



Identificación molecular de bacterias causales de sepsis neonatal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

M en C. Héctor Flores-Herrera,* Dr. Rolando Maida-Claros,** Dra. Haydeé Solís-Herrera.*** Dr. Eucario Illescas-Medrano,*** Dr. en C. Francisco Javier Zavala-Díaz de la Serna****

RESUMEN

La sepsis neonatal es un problema mundial de salud pública que afecta a los recién nacidos. Ocurre en ocho de cada 1,000 nacimientos; sin embargo, el riesgo de morbilidad y mortalidad neonatal es el 50 % de los casos. La sepsis neonatal se expresa por signos y síntomas de un proceso infeccioso y se confirma por un hemocultivo que revela diversas bacterias patógenas. En la población de recién nacidos hay dos tipos clínicos de sepsis neonatal: Una con signos y síntomas de infección pero con hemocultivo negativo. Otro en el que no hay síntomas de sepsis pero cuyas manifestaciones se desarrollan días después. Para ambos tipos hay dificultad para dar un tratamiento apropiado en las unidades de cuidados intensivos del recién nacido. El 15 % de los nacimientos a nivel mundial con sospecha clínica y subclínica de sepsis, han recibido diferentes esquemas antimicrobianos sin que se haya identificado al agente causal de la infección. Recientemente se han utilizado metodologías moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR polimerase chain reaction) que ha permitido identificar las bacterias responsables de la sepsis neonatal, cuando el hemocultivo fue negativo. El objetivo de esta revisión, es exponer el fundamento básico de la PCR en combinación con la electroforesis en gradientes desnaturizantes para DNA (DGGE denaturing gradient gel electrophoresis) lo que permite identificar comunidades bacterianas complejas en un sólo paso. Asimismo, se mostrará el valor de estos recursos como herramienta de diagnóstico clínico en casos con sospecha de sepsis neonatal.

Palabras clave: Sepsis neonatal, hemocultivo, reacción en cadena de la polimerasa, unidad ribosomal, electroforesis en gradientes de desnaturalización.

ABSTRACT

Neonatal sepsis is a worldwide public health problem in many newborns. Its incidence is estimated at 8 of 1000 alive births; however the risk of morbidity and mortality reaches 50 %. Neonatal sepsis presents with signs and symptoms of infections; its diagnosis is confirmed by blood culture. It may be present in one of two forms: In one group there are no signs or symptoms initially; they appear several days later which hinders and/or delays medical treatment. In another group there are signs and symptoms, while blood cultures are negative. It is estimated that 15% of all newborns with neonatal sepsis are treated with a variety of broad-spectrum antibiotics even without identification of a causal agent. Recently, molecular techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) and the sequencing by identification of bacteriae associated with the neonatal sepsis. The main goal of this review is to present the basis of the PCR in combination with the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the sequencing in cases suspected of the sepsis neonatal.

Key words: Neonatal sepsis, blood culture, polymerase chain reaction, subunit ribosomal, denaturing gradient gel electrophoresis.

La sepsis neonatal, es una patología infrecuente de recién nacidos. Su prevalencia a nivel mundial se ha estimado menor al 1.0 % del total de los nacimientos. Sin embargo, los riesgos

de morbilidad y mortandad neonatal alcanzan hasta el 50 % de los casos por infección. Su identificación oportuna es un desafío para los servicios de neonatología de todo el mundo. ¹ En países en vías de desarrollo la incidencia

* Departamento de la Subdirección de Investigación Biomédica Básica,

** Departamento de Neonatología,

*** Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

**** Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: M en C. Héctor Flores-Herrera. Departamento de Investigación Biomédica. Instituto Nacional de Perinatología, IER. Montes Urales # 800 Col. Lomas de Virreyes CP 11000. Tercer Piso

de la Torre de Investigación. México DF. Tel. 55209900 ext. 478 Fax. (+0015255) 55209705 correo electrónico: floresh8@yahoo.com Recibido: octubre, 2008. Aceptado: marzo, 2009.

