entre el múltiplex PCR y cultivo de sangre. (Marre van den Brand, Remco P.H. Peters, Arnold Catsburg 2014)

El diagnóstico y tratamiento del recién nacido con sospecha de sepsis neonatal temprana son esenciales para prevenir las complicaciones graves y potencialmente mortales. El diagnóstico de la neonatal sepsis es un reto debido a la variable y no específica signos clínicos; Por otra parte, los marcadores de infección son difíciles de evaluar en la primera la fase crítica. Para evitar complicaciones graves como la meningitis, absceso cerebral, y la muerte neonatal, el tratamiento es iniciado en muchos recién nacidos con signos clínicos de sepsis sin infección demostrada. La utilidad de los marcadores de infección en el diagnóstico de la sepsis neonatal se ha evaluado en numerosos estudios con resultados diferentes. Los biomarcadores potencialmente utilizados para el diagnóstico de sepsis neonatal se puede dividir en cuatro grupos: proteínas de fase aguda, antígenos de superficie, citosinas y quimiocinas, y moléculas solubles de adhesión.

Las proteínas de fase aguda investigados en múltiples estudios relativos a la sepsis neonatal son proteína C reactiva (PCR), la procalcitonina, el suero amiloide A, y hepcidina. CRP se usa comúnmente como un indicador para sepsis bacteriana en los recién nacidos y los niños. CRP tiene varios inconvenientes; no es útil como una fase temprana marcador de infección, ya que sólo se puede detectar 12 h después de la manifestación de los signos clínicos, que alcanza una meseta después de 20 - 72 horas y que carece de especificidad. Un estudio anterior indicaba la procalcitonina tenía un valor predictivo mayor que la PCR en la detección de la sepsis en pacientes. La procalcitonina es liberado a la circulación el plazo de 3 h después de la inyección de endotoxina, se alcanza una meseta a las 6 h, y sigue siendo elevado durante 24 h. Esto hace procalcitonina un prometedor marcador para la infección de fase temprana y la identificación sensible infantes de infectados. Sin embargo, en los recién nacidos de su valor en

el primer día de vida está limitada por una respuesta fisiológica de aumentar después del nacimiento. amiloide A sérico ha mostrado tan alto como un aumento de 1.000 veces durante infección y aumenta 8-24 h después de la aparición de sepsis . Este marcador se ha informado que son útiles en diversas condiciones agudas y en el diagnóstico de Sepsis en recién nacidos. La hepcidina, péptido antimicrobiano, juega un papel crítico en la inflamación y en la homeostasis del hierro,(SOFIE SOMMER HEDEGAARD , KIRSTEN WISBORG y ANNE-METTE HVAS 2015)

3.1 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

Es una técnica para la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de ADN. Las siglas PCR significan “Polimerase Chain Reaction”: reacción en cadena de la polimerasa. Desarrollada originalmente por Kary Mullis en la década de los 80, por lo cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993, ha sido ampliamente utilizada en el campo de la biología molecular como PCR simple y en sus diferentes variedades (PCR multiplex, PCR anidado, RT-PCR, PCR-RFLP, etc.) (Hoorfar et al., 2004, Hoffmann *et al.*, 2009).

La técnica de PCR permite amplificar de manera selectiva fragmentos del ADN, situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas. Estas dos regiones se utilizan como iniciadores en la reacción de síntesis del ADN, que está catalizada por la enzima ADN polimerasa (Gibello *et al.*, 2001)

Brevemente, la reacción se basa en la repetición sucesiva de 30 a 40 ciclos, conformado cada uno por tres etapas o fases principales: Una primera fase de desnaturalización, donde la doble hélice de ADN se separa en sus dos hebras, una segunda etapa de hibridación, donde los iniciadores específicos se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar, y un paso final de elongación, donde se produce la síntesis de una cadena sencilla complementaria a la original mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio, complementarios a la cadena molde. Este ciclo se repite de tal manera que se da una amplificación exponencial de la secuencia de interés, generando al final del proceso billones de copias de ella. Todo el proceso se lleva a cabo en un equipo, denominado termociclador, que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.

Los productos obtenidos se visualizan normalmente por medio de electroforesis en gel de agarosa. La amplificación de un gen específico del patógeno puede de este modo aumentar significativamente la sensibilidad de la detección (Gibello *et al.*, 2001, Cunningham, 2002, Yang and Rothman, 2004)

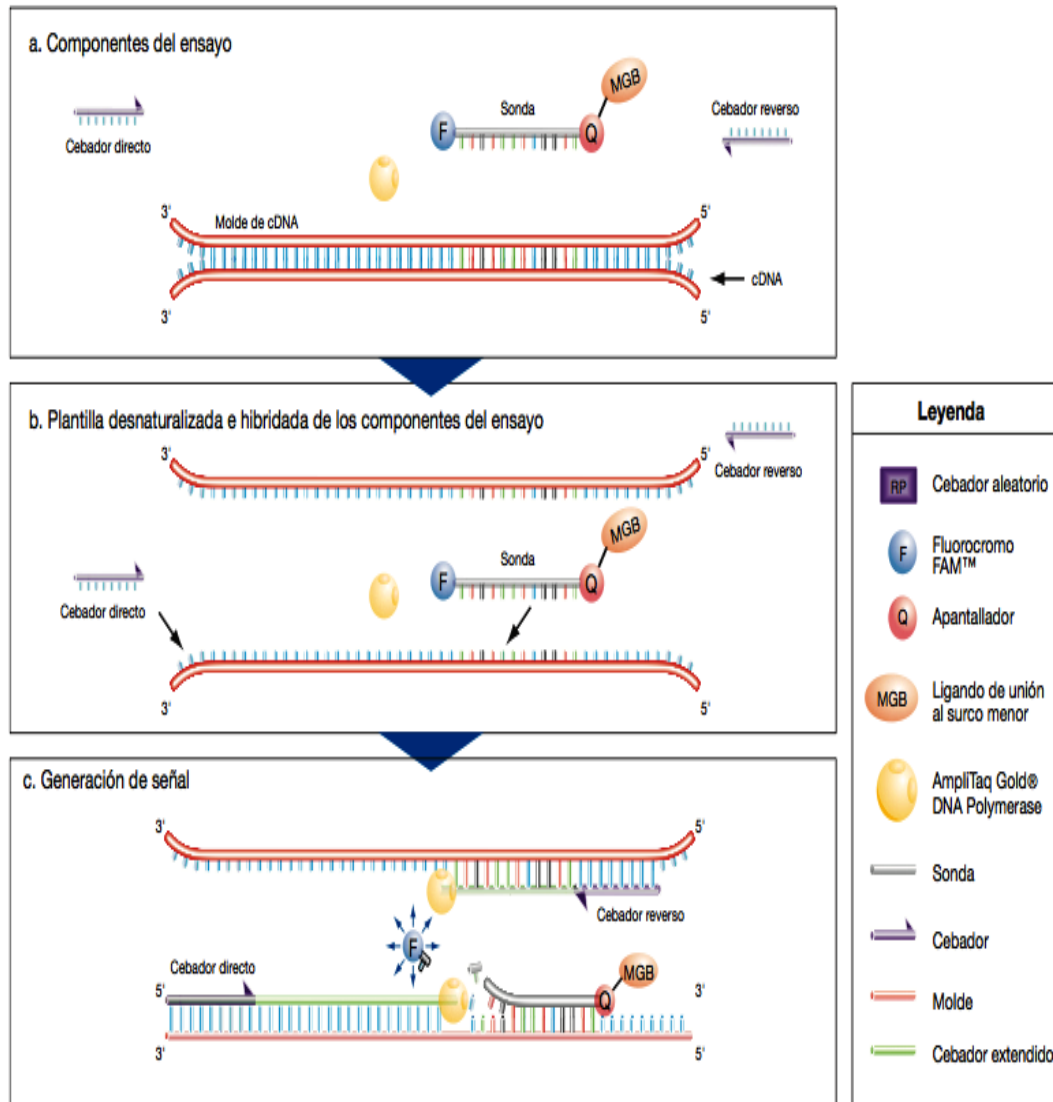
Las ventajas de la PCR sobre otros métodos de diagnóstico genético radican en su simplicidad y rapidez, especificidad y sensibilidad (Johnson, 2000; Gibello *et al.*, 2001).

Las diferentes clases de PCR han sido empleadas ampliamente para el diagnóstico e investigación de infecciones causadas por microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios) así como para el estudio de enfermedades de tipo genético, análisis forenses, relaciones filogenéticas entre especies, detección de cepas resistentes a antibióticos etc. a partir de diferentes muestras como sangre, semen, cultivos bacterianos, cultivos celulares, tejidos frescos, congelados o embebidos en parafina.

3.2 PCR EN TIEMPO REAL

PCR cuantitativa detecta en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser (Grafica 1). La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. (M. Tefvik Dorak (Ed.) 2007).

Figura 1. Esquema de desarrollo PCR en tiempo real (empleando sistema taqman). Tomado de: Absolute Quantification started Guide. Applied Biosystems.



4. METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizo un estudio observacional, de prevalencia, prospectivo y semi-analítico.

4.2 CODIFICACION Y TABULACION

Los resultados recolectados para el estudio se tabularon y almacenaron en Microsoft Excel® 2016 y se utilizo un sistema numérico de codificación de las variables cualitativas para facilitar su análisis estadístico.

Los datos fueron analizados en un programa estadístico electrónico computarizado, Stata versión 12, para su análisis descriptivo, bivariado y multivariado

Inicialmente se llevó a cabo el análisis univariado de la totalidad de las variables, estableciendo la ocurrencia de los eventos y la magnitud de los mismos a través de la distribución de frecuencias absolutas y relativas. Se calcularon también las medidas de tendencia central, variabilidad y posición de las variables cuantitativas, de acuerdo para el caso, la normalidad fue evaluada por el test de shapiro wilks. Una interpretación conjunta de los resultados antes descritos consolidará el análisis descriptivo.

Seguidamente se llevó a cabo el análisis bivariado y estratificado con el objetivo de evidenciar la relación de las variables disponibles de acuerdo con los objetivos definidos para este estudio. Se realizaron contrastes o comparaciones de proporciones para las variables cualitativas mediante los test de chi cuadrado o exacto de Fisher, según el caso. Para las variables cuantitativas, se determino inicialmente su patrón de distribución mediante métodos gráficos y el test de shapiro wilks, se calcularon medias y medianas con sus respectivas desviaciones estándar o rangos intercuartílicos según el caso, y se realizaron pruebas de contraste de hipótesis para diferencia de medias como el t student o el mann-withney-wilcoxon para diferencias de rangos y medianas. Así mismo se calcularon coeficientes de correlación, con sus respectivos intervalos de confianza.

Se realizó luego un análisis multivariado mediante el empleo de un modelo de regresión de Poisson, con selección de variables estadística y clínicamente significativas, que han sido reconocidas en la literatura universal; identificando la independencia de los respectivos factores de riesgo o protectores. Se realizaron además pruebas estadísticas adicionales para determinar la validez y el desempeño de los modelos estadísticos. Todas las pruebas estadísticas calculadas tuvieron un valor de significancia inferior a 0,05.

Finalmente todos los resultados fueron presentados mediante tablas y gráficas según el caso respectivo.

4.3 MUESTRA

Previo consentimiento informado se colectaron muestras de sangre en tubo tapa LILA con anticoagulante EDTA (3ml) procedentes de pacientes a los cuales se les ha comprobado o diagnosticado sepsis neonatal en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo.

4.4 CONTROLES DE LA PCR

Control Positivo se utilizó AMPLIRUN® STREPTOCOCCUS AGALACTIAE DNA CONTROL y AMPLIRUN® ESCHERICHIA COLI (VTEC) DNA CONTROL de la marca comercial Vircell y con registro Invima para diagnóstico, en el control negativo se utilizó agua DEPC Invitrogen.

4.5 EXTRACCION DE DNA

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial de Qiagen según el protocolo para bacterias de la misma marca comercial, se tomaron 200µl de sangre y se mezclaron en 200 µl de una solución de enzimas (20 mg/ml lysozyme; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton) este paso es para bacterias Gram-positivas y se mezclaron utilizando Biovortex marca Vortex Mixer, (Imagen 1) siempre dentro del tubo vial (eppendorf). Se incubaron por 30 minutos a 37°C. después se añadió 20µl de proteinasa K y 200 µl del Buffer AL. y se mezclaron con Vortex Mixer e incubaron a 56°C por 30 minutos. Luego se centrifugaron brevemente el tubo para precipitar las gotas que puedan estar adheridas a la tapa del vial (eppendorf), después se añadieron 200µl de etanol (96-100%) se centrifugo

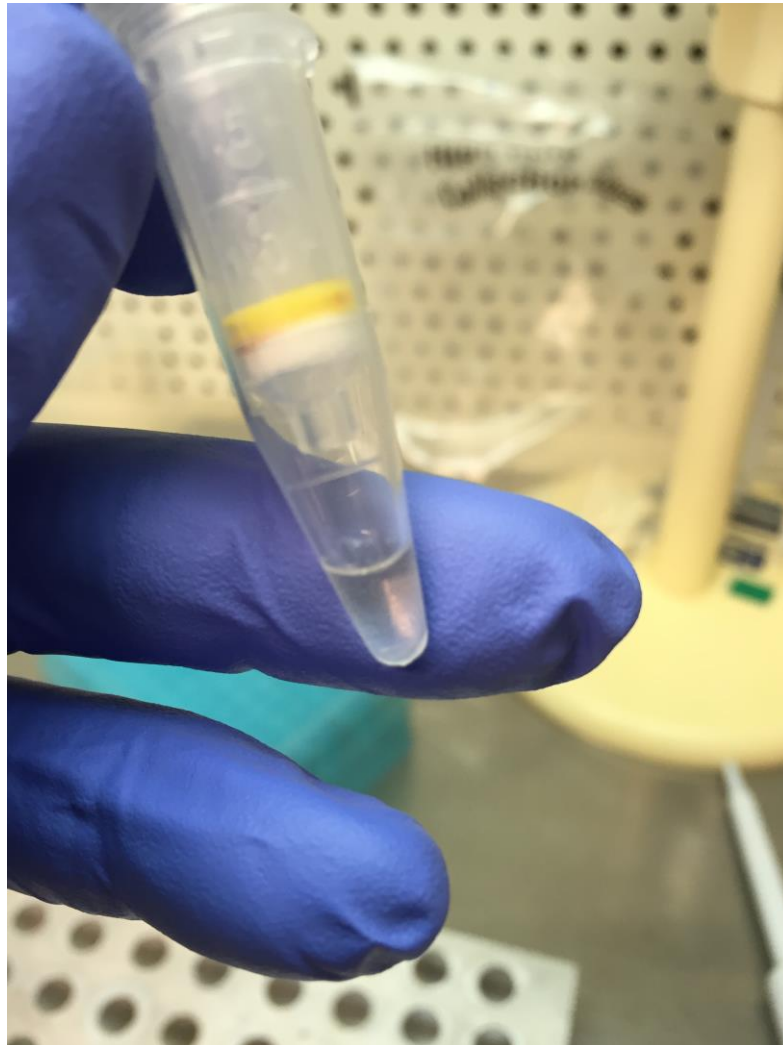
brevemente el tubo para precipitar las gotas que puedan estar adheridas a la tapa del vial (eppendorf),

Imagen 1. Vortex Mixer.



luego se adiciono el lisado en una columna spin column (Imagen 2) y centrifugó a 10000 rpm por un minuto a temperatura ambiente se descartó todo lo que quedo en el tubo colector, luego se adiciono 500 μ l del Buffer AW1, se centrifugó a 10000 rpm por un minuto, se descartó todo lo que quedo en el tubo colector, se adiciono 500 μ l del buffer AW2 se centrifugo a 14000 rpm por tres minutos, se descartó todo lo que quedo en el tubo colector, luego se introdujo el tubo en un vial nuevo de 1,5 ml en la columna se adiciono 200 μ l del Buffer AE y se incubo por 1 minuto temperatura ambiente y luego se centrifugo a 14000 rpm por un minuto y se descartó la columna y se guardó lo que queda en el vial de 1,5 ml. La concentración y calidad de ADN extraído fue medido por el equipo NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer. (Imagen 3)

Imagen 2. Spin column.



4.6 PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL

Para las qPCR se emplearán los primers y sondas específicas para cada patógeno, se usará la mezcla TaqMan Universal PCR Master Mix, en un volumen final de reacción de 25ul. Las reacciones serán llevadas a cabo en el equipo Applied biosystems 7300 real-time PCR System. (Imagen 4)

La construcción de los primers de *Streptococcus agalactiae* se emplearan las accesiones No. AF064441 (*Streptococcus agalactiae* strain SA 66-07 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer), Forward CATTGCGTCTTGTTTAGTTTTGAG, Reversed GGAGCCTAGCGGGATCGA y sonda VIC- AGA GCG CCT GCT TTG CAC GCA –TAMRA y los primer de *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933 (GenBank accession no. AE005174), Forward GCACTAAAAGCTTGGAGCAGTTC, Reversed AACAAATGGGTCAGCGGTAAGGCTA y sonda FAM-CGTTGGCGAGGACC-MGBNFQ. Utilizamos el Primer Express 3.0 software de Applied Biosystems.

Reactivos utilizados y su cantidad de volumen para la PCR en tiempo real.

Reactivo	Cantidad
Taqman Universal PCR master mix (2X)	12.5 ul
Taq man (sonda)	0.5 ul
Primer F (10 uM)	1.25 ul
Primer R (10 uM)	1.25 ul
DNA	1 ul
Agua	8.5 ul
TOTAL	25 ul

Protocolo de perfiles de temperatura para PCR en tiempo real.

50 °C por 2 minutos
 95 °C por 10 minutos
 95°C por 15 segundos
 60 °C por 1 minutos

40 ciclos

Imagen 3. NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer.



Imagen 4. Equipo Applied biosystems 7300 real-time PCR System.



5 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión bibliográfica	X	X										
Extracción de DNA		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Validación de la técnica de PCR tiempo real		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Informes parciales						X						
Informe final												X
Socialización y divulgación de resultados												X

5.1 OBTENCION DE MUESTRAS Y DILIGENCIAMIENTO DE FORMATOS DE RECOLECCION DE DATOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO SUMINISTRADOS A LA MADRE

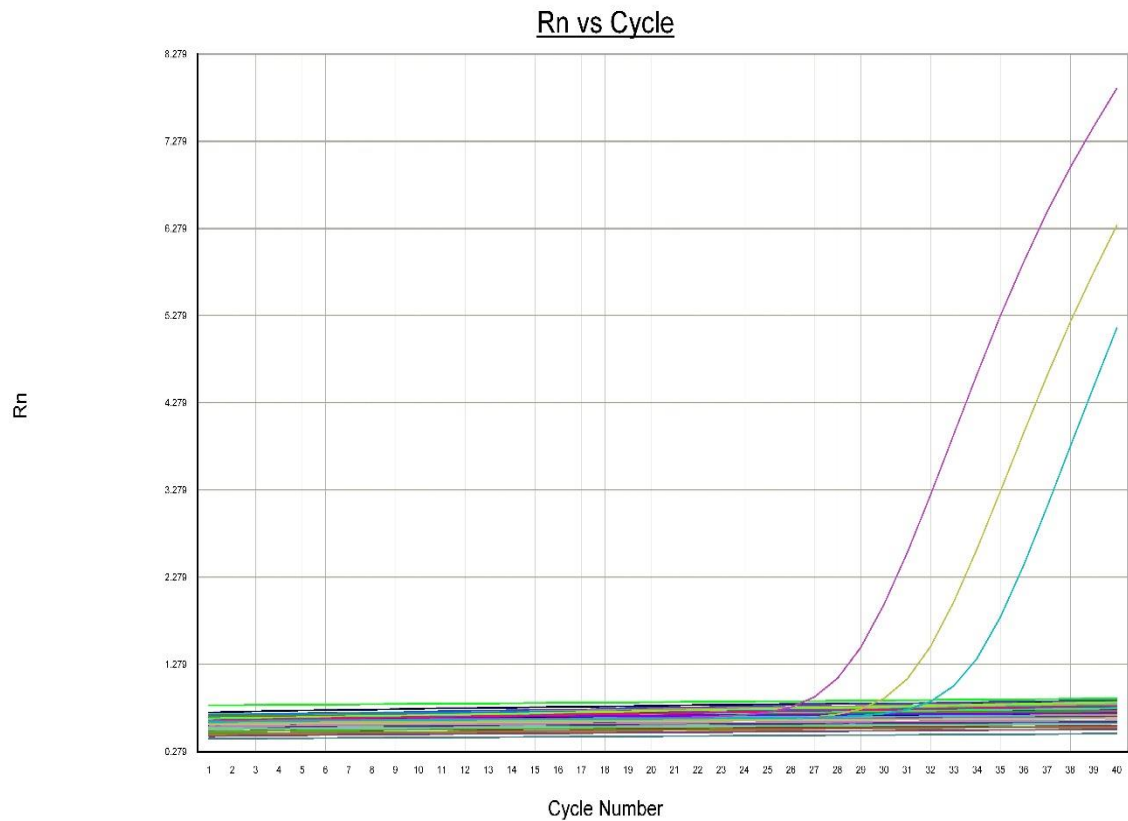
Una vez que el paciente llega a la unidad de cuidado intensivo neonatal o unidad básica neonatal, se realizan criterios de inclusión al estudio, y sin positivos, se procede al diligenciamiento del consentimiento informado y del instrumento de recolección de datos. (Ver anexos A,B,C)

6 ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR EN TIEMPO REAL

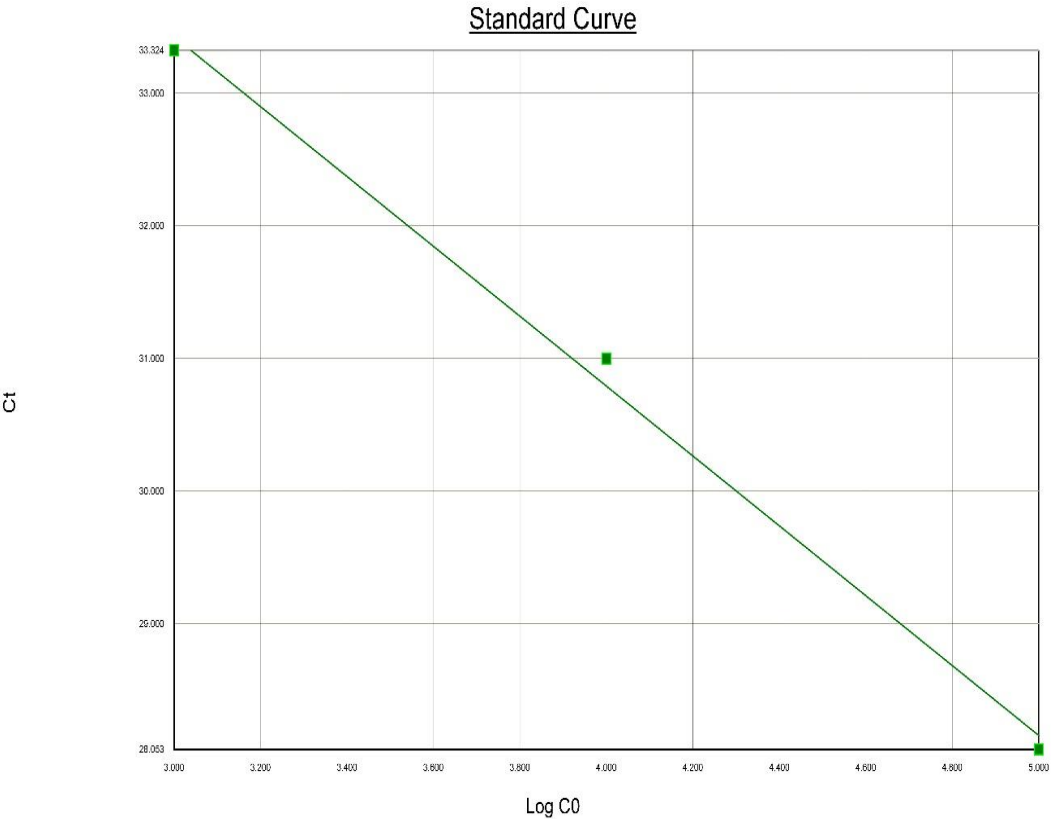
Se realizaron pruebas para la PCR en tiempo real con diferentes concentraciones del control positivo para determinar la sensibilidad de la prueba. (Grafica 1 y 2) En la grafica 3 se muestran corridos de ADN extraído de las cepas de tres especies de *Streptococcus*; *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *S. iniae*, nos muestra la alta especificidad que tiene la prueba para la familias *S. agalactiae*.

Grafica 1. Rn vs Cycle



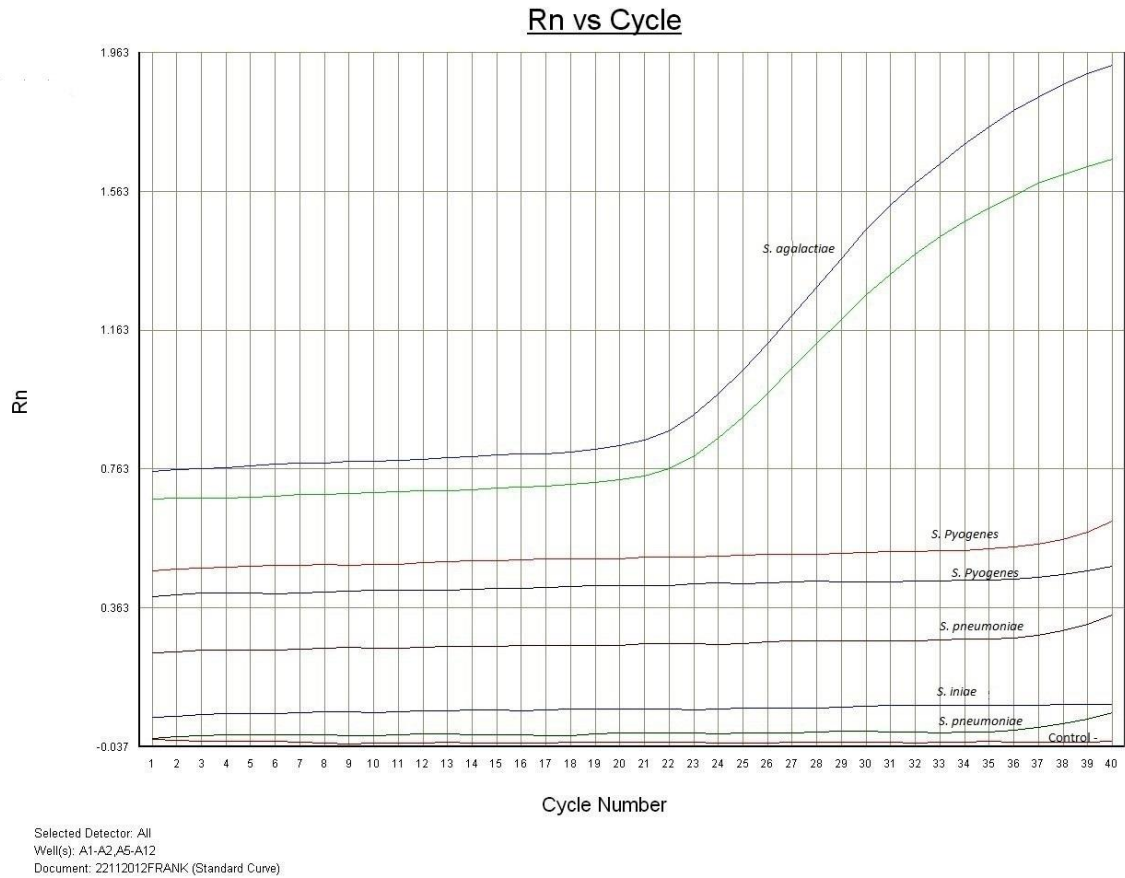
Selected Detector: All
Well(s): A1-F7
Document: 02062016 (Standard Curve)

Grafica 2. Curva standard.



Detector: E.COLI N, Slope: -2.635158, Intercept: 41.332924, R2: 0.995362
Document: 02062016 (Standard Curve)

Grafica 3. Rn vs. Cycle.



6.2 ANALISIS ESTADISTICO

6.2.1 Análisis descriptivo. Durante los meses de julio hasta octubre de 2015 ocurrieron 692 nacimientos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo (HUHMP) de la ciudad de Neiva en el departamento del Huila. De estos, 390 fueron partos vaginales y 302 cesáreas. Durante el mismo periodo de tiempo se hospitalizaron neonatos en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN); de los cuales 55 tuvieron un diagnostico clínico de sepsis neonatal temprana y 55 además cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión del estudio por lo que fueron seleccionados.