Este artículo debe citarse como: Flores HH, Maida CR, Solís HH, Illescas ME, Zavala DF. Identificación molecular de bacterias causales de sepsis neonatal mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Acta Pediatr Mex 2009;30(3):148-55.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

de sepsis neonatal oscila entre 2 y 8 %.² En el Instituto Nacional de Perinatología “Espinosa de los Reyes” (IN-PerIER), la prevalencia de la sepsis neonatal en los últimos cinco años se ha estimado en 2.3 % del total de los nacimientos.³ El INPerIER es un centro de salud de III nivel especializado en el cuidado materno-fetal con atención a toda la población del país y cuenta con unidades para el cuidado intensivo neonatal (UCIN) e intermedio del recién nacido (UCIREN).

Las manifestaciones clínicas de la sepsis son diversas y con frecuencia inespecíficas. Las más frecuentes son síntomas digestivos: rechazo a las tomas, vómitos, diarrea, distensión abdominal, hepatomegalia, ictericia; síntomas respiratorios: quejidos, respiración irregular, taquipnea, cianosis, fases de apnea; signos neurológicos: (apatía o irritabilidad, hipotonía o hipertonia, temblores o convulsiones, fontanela tensa; signos cardiocirculatorios: palidez, pulso débil, relleno capilar lento, distermia y alteraciones metabólicas.

En algunos casos estas manifestaciones pueden simular diversas condiciones transitorias en el período de adaptación neonatal, lo que dificulta la identificación de una infección; más aún, en estos casos el tratamiento se complica. Hasta el 15 % de los recién nacidos han recibido tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro sin que se haya obtenido un hemocultivo positivo con el agente causal de la infección.¹

La sepsis neonatal, puede causar septicemia, meningitis, neumonía, infecciones del sistema nervioso central y de las vías urinarias.^{4,5,6} A nivel mundial, se ha señalado que las bacterias más comúnmente aisladas son *Streptococcus agalactiae* (streptococo β -hemolítico del grupo B; SGB), *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Listeria monocytogenes*⁷⁻¹⁰. El neonato puede adquirir la infección por la vía nosocomial como vía vertical (infección de la madre durante el embarazo en la que las bacterias ascienden hasta alcanzar al producto).

La sepsis nosocomial es producida por microorganismos del entorno hospitalario, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos neonatales. La colonización al neonato ocurre por contacto con el personal médico, con familiar o a partir de material contaminado utilizado en procedimientos invasivos de diagnóstico y de tratamiento. La sintomatología aparece 72 horas después de la hospitalización. La tasa de mortalidad oscila entre 10 y 15%;

los aislamientos de bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas spp.*), bacterias Gram-positivos (*Staphylococcus epidermis*, *S. aureus*) y hongos (*Candida spp.*) son los más frecuentes.²

La sepsis vertical es la principal vía de infección, se debe a bacterias patógenas localizadas en el canal cervicovaginal materno que infectan al producto por dos rutas. La primera, ascendente, cuando las bacterias colonizan las membranas fetales y activan la respuesta proinflamatoria (IL-1 β , IL-8, TNF α) y enzimática (metaloproteasas de matiz extracelular; MMP-2, MMP-9). Este proceso bioquímico está encaminado en combatir la infección pero compromete la organización y estructura de las membranas fetales, lo que causa diversas patologías obstétricas, como la coriamnioítis y la ruptura prematura de las membranas fetales.

Si las bacterias vulneran la respuesta inmunológica, invaden el líquido amniótico y entran en contacto con el producto produciendo una infección fetal.^{2,11,12}

La segunda vía por la cual las bacterias llegan e infectan al producto, es al momento del nacimiento a través del canal cervicovaginal.² La prematuridad al nacimiento (< 37 semanas) y el bajo peso al nacer (<2500 gramos) son factores de riesgo predisponentes de la sepsis del recién nacido. Estas circunstancias deben inducir al personal médico especializado a realizar intervenciones que ataquen la causa de la infección.^{11,12}

La sintomatología de la sepsis vertical se inicia en las primeras 72 horas de vida. La tasa de mortalidad alcanza el 30%. Las bacterias comúnmente aisladas son Gram-positivos (*Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*) y Gram-negativos (*Escherichia coli* y *Klebsiella*) y otras bacterias como *Ureaplasma urealyticum*.