Del total de la muestra (55 neonatos con diagnóstico de sepsis temprana), el 62.96% fueron del sexo masculino, contando con una mediana (M) de edad de 2 horas de nacido al ingreso a la UCIN, con un rango intercuartílico (RIC) de 1-12 horas. La media (X) de edad gestacional al nacer fue de 33.03 y 33.22 por ecografía y capurro, con una desviación estándar (SD) 3.88 y 4.16 respectivamente. El 34% de los pacientes fueron provenientes del área rural y más de la mitad pertenecientes al régimen subsidiado. La edad materna promedio fue de 26.49 años (SD: 6.99) y más de la mitad de las mismas tienen una escolaridad de secundaria completa. La mediana de su paridad fue de 2 partos (RIC: 1-3), con un 66% de partos vía cesárea. En el 36.36% de los nacimientos hubo una ruptura prematura de membranas (RPM), el 20% recibió manejo antibiótico periparto y casi la mitad (14.81%) presentó signos clínicos de corioamnionitis. En lo referente al STORCH, el 3.64% tuvo IgM anti Toxoplasma positiva; el resto de pruebas estuvieron todas negativas. Ver tabla 1.

Tabla 1. Análisis descriptivo, variables sociodemográficas y antecedentes.

VARIABLE		GENERAL n=55	S WILKS* (p)
Edad De Nacido (Horas) ‡		2 (1-12)	0.000
EG Eco†		33.03 (3.88)	0.307
EG Capurro†		33.22 (4.16)	0.126
Sexo§	Masculino	34 (62.96)	
	Femenino	20 (37.04)	
Procedencia§	Rural	14 (29.17)	
	Urbana	34 (70.83)	
SGSSS§	Subsidiado	38 (69.09)	
	Contributivo	16 (29.09)	
	Especial	1 (1.82)	
Edad Materna†		26.49 (6.99)	0.509
Educación De La Madre§	Primaria	18 (33.96)	
	Secundaria	32 (60.38)	
	Técnica	2 (3.77)	
	Otra	1 (1.89)	
Paridad‡		2 (1-3)	0.009
Parto§	Vaginal	17 (34.00)	
	Cesárea	33 (66.00)	
Corioamnionitis§		8 (14.81)	
RPM§	No	35 (63.64)	

	0-18 Horas	14 (25.45)
	19-24 Horas	3 (5.45)
	> 24 Horas	3 (5.45)
	No	42 (79.25)
AB Periparto [§]	0-12 Horas	1 (1.89)
	13-24 Horas	3 (5.66)
	24-48 Hora	1 (1.89)
	> 48 Horas	6 (11.32)
	IgM Toxo [§]	2 (3.64)
VDR [§]	0 (0.00)	
HIV [§]	0 (0.00)	
HBV [§]	0 (0.00)	

Fuente: * $p < 0.05$ indica distribución no normal, † X (SD), ‡ M (RIC), § n (%). X: media, SD: desviación estándar, M: mediana, RIC: rango intercuartilico, n: frecuencia absoluta, %: frecuencia relativa, EG: edad gestacional, SGSSS: sistema general de seguridad social en salud, RPM: ruptura prematura de membranas, AB: antibiótico.

En lo relacionado a la variables clínicas, se halló que la mitad de los neonatos se encontraron entre 1500 y 2500 gramos de peso al nacer, con una cuarta parte (27.7%) en un peso inferior a este. La media de la talla y la frecuencia respiratoria (FR) al nacimiento fueron de 42.95 cm (SD: 6.27) y 45.43 respiraciones por minuto (rpm) (SD: 8.10) respectivamente y una mediana de temperatura de 36.2 (RIC: 36-36.5). Al ingreso a la UCIN el 64% y 70% de los pacientes presentaron alteración del ritmo cardíaco y respiratorio respectivamente, siendo la taquicardia y la taquipnea los más frecuentes. Tan solo el 14.35% mostramos trastornos térmicos y el 9.62% episodios de apnea; con un no despreciable porcentaje de ictericia (21.15%). Ninguno presento convulsiones, abombamiento de la fontanela, signos locales de infección ni trastornos de la glicemia. Ver tabla 2.

Tabla 2. Análisis descriptivo, variables clínicas.

VARIABLE		GENERAL n=55	S WILKS* (p)
Peso Al Nacer [§]	< 1000 g	4 (7.27)	
	1000-1500 g	11 (20.00)	
	1501-2500 g	28 (50.91)	
	2501-3500 g	8 (14.55)	
	> 3500 g	4 (7.27)	
Talla [†]		42.95 (6.27)	0.155
FR [†]		45.43 (8.10)	0.825
Temperatura [‡]		36.2 (36-36.5)	0.001
FC [§]	Bradicardia	6 (10.91)	
	Taquicardia	29 (52.73)	
Respiración [§]	Bradipnea	2 (3.85)	
	Taquipnea	34 (65.38)	
Distermia [§]		8 (14.35)	
Distres Respiratorio [§]		38 (70.37)	
Apnea [§]		5 (9.62)	
Ictericia [§]		11 (21.15)	
Intolerancia VO [§]		1 (1.96)	
Convulsión [§]		0 (0.00)	
Fontanela Abultada [§]		0 (0.00)	
Signo Local De Infección [§]		0 (0.00)	
Hipoglicemia [§]		0 (0.00)	
Hiperglicemia [§]		0 (0.00)	

Fuente: *p<0.05 indica distribución no normal, † X (SD), ‡ M (RIC), § n (%). X: media, SD: desviación estándar, M: mediana, RIC: rango intercuartilico, n: frecuencia absoluta, %: frecuencia relativa, FR: frecuencia respiratoria, FC: frecuencia cardiaca, VO: vía oral.

Respecto a los datos paraclínicos, se halló una mediana del conteo leucocitario y neutrofilico de 10200 cel/ml (RIC: 6800-14100) y 6320 cel/ml (RIC: 3363-9372) respectivamente. El conteo plaquetario estuvo entre 142000 y 303000 cel/ml en la mitad de los pacientes (M: 232000). Menos del 25% de los neonatos exhibieron un conteo de células inmaduras o en cayados. El 75% de los pacientes ostentaron una hemoglobina (Hb) superior a 15 g/dl. Los títulos de PCR (proteína C reactiva) y procalcitonina oscilaron entre 0.01 a 0.4 y 0.55 a 6.75 respectivamente en el

50% de la muestra. Se encontró que tan solo 2 hemocultivos (3.64%) fueron positivos, uno para E. Faecalis y otro para S. Aureus, y ninguno para estreptococo del grupo B (SGB); sin embargo, en las pruebas moleculares, el 36.36% de los neonatos fueron positivos para SGB con RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real); no así, ninguna fue positivo para E. Coli. El tiempo de estancia en la unidad tuvo una mediana de 14 días con un RIC de 7 a 30 días. Ver tabla 3.

Tabla 3. Análisis descriptivo, variables paraclínicas.

VARIABLE	GENERAL n=55	S WILKS* (p)
Leucocitos [‡] (cel/ml)	10200 (6800-14100)	0.000
Neutrófilos [‡] (%)	57.5 (47-70)	0.002
Neutrófilos [‡] (cel/ml)	6324 (3363-9372)	0.000
Plaquetas [‡] (10 ³ cel/ml)	235 (142-303)	0.019
Cayados [‡] (cel/ml)	0 (0-0)	0.000
Hb [‡] (g/dl)	16.5 (15.1-18)	0.042
PCR [‡]	0.2 (0.1-0.4)	0.000
Procalcitonina [‡]	1.43 (0.55-6.75)	0.000
RT-PCR E.Coli [§]	0 (0.00)	
RT-PCR SGB [§]	20 (36.36)	
Hemocultivo [§]	2 (3.64)	
Urocultivo [§]	0 (0.00)	
Cultivo LCR [§]	0 (0.00)	
Otros Cultivos [§]	0 (0.00)	
Días UCIN [†]	14 (7-30)	0.000

Fuente: *p<0.05 indica distribución no normal, † X (SD), ‡ M (RIC), § n (%). X: media, SD: desviación estándar, M: mediana, RIC: rango intercuartilico, n: frecuencia absoluta, %: frecuencia relativa, Hb: hemoglobina, PCR: proteína C reactiva, RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, SGB: estreptococo del grupo B, LCR: liquido cefalorraquídeo, UCIN: unidad de cuidado intensivo neonatal.

6.2.2 Análisis bivariado. Se ejecuto inicialmente un análisis bivariado según prematuridad, ya que es uno de los factores de riesgo más representativos para el desarrollo de sepsis neonatal temprana, encontrando varias diferencias

estadísticamente significativas al comparar prematuros con neonatos no prematuros. Ver tabla 4.

Tabla 4. Análisis bivariado por prematuridad, variables destacadas.

VARIABLE		PRE TÉRMINO n= 38 (69.09)	A TÉRMINO n= 17 (30.91)	p*
Edad De Nacido (Horas)‡		2 (1-6)	6 (2-36)	0.011*
Sexo§	Masculino	23 (62.16)	11 (64.71)	0.857
Procedencia §	Rural	9 (26.47)	5 (35.71)	0.728
SGSSS§	Subsidiado	26 (68.42)	12 (70.59)	0.286
Edad Materna‡		26.5 (21-30)	29 (23-32)	0.483
Corioamnionitis§		5 (13.51)	3 (17.65)	0.696
RPM§	No	24 (63.16)	11 (64.71)	0.856
	0-18 Horas	9 (23.68)	5 (29.41)	
	19-24 Horas	2 (5.26)	1 (5.88)	
	> 24 Horas	3 (7.89)	0 (0.00)	
Peso Al Nacer§	< 1000 g	4 (10.53)	0 (0.00)	0.000*
	1000-1500 g	9 (23.68)	2 (11.76)	
	1501-2500 g	25 (65.79)	3 (17.65)	
	2501-3500 g	0 (0.00)	8 (47.06)	
	> 3500 g	0 (0.00)	4 (23.53)	
FR‡		46.5 (42-52)	42 (42-45)	0.042*
Temperatura‡		36.2 (35.9-36.5)	36.3 (36-36.55)	0.231
FC§	Normal	11 (28.95)	9 (52.94)	0.304
	Bradycardia	5 (13.16)	1 (5.88)	
	Taquicardia	22 (57.89)	7 (41.18)	
Leucocitos‡ (cel/ml)		9700 (5800-13400)	12200 (10200-15500)	0.050*
Neutrófilos‡ (%)		54.5 (43-66.5)	63 (55.9-75)	0.018*
Neutrófilos‡ (cel/ml)		5395 (2258-7712)	7828 (6324-10787)	0.028*
Plaquetas‡ (10 ³ cel/ml)		170 (124-264)	266 (239-348)	0.004*
Cayados‡ (cel/ml)		0 (0-0)	0 (0-1.1)	0.104
Hb‡ (g/dl)		16.7 (15.15-17.95)	15.8 (14.8-18)	0.682
PCR‡		0.2 (0.1-0.4)	0.2 (0.1-1.1)	0.527

RT-PCR SGB [§]	14 (36.84)	6 (35.29)	0.912
Procalcitonina [‡]	3.2 (0.71-8.79)	0.99 (0.28-1.84)	0.098
Días UCIN [‡]	19 (10-30)	7 (6-10)	0.000*

Fuente: *p<0.05 indica significancia estadística, † X (SD), ‡ M (RIC), § n (%). X: media, SD: desviación estándar, M: mediana, RIC: rango intercuartilico, n: frecuencia absoluta, %: frecuencia relativa, SGSSS: sistema general de seguridad social en salud, RPM: ruptura prematura de membranas, FR: frecuencia respiratoria, FC: frecuencia cardiaca, Hb: hemoglobina, PCR: proteína C reactiva, RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, SGB: estreptococo del grupo B, UCIN: unidad de cuidado intensivo neonatal.

El tiempo de ingreso a UCIN desde el nacimiento fue en promedio 3 veces menor en el grupo de neonatos prematuros, con una mediana de 2 horas (RIC: 1-6), y un peso menor de 1500 g en el 34.21%, estando todos por debajo de 2500 g. La mediana de la FR fue de 46.5 rpm (RIC: 42-52) con un valor significativamente menor en el conteo de leucocitos, neutrófilos y plaquetas; todos estas variables con una diferencia de p<0.05 con respecto al grupo de no prematuros. Además de un aumento de más del doble en las estancia en la UCIN. El resto de variables no presento diferencias estadísticamente importantes. Ver tabla 4.

Adicionalmente se realizo un análisis para estudiar los factores de riesgo asociados a la probabilidad de infección por SGB en este grupo de pacientes. Ver tabla 5.

Tabla 5. Análisis bivariado para sepsis por SGB, variables destacadas.

VARIABLE		SGB (+) n= 20 (36.36)	SGB (-) n= 35 (64.64)	p*
Edad De Nacido (Horas) [‡]		2 (1-2)	2 (1-16)	0.211
EG Capurro [‡]		34 (30-37)	32 (30-35)	0.349
Sexo [§]	Masculino	10 (52.63)	24 (68.57)	0.247
Procedencia [§]	Rural	6 (37.50)	8 (25.00)	0.369
SGSSS [§]	Subsidiado	15 (75.00)	23 (65.71)	0.847
Edad Materna [‡]		28.5 (21.5-30)	26 (21-32)	0.624
Paridad [‡]		3 (2-4)	2 (1-3)	0.141
Parto [§]	Vaginal	7 (41.18)	10 (30.30)	0.442
Corioamnionitis [§]		4 (21.05)	4 (11.43)	0.431
RPM [§]	No	15 (75.00)	20 (57.14)	0.158

	0-18 Horas	2 (10.00)	12 (34.29)	
	19-24 Horas	1 (5.00)	2 (5.71)	
	> 24 Horas	2 (10.00)	1 (2.86)	
Peso Al Nacer [§]	< 1000 G	1 (5.00)	3 (8.57)	
	1000-1500 G	5 (25.00)	6 (17.14)	
	1501-2500 G	9 (45.00)	19 (54.29)	0.270
	2501-3500 G	5 (25.00)	3 (8.57)	
	> 3500 G	0 (0.00)	4 (11.43)	
Talla [‡]		42.5 (39-47.75)	44 (40-48)	0.593
FR [‡]		52 (43-52)	42 (40-48)	0.010*
Temperatura [‡]		36.2 (38.85-36.4)	36.2 (36-36.5)	0.293
FC [§]	Normal	3 (15.00)	17 (48.57)	
	Bradicardia	2 (10.00)	4 (11.43)	0.031*
	Taquicardia	15 (75.00)	14 (44.00)	
Leucocitos [‡] (cel/ml)		12350 (9400-17400)	9700 (6000-12200)	0.050*
Neutrófilos [‡] (cel/ml)		7137 (4888-10511)	5214 (2622-7828)	0.101
Plaquetas [‡] (10 ³ cel/ml)		2.59 (153-325)	220 (139-266)	0.229
Cayados [‡] (cel/ml)		0 (0-0)	0 (0-0)	0.554
Hb [‡] (g/dl)		15.75 (14.95-17.95)	16.7 (15.2-18)	0.424
PCR [‡]		0.2 (0.1-0.4)	0.2 (0.1-0.4)	0.883
Procalcitonina [‡]		3.46 (0.71-17.64)	1.43 (0.41-4.76)	0.459
Días UCIN [‡]		15 (6-30)	12 (8-38)	0.949

Fuente: *p<0.05 indica significancia estadística, † X (SD), ‡ M (RIC), § n (%). X: media, SD: desviación estándar, M: mediana, RIC: rango intercuartílico, n: frecuencia absoluta, %: frecuencia relativa, SGB: estreptococo del grupo B, EG: edad gestacional, SGSSS: sistema general de seguridad social en salud, RPM: ruptura prematura de membranas, FR: frecuencia respiratoria, FC: frecuencia cardiaca, Hb: hemoglobina, PCR: proteína C reactiva, UCIN: unidad de cuidado intensivo neonatal.

Encontrando que la taquipnea al nacimiento, la alteración de la frecuencia cardiaca (FC) al ingreso a la UCIN, y un conteo leucocitario mayor a 12000 cel/ml son significativamente diferentes (p<0.05) en este grupo de pacientes con sepsis neonatal temprana de etiología por SGB con respecto al resto de etiología no definida.

Por otro lado, se efectuó un análisis de correlación con las diferentes variables cuantitativas, encontrando una correlación muy fuerte (>90%) de las edades gestacionales (EG) estimadas por ecografía del primer trimestre y por capurro ($p < 0.05$).

Sin embargo, no se encontró ninguna relación de colinealidad entre la FR, el conteo de leucocitos y los niveles de PCR y Procalcitonina, entre si.

6.2.3 Análisis multivariado. Finalmente, ya habiendo identificado las potenciales variables de asociación, interacción y/o confusión, se procede a realizar un análisis multivariado para la caracterización de probables factores de riesgo para el desarrollo de sepsis neonatal temprana (SNT) por SGB; donde el riesgo debe interpretarse como probabilidad. Ver tabla 6.

Tabla 6. Análisis multivariado para probabilidad de sepsis por SGB.

Regresión Poisson^{II} Sepsis Neonatal por SGB

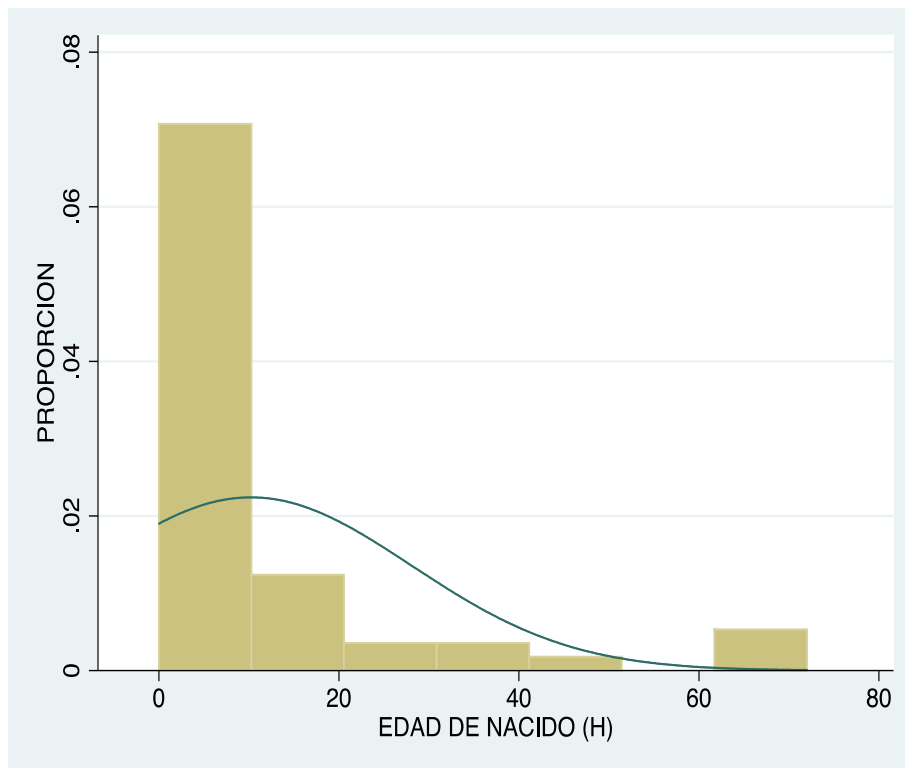
VARIABLE	RP ^I	IC	p*
RPM 19-24 horas	3.40	(2.27 - 5.08)	0.000*
Taquicardia	3.45	(1.14 - 10.47)	0.029*
Taquipnea	3.20	(1.53 - 6.67)	0.002*
Δ FR10	1.71	(1.11 - 2.62)	0.014*
PCR	1.04	(1.01 - 1.06)	0.001*
Procalcitonina	1.04	(1.00 - 1.11)	0.063

Fuente: ^{II}Regresión de Poisson no ajustada, ^IRP cruda, SGB: estreptococo del grupo B, RP: Razón de prevalencia, IC: intervalo de confianza, * $p < 0.05$ indica significancia estadística, RPM: ruptura prematura de membranas, Δ FR10: delta para el RP por cada 10 unidades de variación en FR, FR: frecuencia respiratoria, PCR: proteína C reactiva.

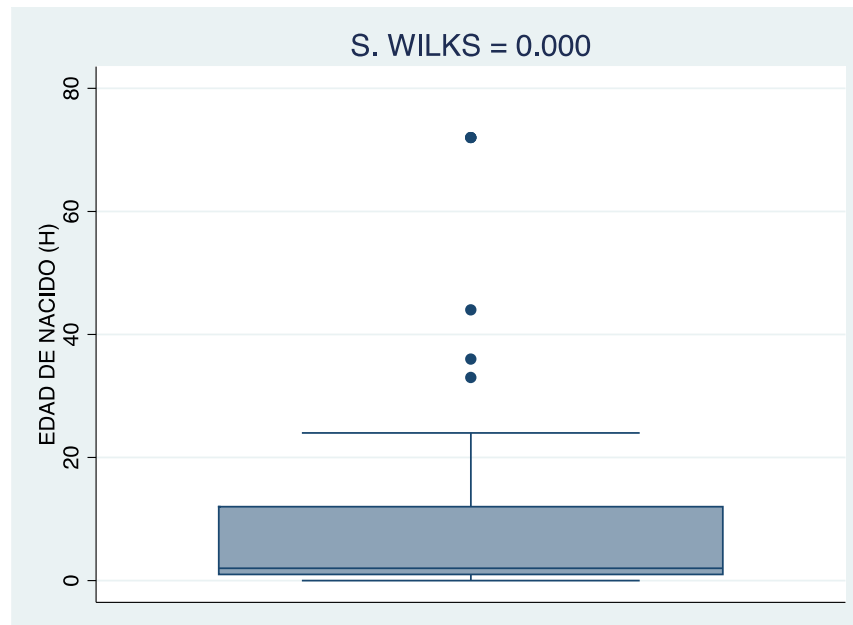
Se ejecutó una regresión de Poisson para la identificación de estos posibles factores de riesgo mediante el cálculo de razones de prevalencia (RP); encontrado que la ruptura prematura de membranas (RPM) de 19 a 24 horas, puede aumentar hasta 5 veces el riesgo o la probabilidad de adquirir una SNT por SGB, $p < 0.05$. Así mismo, la taquicardia y/o la taquipnea aumentan hasta 10 y 6 veces el riesgo

para dicha patología respectivamente, encontrando que por cada 10 rpm por encima de 60 rpm, el riesgo aumenta hasta 2 veces más. La PCR aumenta un 4% la probabilidad de padecer SNT por SGB por cada unidad por encima de su valor normal. Sin embargo, la procalcitonina, no arrojó resultados estadísticamente significativos.

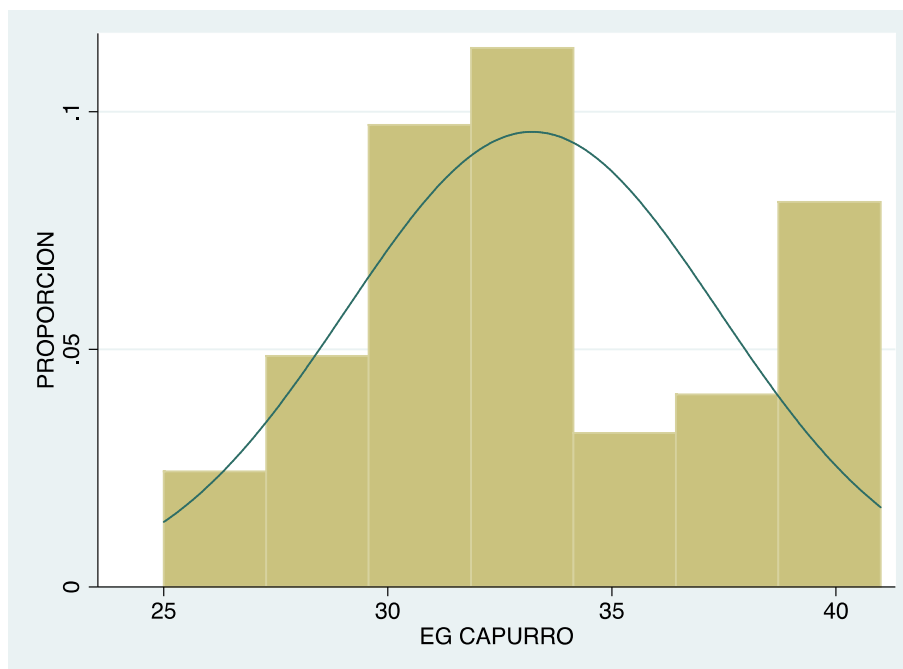
Grafica 4. Distribución edad de nacido en horas.



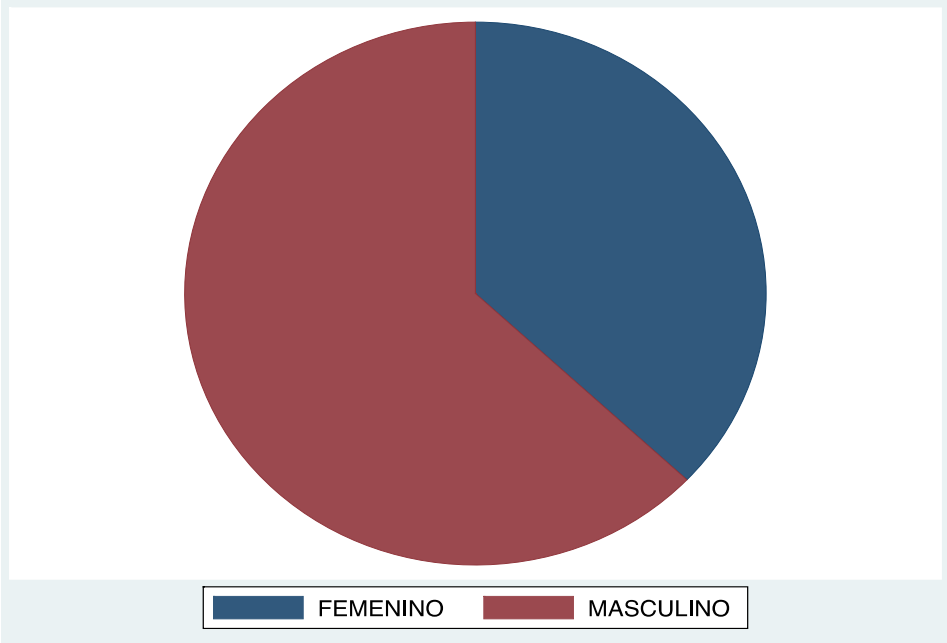
Grafica 5. Distribución edad de nacido en horas.



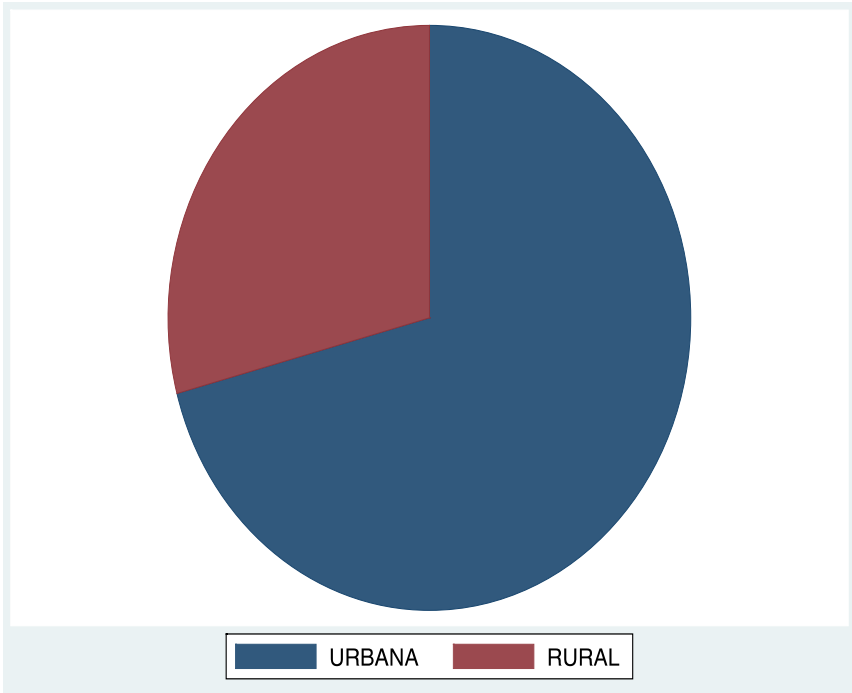
Grafica 6. Distribución edad gestacional por capurro.