EL HEMOCULTIVO COMO PRUEBA DE DIAGNÓSTICO DE LA SEPSIS NEONATAL

Las bacterias causantes de la infección, se identifican mediante el hemocultivo que es el estándar de oro, que permite además determinar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos. Se requieren dos condiciones para el desarrollo y crecimiento de las bacterias. La primera, está relacionada con la calidad propia del inóculo, es decir, que las bacterias sean viables para que se desarrollen in Vitro; también se requiere que la muestra contenga la cantidad

mínima necesaria de bacterias o unidades formadoras de colonias (UFC) para que se pueda observar el crecimiento en los tiempos estimados para cada bacteria. Se ha determinado que se requieren de aproximadamente 10^6 UFC para que sean detectadas mediante el cultivo bacteriológico.^{13,14} La segunda condición, se refiere a los requerimientos diferenciales del medio de cultivo (nutrientes esenciales y pH óptimo) así como de las características de la incubación: temperatura, presión de CO_2 , las cuales están desarrolladas y dirigidas específicamente para el crecimiento diferencial de cada bacteria.

Del total de las muestras analizadas se ha estimado que aproximadamente el 40% desarrollan crecimiento de las bacterias de interés y otro porcentaje (25%) dan resultados falsos negativos; es decir, que aunque estén presentes las bacterias no se observa su crecimiento. Esta baja sensibilidad y especificidad, se relaciona con el poco volumen (< 1 mL) de sangre, que se puede extraer al recién nacido y se ha estimado un contenido aproximado de 10 UFC/mL de bacterias.^{15,16} Una limitante adicional del hemocultivo es que tarda hasta cuatro días para obtener el resultado del laboratorio y no logra analizar el contenido total de las bacterias que pudieran ser de interés para identificar la etiología de la enfermedad.^{13,14}

Por estas razones se requieren metodologías que permitan análisis rápidos, precisos y de alta sensibilidad que ayuden a los neonatólogos y al cuerpo médico responsable, lograr una evaluación oportuna y un mejor tratamiento de casos clínicos y subclínicos de sepsis neonatal. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras herramientas de biología molecular están siendo aplicadas en la clínica para la detección de enfermedades infecciosas.^{17,18}

EL MÉTODO MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA SEPSIS NEONATAL

La amplificación de segmentos definidos del ácido nucleico (DNA) mediante la PCR, que empezó en la investigación básica, pero cuya aplicación se ha incorporado en los laboratorios de microbiología clínica y de la salud en los que se han logrado importantes avances para identificar la etiología de diversos procesos infecciosos.^{17,18}

El primer paso consiste en la extracción del DNA por medios físicos: agitación y variaciones de temperatura y químicos: fenol/cloroformo, detergente de guanidina. El DNA obtenido se cuantifica mediante su relación a dos

longitudes de absorbancia las cuales son de 260 (DNA) dividido entre la absorbancia a 280 (proteína). La mejor pureza del DNA es cuando se obtiene una relación de 1.6 unidades¹⁸.

El DNA sirve como molde para ser amplificado varias veces por la enzima catalítica termoestable (Taq DNA polimerasa) *in vitro*. La amplificación se realiza mediante la mezcla de reacción la cual contiene el DNA de la muestra en estudio, Taq DNA polimerasa, amortiguador, magnesio, nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) e iniciadores para el segmento específico del DNA. La figura 1 muestra el esquema general de la PCR que tiene tres etapas y que son determinadas por variaciones simultáneas de temperatura.

Etapas 1 desnaturalización: Se produce por el incremento en la temperatura a 92°C durante 45 segundos, lo que hace que la cadena doble de DNA se separe en dos cadenas sencillas y cada una de éstas servirá de moldes copia.

Etapas 2 alineamiento: Ocurre por la disminución de la temperatura a 55°C durante 30 segundos, lo que permite que pequeñas secuencias denominadas iniciadores (*primers*), se alineen a regiones específicas en la cadena sencilla del DNA. Estos iniciadores son necesarios para que la Taq polimerasa comience a copiar el DNA molde (Figura 1).