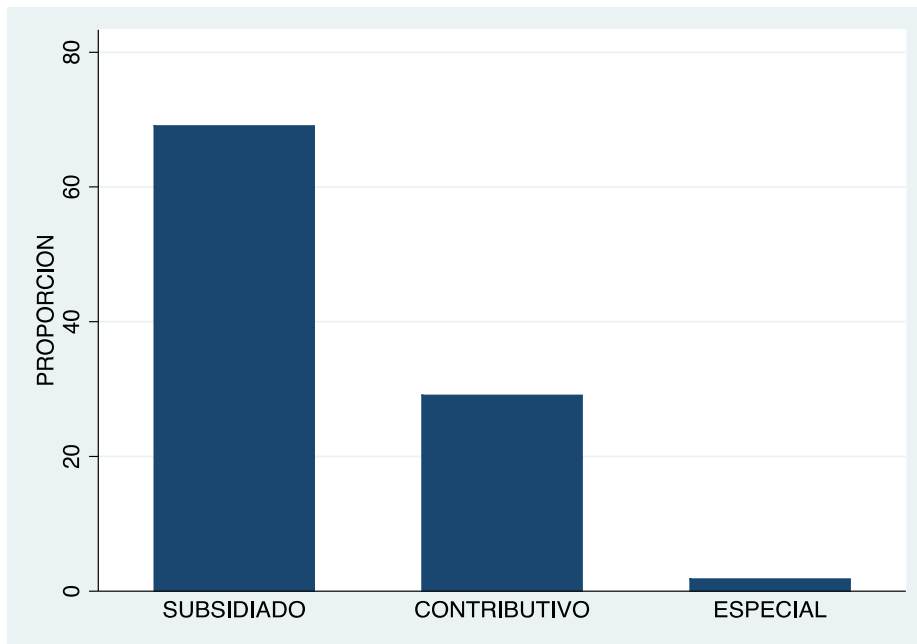
Grafica 7. Distribución sexo.



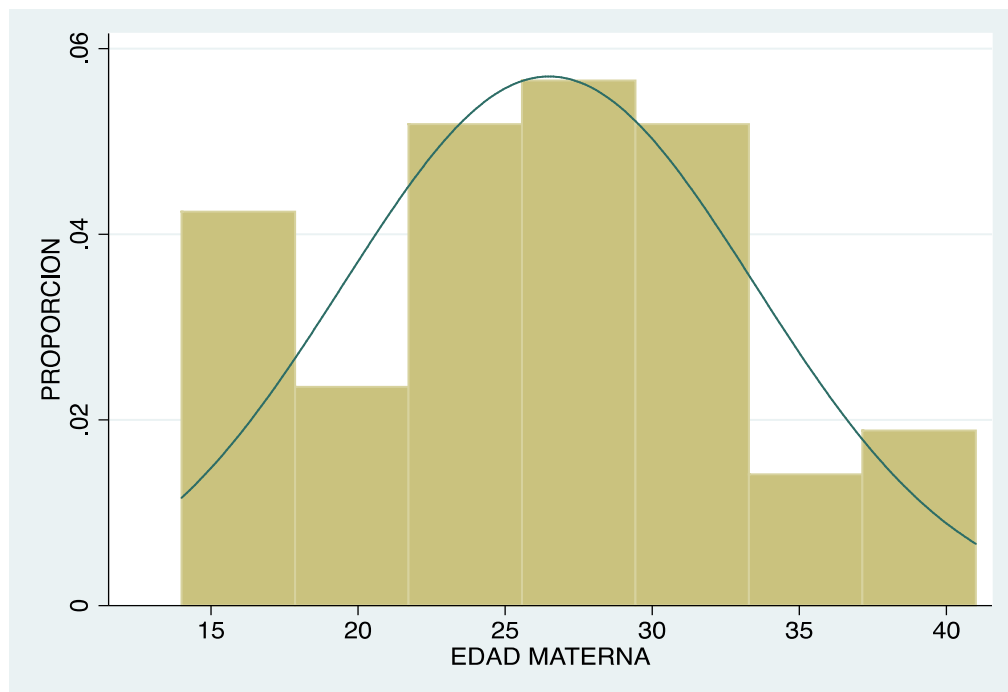
Grafica 8. Distribución región de procedencia.



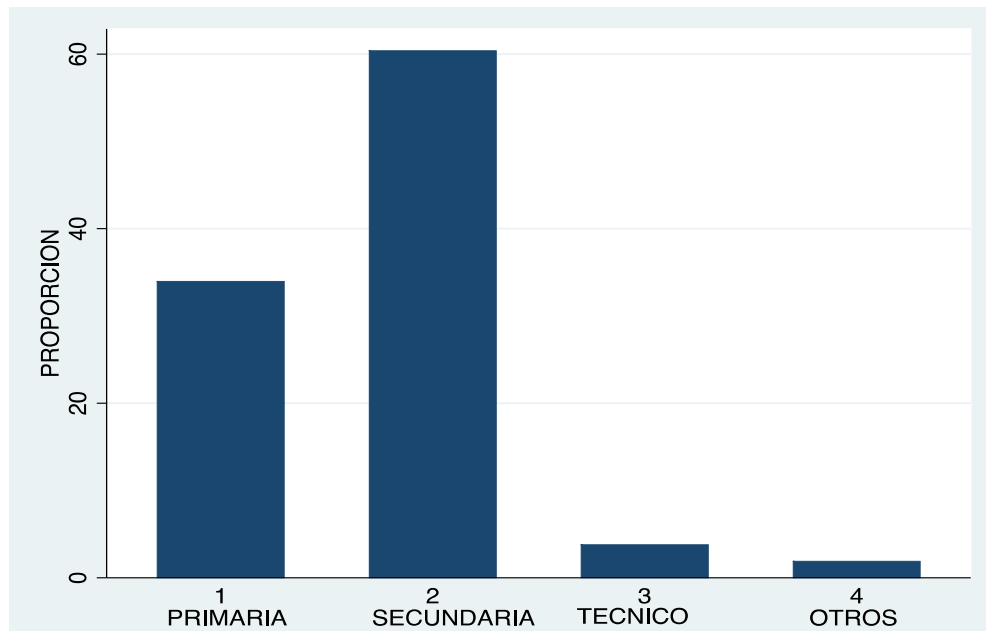
Grafica 9. Distribución régimen de seguridad social en salud.



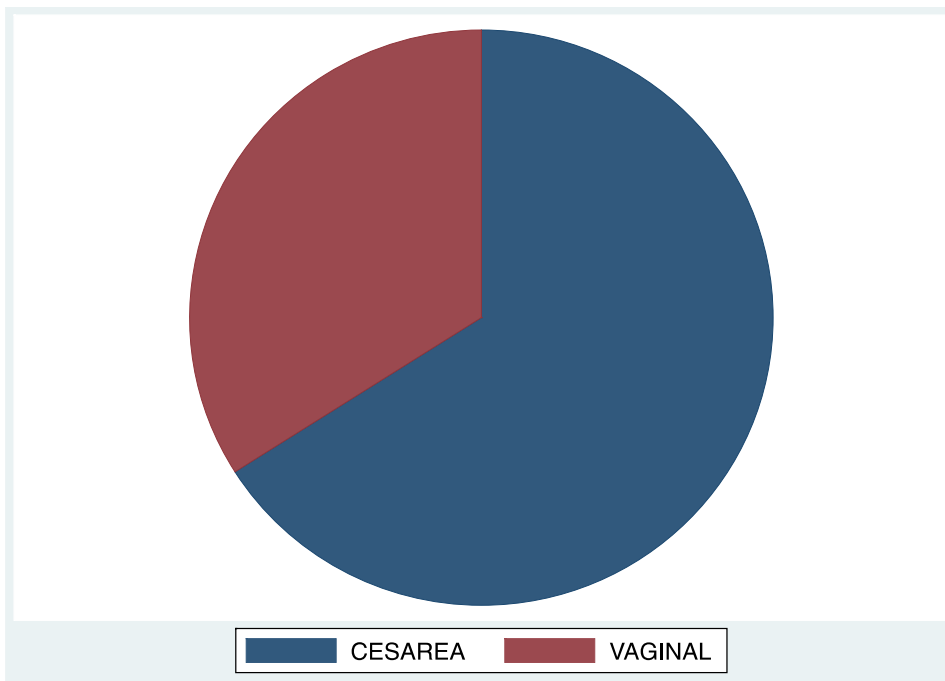
Grafica 10. Distribución edad materna.



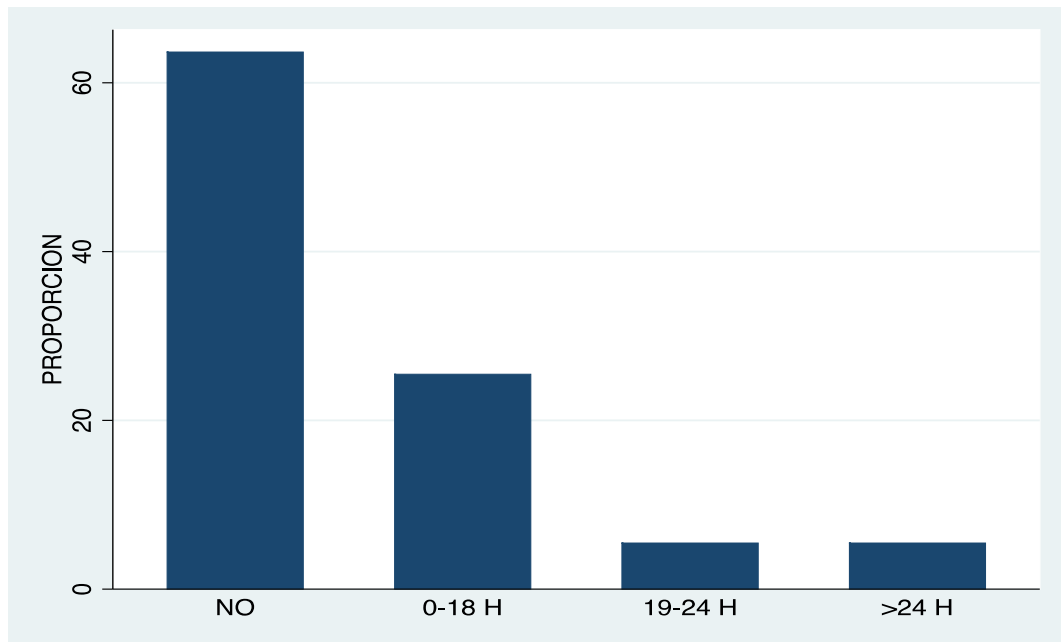
Grafica 11. Distribución escolaridad materna.



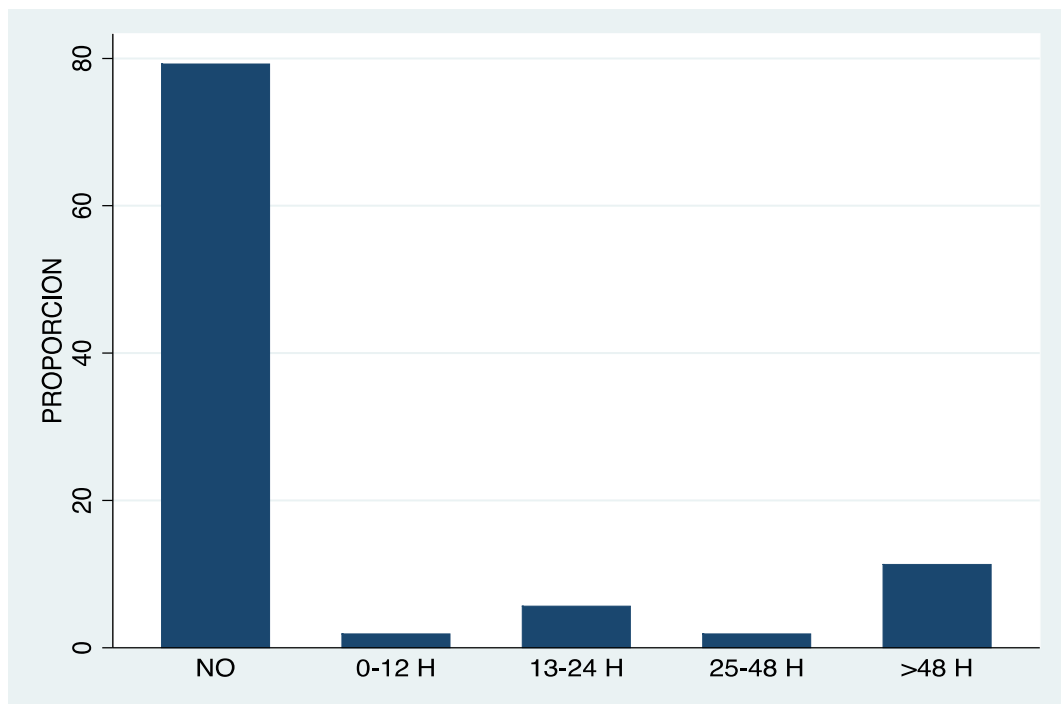
Grafica 12. Distribución vía del parto.



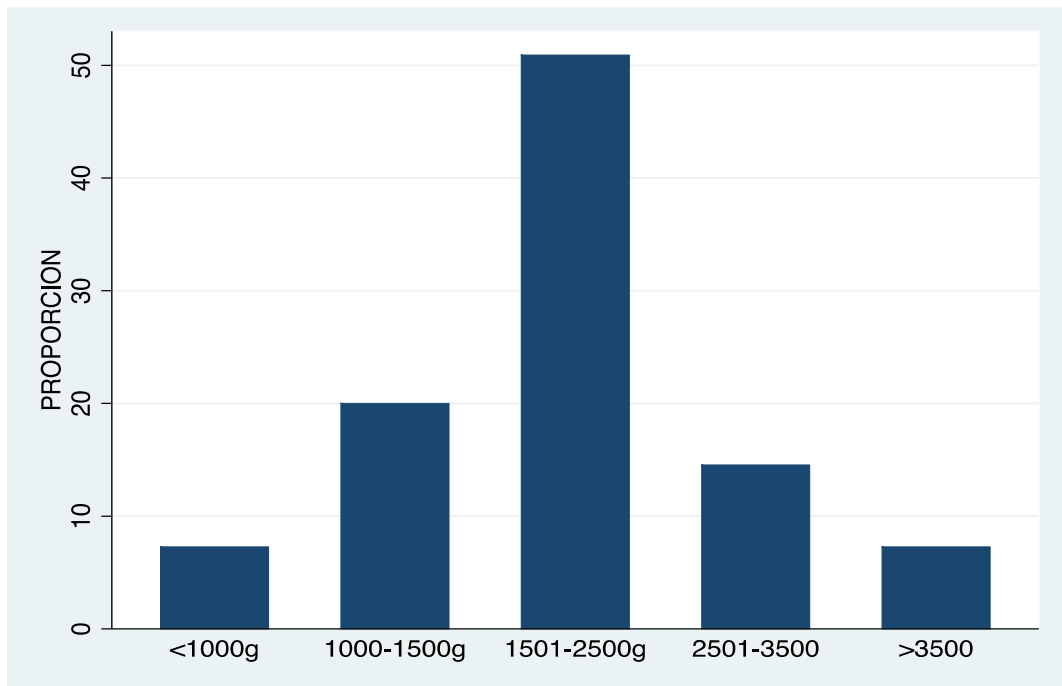
Grafica 13. Distribución ruptura prematura de membranas.



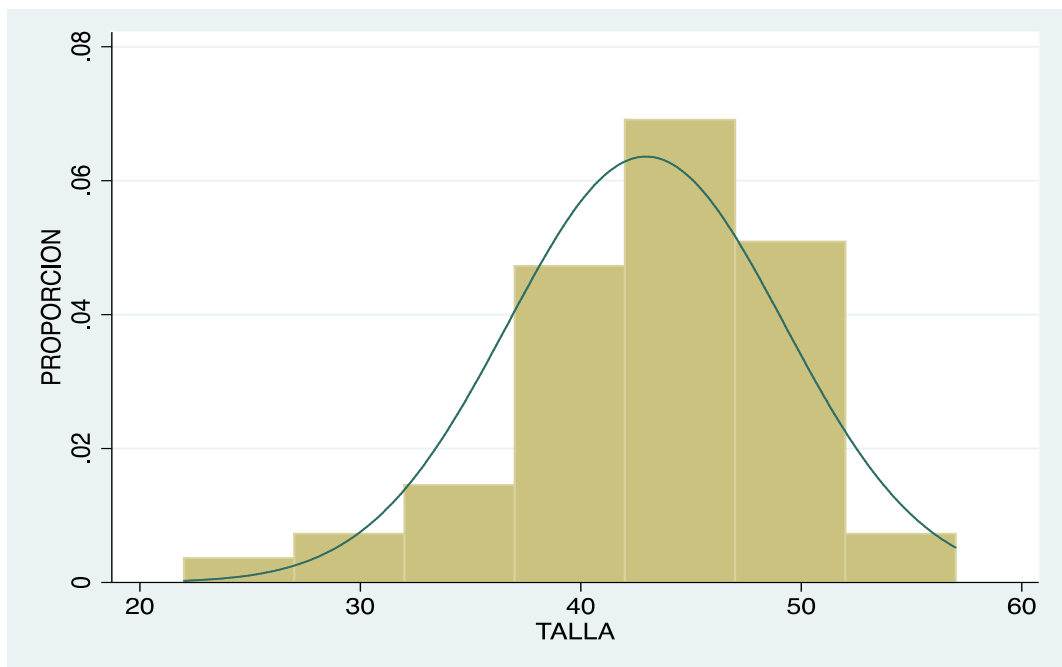
Grafica 14. Distribución antibiótico anteparto.



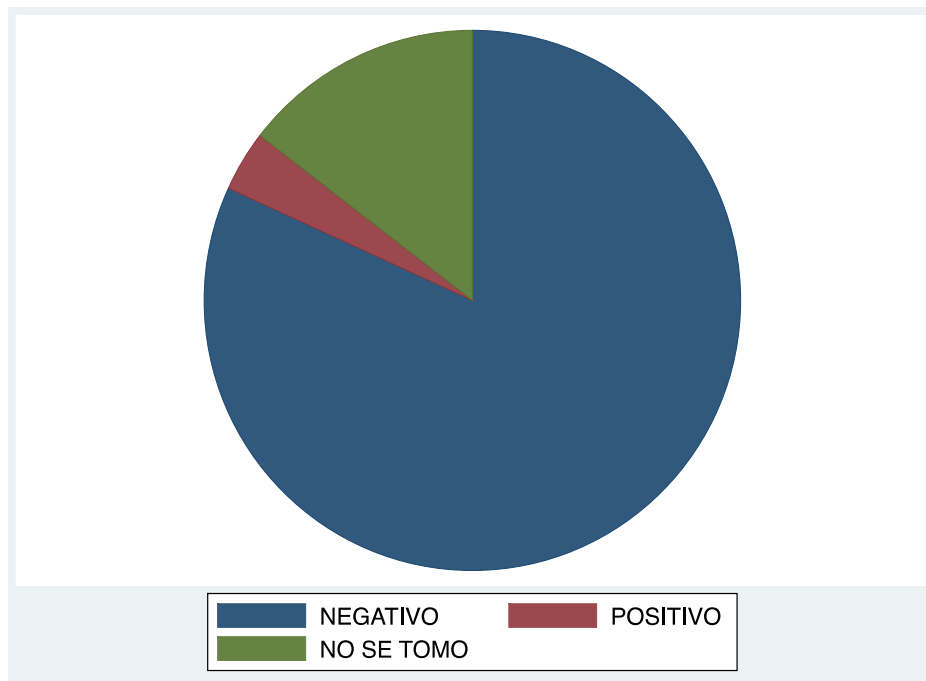
Grafica 15. Distribución peso al nacer.



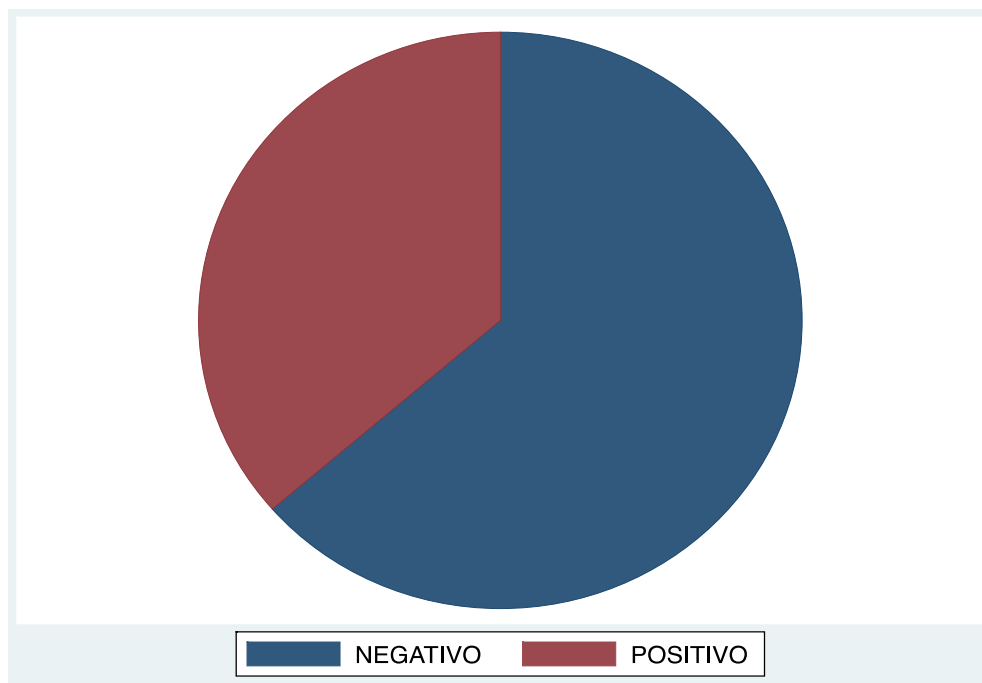
Grafica 16. Distribución talla al nacer.



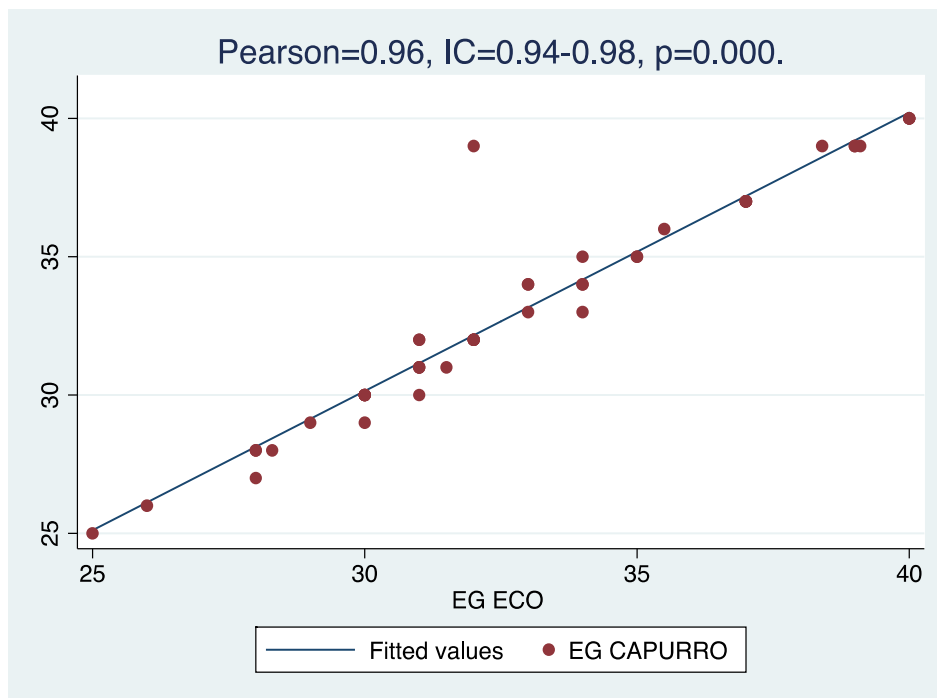
Grafica 17. Distribución hemocultivos.



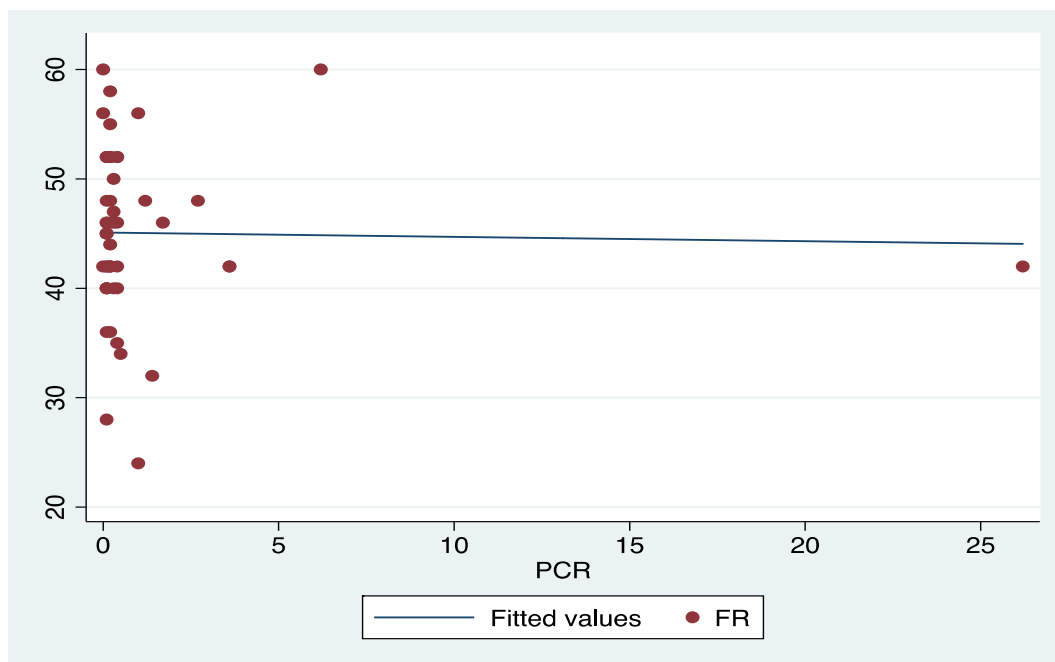
Grafica 18. Distribución RT-PCR para SGB.



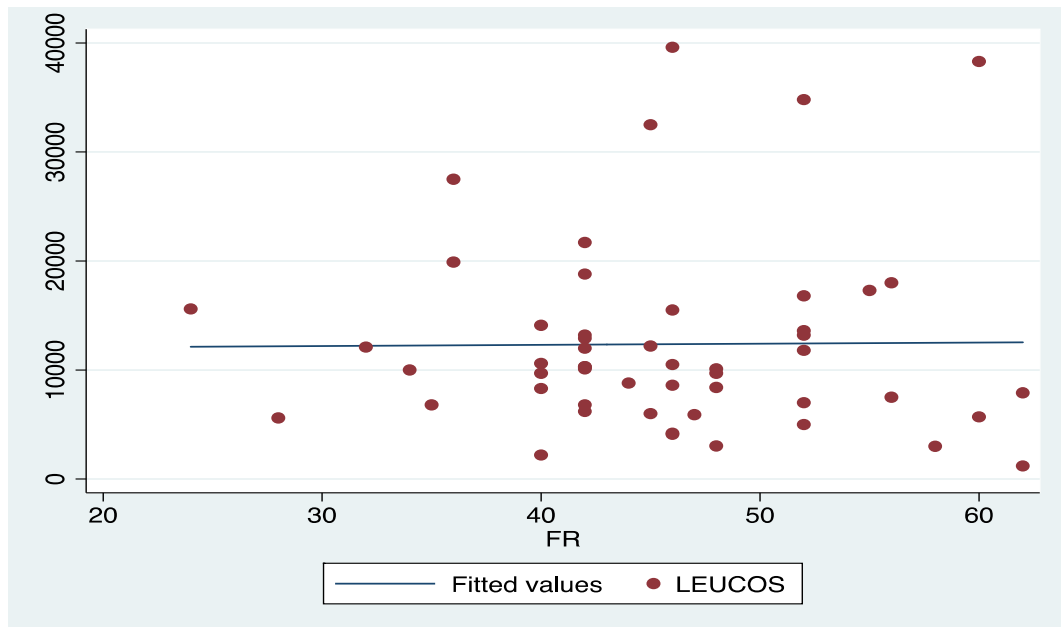
Grafica 19. Correlación edades gestacionales por ecografía y capurro.