Etapas 3 extensión: Consiste en la activación de la Taq DNA polimerasa, responsable de la catálisis de la reacción. Esta activación ocurre cuando se eleva la temperatura a 72°C por 45 segundos. La Taq DNA polimerasa irá adicionando diferentes bases nitrogenadas: adenina, citosina,

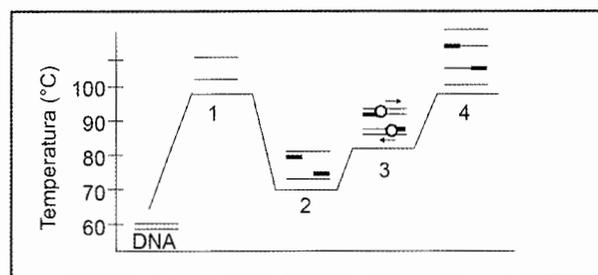


Figura 1. Amplificación del DNA por la PCR. El DNA de interés es desnaturalizado permitiendo la **separación** de la doble cadena (1); la disminución de la temperatura, permite que el iniciador de **alinee** y se dé la unión a regiones específicas del DNA (2); un segundo incremento de la temperatura activa a la polimerasa y comienza la **extensión** de la cadena de DNA, mediante la incorporación de los nucleótidos de adenina, citosina, timina y guanina (3). El ciclo inicia nuevamente (4). La amplificación de DNA es exponencial con respecto a la concentración inicial.

guanina y timina, de acuerdo a la secuencia específica del DNA molde. En esta etapa se produce la extensión del DNA y se da por terminado el ciclo de amplificación e inicia nuevamente hasta finalizar con el total de los ciclos programados.

En la última fase de la PCR, se da una extensión a 72°C por 7 minutos en la cual la Taq DNA polimerasa concluirá las extensiones de aquellos amplificados inconclusos durante el proceso. Dependiendo del protocolo de amplificación, los ciclos se repiten entre 20 y 35 veces, lo que da como resultado que la concentración del DNA aumente de manera exponencial respecto a la concentración inicial.¹⁸

A diferencia del cultivo bacteriológico, la PCR requiere mínimas concentraciones del DNA (pg/mL). En teoría se pueden obtener amplificados a partir de un único molde de DNA blanco y no se requiere que las células estén vivas. Esto favorece a la PCR para ser empleada como herramienta de diagnóstico¹⁸. Por medio de la PCR se ha identificado una amplia diversidad de especies de bacterias, hongos, y protozoarios. La PCR ha identificado en sangre de neonatos, al virus del herpes simplex, el cual está involucrado en el desarrollo de la meningitis.^{4,19} Esta técnica tiene mayor sensibilidad que el cultivo bacteriológico; es confiable y el resultado se obtiene en cuatro horas después de obtener la muestra.⁷ Sin embargo, los iniciadores utilizados son específicos para la detección de una sola bacteria, lo que reduce el análisis de la biota bacteriana total.

Recientemente se han sintetizado iniciadores bacterianos para la amplificación de la región pequeña del gene 16S ribosomal (16S rDNA). El 16S rDNA está presente en todas las bacterias, es altamente conservado y tiene secuencias definidas, lo que permite diferenciarlas entre cada especie de bacteria.²³⁻²⁸ El uso del 16S rDNA permite explorar en un solo paso a todas las bacterias contenidas en diversas muestras biológicas, lo que la vuelve un buen marcador respecto a otros genes bacterianos.²⁰⁻²²

Ohlin y colaboradores (2008) identificaron mediante el 16S rDNA que el 41 % de las muestras sanguíneas neonatales la presencia de dos bacterias simultáneamente como el caso de *Staphylococcus* coagulasa-negativo en combinación con *S. aureus* o con *Acinetobacter iwoffii* o también con *Enterococcus faecalis*, y en uno de los casos se identificó a *E. coli* en combinación con *S. aureus*. Estas asociaciones no fueron detectadas por el hemocultivo.²³ El

uso de la región del 16S rDNA ha permitido identificar en muestras sanguíneas, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus viridans*, *S. vestibularis*, *Corynebacterium jeikeium*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus gallinarum*, *Capnocytophaga ochracea*, *Citrobacter youngae*, *C. freundii* las cuales no habían sido detectadas por el hemocultivo.^{19, 27}

La *S. marcescens*, es una bacteria Gram-negativa difícil de cultivar por los métodos convencionales; es causante de diversas afecciones como neumonía, conjuntivitis, infecciones de las vías urinarias y del sistema nervioso central y es responsable de la morbilidad y mortandad en los neonatos.^{29,30}

Para una búsqueda de microorganismos sin emplear el cultivo bacteriológico se pueden combinar diferentes metodologías como la PCR y la electroforesis en geles con gradientes de desnaturalización (DGGE) para DNA.³¹

ANÁLISIS DEL DNA BACTERIANO MEDIANTE LA ELECTROFORESIS CON GELES EN GRADIENTES DE DESNATURALIZACIÓN (DGGE)

La electroforesis se utiliza comúnmente para identificar y analizar las proteínas, RNA y DNA en muestras biológicas. El principio físico-químico se basa en la migración de diferentes biomoléculas a través de un soporte o matriz (acrilamida o agarosa) que se somete a un campo eléctrico. Como el DNA posee carga eléctrica negativa, se mueven hacia el ánodo. La separación de las biomoléculas depende de su tamaño (peso relativo); a mayor volumen, menor movilidad electroforética como de la concentración de la matriz (Figura 2).

El uso de DGGE para analizar muestras de DNA bacteriano, se basa en el mismo principio descrito arriba; sin embargo, a la matriz de acrilamida se le adiciona urea y formamida (agentes desnaturalizantes), ambas contenidas en la matriz en gradiente que va de 0 a 100 % de concentración. Los enlaces débiles de hidrógeno del DNA que se forman entre las bases nitrogenadas (adenina-timina y citosina-guanina) de las bacterias, al migrar por la matriz desnaturalizante se irán rompiendo. Entre más porcentaje de CG (forma tres enlaces de hidrógeno) estén contenidas en la secuencia del 16S, mayor concentración de urea-formamida se requerirá para abrir la cadena de DNA; por lo tanto éstas tendrán que migrar más sobre la matriz.³¹ Al término de la electroforesis, el gel es teñido con bromuro

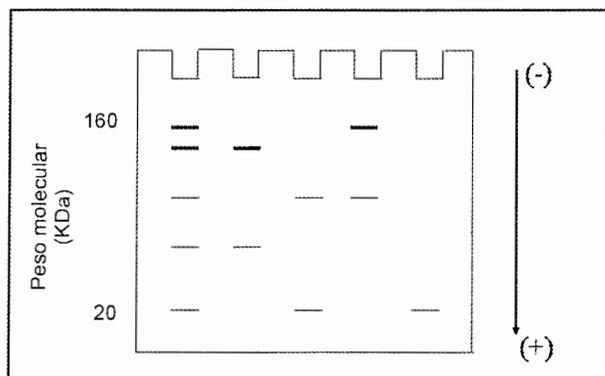


Figura 2. Migración diferencial de las biomoléculas contenidas en una muestra. La carga eléctrica va de arriba (-) hacia abajo (+). El peso molecular es en unidades de kilo daltones (kDa) que equivalen al peso aproximado del átomo de hidrógeno.

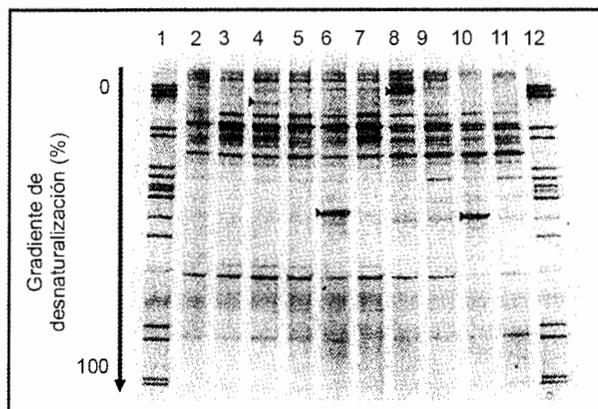


Figura 3. Gel de DNA en gradiente de desnaturalización (DGGE). Los carriles 1 y 12 muestran al marcador de especies bacterianas; del carril 2 al 11 son las muestras de pacientes. La identidad inicial se establece por la movilidad con respecto al marcador de especies.³⁵

de etidio y éste se visualiza en un analizador de imágenes con luz ultravioleta. La identidad de las bacterias de la muestra de interés se obtiene según la movilidad de las cepas de referencia (Figura 3).