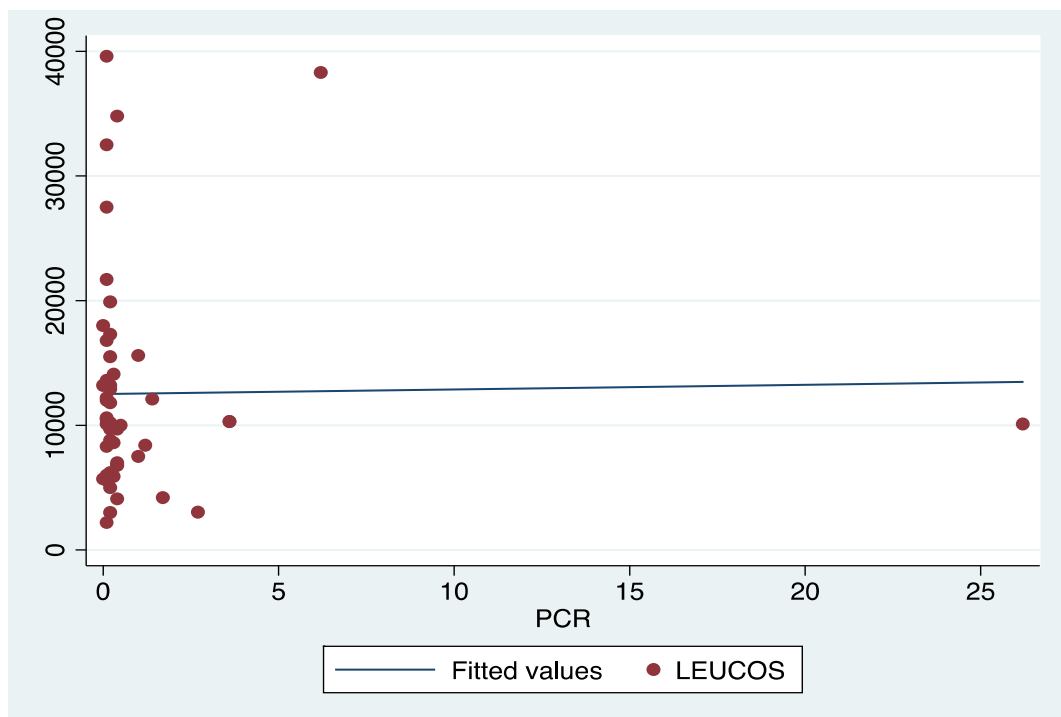
Grafica 20. Correlación frecuencia respiratoria y PCR.



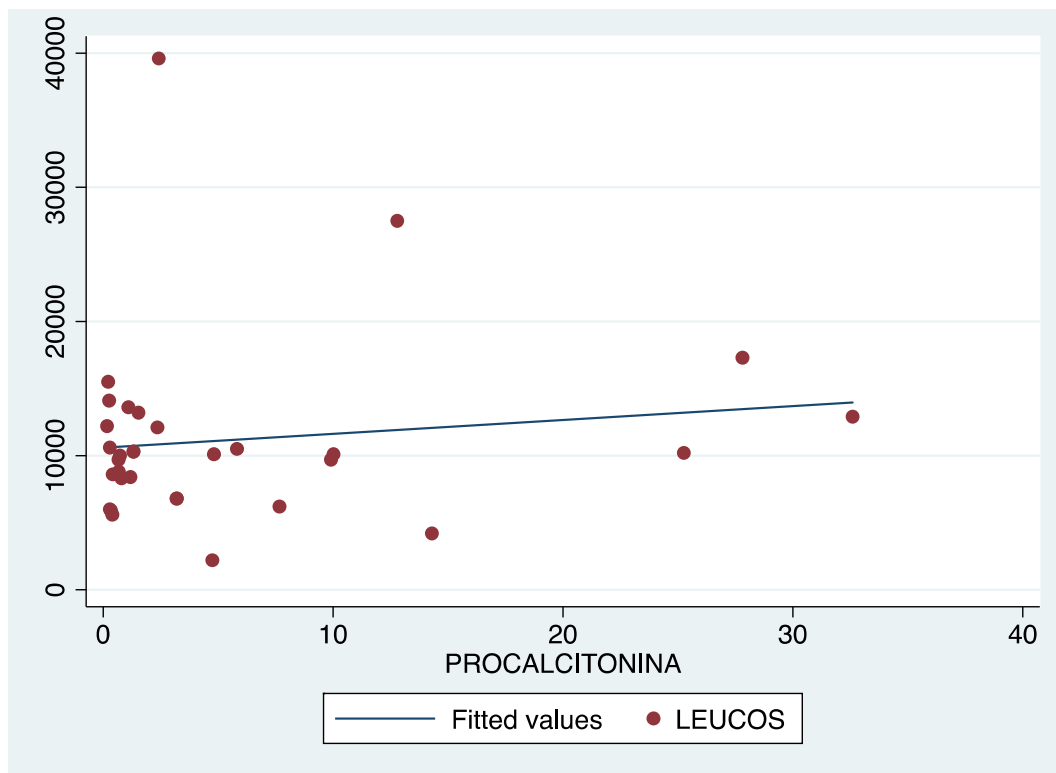
Grafica 21. Correlación Frecuencia respiratoria y conteo de leucocitos.



Grafica 22. Correlación conteo de leucocitos y PCR.



Grafica 23. Correlación conteo de leucocitos y procalcitonina.



Finalmente, se debe entender que dado el diseño metodológico del estudio y el tamaño de muestra, no se cuenta con el poder suficiente para ajustar la confusión, por lo que se presentan RPs crudas que deben ser interpretadas como posibles factores de riesgo y no como factores de riesgo independientes.

7. DISCUSION

- En el trabajo no se pueden determinar factores de riesgo para sepsis neonatal por que todos los paciente tienen diagnostico de ingreso al estudio de sepsis neonatal (se requiere para próximos estudios un grupo control de paciente con sepsis neonatal vs paciente sin sepsis neonatal para evaluar factores de riesgo para sepsis neonatal)
- Se realizo según el estudio búsqueda de factores de riesgo para infección por *Streptococcus agalactiae* y sepsis neonatal
- Se encontró en las variables clínicas que el 78 % de la población con sepsis neonatal temprana tenían un peso al nacer inferior de 2500 gramos
- Se encontró que la taquicardia y la taquipnea son variables clínicas que se encuentran como factor de riesgo para sepsis neonatal temprana
- El 70,37 % de los pacientes con sepsis neonatal temprana presento distres respiratorio
- En el análisis de las variables paraclínicas la RT-PCR fue negativa para *E coli* en el 100 % de los casos
- En el análisis de las variables paraclínicas la RT-PCR fue positiva para en el *Streptococcus agalactiae* 36,6 % de los casos
- Los hemocultivos solo fueron positivos en solo el 3,64 % de los casos de paciente con dx clínico de sepsis neonatal
- La prevalencia de RT-PCR fue positiva para en el *Streptococcus agalactiae* 36,6 % justificaría la búsqueda sistemática de colonización por este germen en futuros estudios.

- Por cada 10 respiraciones por minuto que se aumente de 60, se incrementa 1,7 veces la probabilidad de tener sepsis neonatal temprana por *Streptococcus agalactiae*

8. CONCLUSIONES

Se identifico el *Streptococcus agalactiae* en el 36,6 % de los casos y ninguna identificación para *Escherichia coli* en pacientes con signos y síntomas clínico de sepsis neonatal temprana.

Los hemocultivos en paciente con diagnostico clínico de sepsis neonatal temprana en nuestro medio tienen muy baja sensibilidad y especificidad y con respecto a *Streptococcus agalactiae* ninguna especificidad y sensibilidad

A pesar de que en el estudio todas las muestras dieron negativas para RT-PCR para *E.coli* se necesitan nuevos estudios y ampliar muestra poblacional para corroborar estos datos.

La taquipnea y la taquicardia como factores de riesgo se encuentran en mayor proporción en paciente con sepsis neonatal por *Streptococcus agalactiae*

La ruptura prematura de membranas mayor a 19 horas aumenta en 3,1 veces el riesgo de tener sepsis neonatal por *Streptococcus agalactiae*, por lo que se concluye que demora en el inicio de antibiótico podría ser un factor de riesgo para de sepsis neonatal por *Streptococcus agalactiae*, que requería de estudios adicionales.

La alta prevalencia de el *Streptococcus agalactiae* justificaría el inicio sistemático de profilaxis en las mujeres en trabajo de parto en nuestro medio

El aumento de la PCR aumenta el riesgo de tener sepsis neonatal por *Streptococcus agalactiae*

La procalcitonina no se asocia como factor de riesgo para tener sepsis neonatal temprana por *Streptococcus agalactiae* lo que nos llevaría a evaluar de forma más profunda teniendo en cuenta el costo/beneficio para la solicitud de esta prueba en nuestro medio, pero se necesitaría mas estudios para poder recomendarla

Finalmente, se debe entender que dado el diseño metodológico del estudio y el tamaño de muestra, no se cuenta con el poder suficiente para ajustar la confusión, por lo que se presentan RPs crudas que deben ser interpretadas como posibles factores de riesgo y no como factores de riesgo independientes.

9. RECOMENDACIONES

Según protocolo de la sociedad colombiana de ginecología colombiana y los resultado de RT_PCR en nuestra instituion se debe realizar la instauración de una guía clínica que contemple el tamizaje y profilaxis para Streptococcus del grupo B a maternas entre la semana 35 y 37,6 de gestación y la disminución de su impacto en sepsis neonatal

BIBLIOGRAFIA

Andrade, C.; Motta, Y. y Motta, A. 2007. Morbimortalidad de los prematuros nacidos en el hospital Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva de agosto de 2006 a enero de 2007. Trabajo de grado para optar el título de médico general. Neiva: Universidad Surcolombiana. Facultad de salud. Programa de medicina. Departamento de Pediatría.

Benjamin DK Jr, Miller W, Garges H, Benjamin DK, McKinney RE Jr, et al. 2010. Bacteremia, central catheters, and neonates: when to pull the line; Citado por Edmond, K. New Approaches to Preventing, Diagnosing, and Treating Neonatal Sepsis. En: PLOS medicine. [En línea]. Vol 7, No 3 (9 de marzo de 2010) Consultado [30/04/2013]. Disponible en: <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000213>

Berger M., O'Shea J., Cross A.S, et al. 2010. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation; Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Camacho G. Andrés. 2013. Neonatal Infectious Diseases Evaluation of Neonatal Sepsis. Pediatric Clinics of North America. [En línea]. Volume 60, Issue 2 (2013). [Consultado 30/04/2013]. Disponible en [http://www.pediatric.theclinics.com/article/S0031-3955\(12\)00205-2/](http://www.pediatric.theclinics.com/article/S0031-3955(12)00205-2/)

Cifuentes, Yolanda et al. 2005. Perfil microbiológico de aislamientos en unidades neonatales en un hospital de tercer nivel de Bogotá, Colombia. En: Revista de salud pública [En línea]. Vol. 7, N°2 (2005). [Consultado 8 Junio 2013]. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642005000200007

Coronell, Wilfrido y cols. 2009. Sepsis neonatal. En Revista de enfermedades infecciosas en pediatría. [En línea]. Vol. XXIII Núm. 90(2009). [Consultado 21/04/2013]. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/revenfinfped/eip-2009/eip094f.pdf>

Díaz, Elizabeth et al. 2007. Morbimortalidad de neonatos hijos de madres pertenecientes al programa de alto riesgo obstétrico del Hospital Universitario de Neiva Enero y febrero del año 2007. Trabajo de grado para optar el título de médico general. Neiva: Universidad Surcolombiana. Facultad de salud. Programa de medicina. Departamento de ginecología y obstetricia.

Duke T., Kelly J., Subhi R., Downie L. 2013. Antibiotic resistant sepsis in newborns and infants: a major threat to achieving MDG-4 targets. Women's and Children's Health Knowledge Hub. Centre for International Child Health, University of Melbourne, Australia.

Edmond, K. 2010. New Approaches to Preventing, Diagnosing, and Treating Neonatal Sepsis. En: PLOS medicine. [En línea]. Vol 7, No 3 (9 de marzo de 2010) Consultado [30/04/2013]. Disponible en: <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000213>

Engle W.A., McGuire W.A., Schreiner R.L., et al. 2010. Neutrophil storage pool depletion in neonates with sepsis and neutropenia; Citado por Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, et al. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization; Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Gibello A, Blanco M, Domínguez L y Fernández-Garayzábal J. 2001. Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. Revista AquaTIC. Nro. 15, Noviembre

Falciglia, Gustave. 2012. Antibiotic Therapy and Early Onset Sepsis. En NeoReviews. [En línea]. Vol 13, No 2 (2 de febrero de 2012); p. 86-93. [Consultado 27 Junio 2013]. Disponible en <http://neoreviews.aappublications.org/content/13/2/e86>

Figueras J., Gomez L., Rodriguez J.M., et al. 2010. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis; Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29

Junio 2013]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Fonseca, Carlos. 2006. Caracterización de la ruptura prematura de membranas de pretérmino, análisis de mortalidad perinatal en el Hospital Universitario de Neiva del 1 de julio del 2003 al 30 de julio de 2006, Citado por Lozano, Liliana del Pilar et al. Morbilidad y mortalidad por Sepsis neonatal en hijos de madres con ruptura prematura de membranas y (o) corioamnionitis en el hospital universitario de Neiva "HMP" durante el año 2007-2008. Trabajo de grado para optar el título de pediatra. Neiva: Universidad Surcolombiana. Facultad de salud. Programa de medicina. Departamento de Pediatría. 2010.

Gleason, C. y Devaskar, S. Avery's Diseases of the Newborn: Neonatal Bacterial Sepsis. 9ed. Philadelphia. Elsevier SAUNDERS. ISBN: 978-1-4377-0134-0

GOBERNACION DEL HUILA 2011. Informe de gestión para la garantía de los derechos de la infancia, la adolescencia y la juventud. En: Gobernación del Huila. (Julio de 2011).

Ibáñez, Carlos Ferney et al. 2007. Incidencia de Sepsis neonatal temprana en neonatos con antecedente de ruptura prematura de membranas en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva del 1 de enero hasta el 30 de abril de 2007. Trabajo de grado para optar el título de médico general. Neiva: Universidad Surcolombiana. Facultad de salud. Programa de medicina. Departamento de Pediatría.

Jordan, J. 2010. Molecular diagnosis o neonatal Sepsis. En: Clinics in Perinatology. [En línea]. Vol 37, No. 2 (Junio 2010). [Consultado 16/06/2013]. Disponible en:
<https://www.dropbox.com/s/sqdrbhytcnua1ei/s0095510810000199.pdf>

Jordan JA, Durso MB. 2005. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for Sepsis, Citado por EDMOND, Karen. New Approaches to Preventing, Diagnosing, and Treating Neonatal Sepsis. En: PLOS medicine. [En línea]. Vol 7, No 3 (9 de marzo de 2010) Consultado [30/04/2013]. Disponible en:
<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000213>

Hoorfar J., Malorny B., Cook A., Wagner M., Fach P. 2004. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J. Clinical Microbiol.* 42: 1863–1868

Khalid N, Haque. 2005. Definitions of bloodstream infection in the newborn. *En: Pediatric Critical Care Medicine*. [En línea]. Vol. 6, N°3 (Mayo 2005). p.45-49. [Consultado 16 de junio de 2013]. Disponible en: http://journals.lww.com/pccmjournal/Fulltext/2005/05001/Definitions_of_bloodstream_infection_in_the.11.aspx

Levy O. 2010. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates; Citado por y Kalayci AG, Adam B, Yilmazer F, et al. The value of immunoglobulin and complement levels in the early diagnosis of neonatal sepsis; Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *En Clinics in perinatology*. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Mancuso, G. 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *En Nature Immunology*. [En línea]. Vol 10, No 6 (Junio de 2009); pp. 587-94. [Consultado 28 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sinab.unal.edu.co:2984/ni/journal/v10/n6/pdf/ni.1733.pdf>

Marre van den Brand , Remco P.H. Peters b, Arnold Catsburg, Development of a multiplex real-time PCR assay for the rapid diagnosis of neonatal late onset sepsis, *Journal of Microbiological Methods*, 2014

M. Tefvik Dorak (Ed.) 2007. Real-time PCR. This edition published in the Taylor & Francis e-Library. ISBN: 0-4153-7734-X (Print Edition)

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCION SOCIAL. y COLCIENCIAS. 2013. Guía de práctica clínica. Recién nacido: sepsis neonatal temprana. Tratamiento para Sepsis neonatal temprana. Bogotá D.C. Colombia: Abril de 2013. 45 p. ISBN: 978-958-8838-02-1

-----Plan Decenal de Salud Pública, PDSP, 2012–2021. En: Ministerio de salud y protección social. [En línea]. pp. 215. (15 de marzo de 2013). Bogotá. Disponible en:

<http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20-%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf>

Ng P.C., Li K., Chui K.M., et al. 2010. IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants, Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Polanco, Diana. 2004. Incidencia y factores de riesgo de Sepsis neonatal temprana en la Unidad de recién nacidos del Hospital Universitario de Neiva en el período enero a junio de 2004. Trabajo de grado para optar el título de médico general. Neiva: Universidad Surcolombiana. Facultad de salud. Programa de medicina. Departamento de Pediatría.

Richard A. Polin. 2012. Management of Neonates with Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. En: Pediatrics. [En línea]. Vol. 129 No. 5. [Consultado 25/04/2013]. Disponible en: <http://pediatrics.aappublications.org/content/129/5/1006.full>

Rodríguez, C.; Barrera, L. y Lozano, A. 2007. Factores maternos perinatales y posnatales de la Sepsis neonatal temprana en la UBN/UCIN del Hospital Universitario de Neiva entre el 1 de enero de 2007 a 1 de junio de 2007. Trabajo de grado para optar el título de médico general. Neiva: Universidad Surcolombiana. Facultad de salud. Programa de medicina. Departamento de Pediatría. 2007.

Sikora J.P., Chlebna D., Krzyzanska A. 2010. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants; Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

SOFIE SOMMER HEDEGAARD , KIRSTEN WISBORG & ANNE-METTE HVAS (Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis – a systematic review, *Infectious Diseases*, 2015; 47: 117–124) DOI: 10.3109/00365548.2014.971053

Spear M.L., Stefano J.L., Fawcett P., et al. 2010. Soluble interleukin-2 receptor as a predictor of neonatal Sepsis; Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Trinchieri G, Sher A. 2010. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence, Citado por Wynn, J. y Wong, H. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

Wynn, J. Y Wong, H. 2010. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. En Clinics in perinatology. [En línea]. Vol 37, No 2 (Junio 2010): pp. 439-479. [Consultado 29 Junio 2013]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510810000515>

ANEXOS

Anexo A. Instrumento para la recolección de datos clínicos.



Criterios de inclusión:

Todos los neonatos en sus primeros 3 días de vida postnatal con sospecha de Sepsis neonatal temprana hospitalizados en la Unidad de cuidado intensivo neonatal y Unidad de cuidado básico neonatal.

Criterios de exclusión:

Neonatos mayores de 3 días de vida postnatal

No diligenciamiento completo del consentimiento informado

Variables generales

Número de historia clínica: _____ Número de identificación: _____

Edad en horas de nacido: _____ Edad gestacional por ecografía de primer trimestre _____ Edad gestacional por capurro: _____

Fecha de nacimiento (hora/día/mes/año): ____/____/____/____
Sexo: Femenino _____

Masculino _____ Procedencia: _____ Urbana: _____
Rural: _____

Seguridad social: Contributivo _____ Subsidiado _____ Vinculado _____ Especial _____

Variables de la madre

Edad materna en años cumplidos: _____ Educación materna:
Analfabeta____ Primaria____ Secundaria____ Universidad____
Técnica/Tecnóloga_____ Otros_____

Paridad (Número de partos incluyendo el actual):_____ Modo de parto:
Vaginal____ Cesárea____

Corioamnionitis clínica: Si____ No____

Ruptura prematura de membranas (horas): 0-18____ 19-24____ >24____

Antibióticos intraparto: Si____ No____

Tiempo de antibióticoterapia previo al parto (horas): 0-12____ 13-24____ 25-
48____ >48____

STORCH materno: IgM Toxoplasma fecha_____ resultado_____

VDRL materno fecha_____ resultado_____ VIH materno fecha_____
resultado_____ Hepatitis B fecha_____ resultado_____

Variables del neonato

Peso al nacer (gramos): <1000__ 1001 a 1500__ 1501 a 2500__ 2501 a
3500__ >3501__

Talla: _____ Frecuencia respiratoria: _____ Temperatura: _____

Número de horas de signos y síntomas antes del ingreso a las unidades:

Signos y síntomas sugestivos de Sepsis neonatal temprana

Frecuencia cardíaca: Taquicardia____ Bradicardia____

Frecuencia respiratoria: Taquipnea____ Bradipnea____

Inestabilidad térmica (T: <35,5 o >38): Si____ No____

Distress respiratorio que inicia >4horas después del nacimiento: Si____ No____

Apnea: Si____ No____ Ictericia: Si____ No____ Intolerancia a la alimentación:
Si____ No____

Convulsión: Si____ No____ Fontanela abultada: Si____ No____

Signo local de infección: Si____ No____

Hipoglicemia: Si____ No____ Hiperglicemia: Si____ No____

Datos de laboratorio

Leucocitos al ingreso en las unidades (número de células por microlitro):_____

Neutrófilos al ingreso en las unidades (número de células por microlitro):_____

Plaquetas al ingreso en las unidades (número de células por microlitro):_____

Cayados al ingreso en las unidades (número de células por microlitro):_____

Hemoglobina al ingreso en las unidades (número de células por microlitro):_____

Proteína C reactiva Reactante de fase al ingreso en las unidades (número de células por microlitro):_____

Diligenciado por (iniciales): _____

CIERRE DE INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha de diligenciamiento: _____

Días de estancia en la UCIN O UCBN: _____

Reporte de PCR _____ fecha: _____

Diagnósticos infecciosos de egreso de UCI: _____

Hemocultivo: _____ fecha: _____ resultado:
_____germen:_____

Urocultivo: _____ fecha: _____ resultado: _____ germen: _____



Cultivo de LCR: _____ fecha: _____ resultado: _____ germen:

Otros cultivos: _____ fecha: _____ resultado: _____ germen:

Procalcitonina _____ fecha _____
resultado _____

Diligenciado por (iniciales): _____

Anexo B. Acta de aprobación comité de ética bioética e investigación.

COMITÉ DE ETICA BIOÉTICA E INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA.

ACTA DE APROBACIÓN.

ACTA DE APROBACIÓN N°: 002-004

Fecha en que fue sometido a consideración del comité: Febrero 18 de 2014.

Nombre completo del Proyecto: "IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN PACIENTES CON SIGNOS Y SÍNTOMAS CLÍNICOS DE SEPSIS NEONATAL TEMPRANA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA."

Enmienda Revisada: Ninguna.

Sometido por: El docente de la Universidad Surcolombiana y Genetista de la Institución Dr. Henry Ostos Alfonso, Dr. Carlos Eduardo Fonseca, Luis Alberto Mendoza Puentes y Carlos Arturo Cano Muñoz.

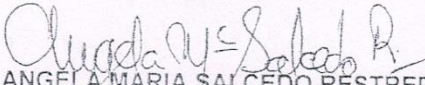
El Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo constituyó mediante la Resolución N° 1198 del 29 de Diciembre de 2011 el comité de Ética Bioética e Investigación da cumplimiento a la Resoluciones 8430 de 1993 y 2378 del 2008 y al Decreto 1757 de 1994, actos administrativos expedido por el Ministerio de la Protección Social, lo mismo que para obedecer lo dispuesto por la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la UNESCO.

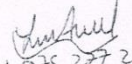
El Comité de Ética Bioética e Investigación Certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto.
 - a. Resumen del proyecto
 - b. Protocolo de Investigación
 - c. Formato de Consentimiento Informado.
 - d. Protocolo de Evento Adverso.
 - e. Formato de recolección de datos
 - f. Folleto del Investigador (si aplica)
 - g. Resultado de evaluación por otros comités (si aplica)
 - h. Acuerdo de Confidencialidad para Investigadores

¡ Servimos con calidez humana !
PBX: 8-71-59-07. Telefax: 8-71-44-15, 8-71-44-40, 8-71-91-91, 8-71-74-96
www.hospitaluniversitarioneiva.com.co Email: hospitalneiva@yahoo.com
Dirección: Calle 9 Nro. 15-25. Neiva- Huila

2. El comité consideró que el presente estudio: es válido desde el punto de vista ético, la investigación se considera con riesgo mínimo para los personas que participan. La investigación se ajusta a los estándares de buenas prácticas clínicas.
3. El comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos del estudio son las adecuadas.
4. El comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
5. El investigador Principal deberá:
 - a. Informar cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto, estos cambios no podrán ejecutarse si la aprobación previa del comité de ética bioética e investigación de la Institución excepto cuando sea necesario que comprometa la vida del participante del estudio.
 - b. Avisar cualquier situación imprevista que considere que implica riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
 - c. Poner en conocimiento al Comité de toda información nueva, importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo / beneficio de los sujetos participantes.
 - d. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
 - e. El Investigador se comprometen con utilizar el consentimiento informado que debe tener el sello de aprobación del comité de ética bioética e investigación.
 - f. El investigador se compromete una vez terminado su proyecto en hacer una retroalimentación en el servicio donde realizo la investigación para presentar los resultados del estudio.
 - g. El informe final de la investigación se debe hacer entrega al comité en un plazo máximo de un mes después de terminada la investigación.
 - h. Si el tiempo para el desarrollo del proyecto es más de un año debe presentar un informe anual del proyecto.
 - i. El Investigador se comprometen con hacer entrega al Hospital Universitario de Neiva de un artículo publicado en una revista indexada de la investigación realizada.


Dra. ANGELA MARIA SALCEDO RESTREPO.
Presidente Comité de Ética Bioética e Investigación.


1 075 277 208
27-02-14

Anexo C. Consentimiento informado.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION MÉDICA.

IDENTIFICACIÓN DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B Y ESCHERICHIA COLI EN PACIENTES CON SIGNOS Y SÍNTOMAS DE SEPSIS NEONATAL TEMPRANA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO DE NEIVA DE MARZO DE 2014 HASTA DICIEMBRE DE 2015.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Henry Ostos, MD MSc Genetica, Carlos Fonseca MD Pediatra, Jorge Enrique Pinto MD Residente de pediatría USCO , Wilson Arturo Muñoz Residente de pediatría USCO

SEDE DONDE SE REALIZA EL ESTUDIO: Unidades de cuidado intermedio e intensivo neonatal

NOMBRE DEL PACIENTE:

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregara una copia firmada y fechada.

1. **Objetivo del estudio:** Identificar la presencia de 2 bacterias llamadas: *Streptococo del grupo B* y *Echerichia coli* en la sangre de su hijo, mediante 2 pruebas de laboratorio: cultivo de sangre y una prueba molecular en sangre.

2. **Justificación del estudio:** Al unir estas 2 pruebas de laboratorio podemos diagnosticar la posible enfermedad que está sufriendo su hijo (Sepsis neonatal temprana) de una manera más rápida, y por tanto disminuir el tiempo de hospitalización del paciente en la unidad de cuidado intermedio e intensivo neonatal.

3. **Beneficios del estudio:** Al realizar un diagnóstico de forma temprana se pueden prevenir complicaciones en el neonato. El Hospital también se beneficia porque se pueden acortar los días de hospitalización del neonato.

4. **Procedimientos del estudio:** Se extraerán 10 mililitros de sangre del neonato para someterla a dos pruebas de laboratorio: cultivo y una prueba molecular, con el único fin de detectar las bacterias *Streptococo del grupo B* y/o *Echerichia coli*.

5. **Riesgos asociados al estudio:** Esta investigación según la resolución 8430 de 1993 tiene un riesgo mayor al mínimo, porque se podría extraer hasta 2 % de la volemia del neonato.

6. **Aclaraciones:** Su decisión de participar en el estudio es completamente libre y voluntaria.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted y su hijo, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con el Dr. Carlos Eduardo Fonseca al teléfono 3112820161 y al Dr. Jorge Enrique Pinto al teléfono 3002095961. Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si así lo desea, firmar el consentimiento informado que forma parte de este documento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Yo, _____ c.c N° _____
de _____ he leído y comprendido la información anterior y mis
preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria por el investigador que
me entrevistó. He sido informado (a) y entiendo que los datos obtenidos en el
estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo tanto deseo
participar voluntariamente en el proyecto de investigación.

Firma del paciente: _____
Documento de ID: _____ De _____

Firma del testigo: _____
Documento de ID: _____ De _____

Firma del testigo: _____
Documento de ID: _____ De _____

He explicado al Sr. (a) _____ el propósito de la
investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implican su
participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he
preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad
correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella
(Resolución 8430 de 1993). Una vez concluida la sesión de preguntas y
respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del Investigador

Fecha