La figura 4, muestra los pasos para la identificación de los microorganismos en base al análisis filogenético, de

las bandas obtenidas en la muestra de interés a partir del DGGE. La identificación inicial se realiza de acuerdo a la movilidad de referencia de bacterias conocidas (marcador de especies); sin embargo, para establecer la identidad de bacterias (bandas) que no corresponden con el marcador

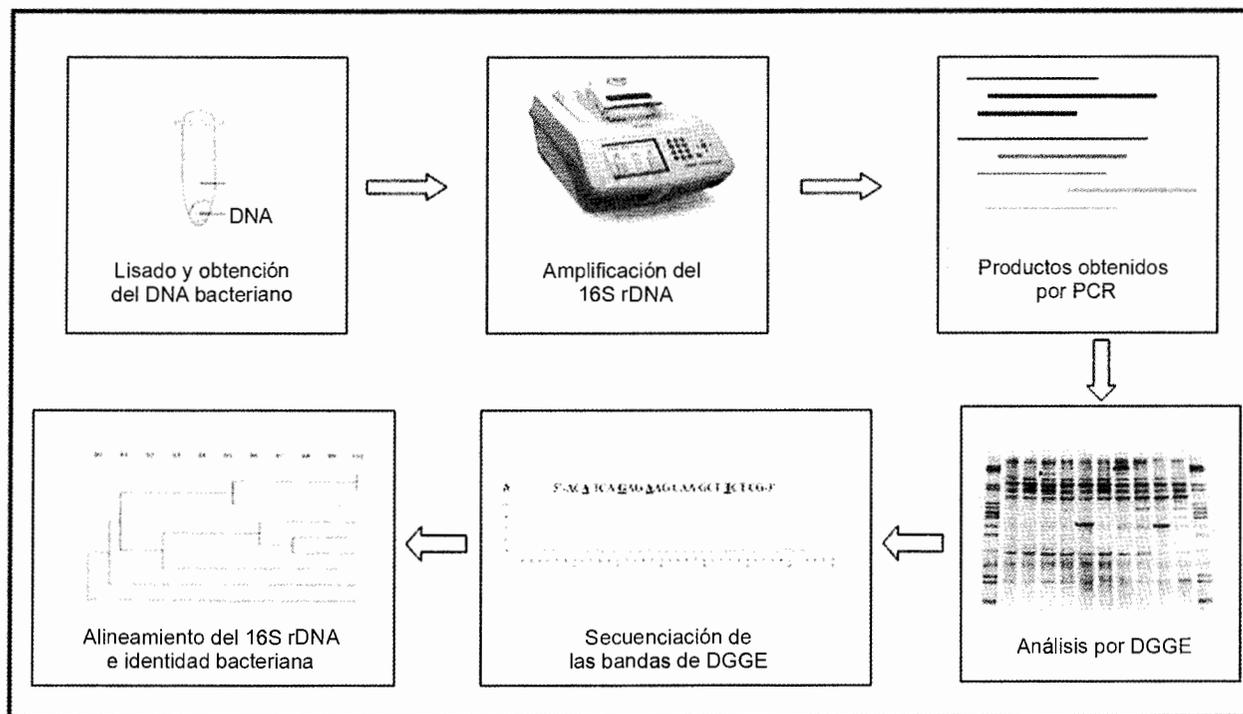


Figura 4. Diagrama de flujo para identificar a las bacterias mediante la PCR-DGGE. La identificación inicial de las bacterias se determina por la movilidad de los diferentes productos de PCR con respecto al marcador de referencia. La identidad bacteriana se realiza por el alineamiento con el banco de genes y permite predecir la relación filogenética hasta del 100%.

de especies, las bandas son eluidas del gel y se reamplifica el DNA para su secuenciación. El análisis de identidad se determina con el uso de programas en algoritmos de bioinformática tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en los cuales se alinea la secuencia de la muestra y se compara con la secuencia disponible en el banco del genoma bacteriano para el 16S rDNA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque la PCR-DGGE, aun no se ha utilizado para identificar las bacterias responsables de la sepsis neonatal, se ha comenzado a emplear en la clínica para identificar bacterias patógenas en diferentes infecciones como vaginosis bacteriana (*Atopobium vaginae* y *Eggertella*), gastroenteritis (*Bacteroides fragilis*, *Faecalibacterium prauznitzii*) y periodontitis (*Tanerellaforsthensis*, *Deferribacter*) las cuales no habían sido identificadas por el cultivo bacteriológico convencional.³²⁻³⁵ Burton y colaboradores (2004) han demostrado en mujeres posmenopáusicas con afecciones de vaginitis recurrente, la presencia de bacterias como *Atopobium vaginae* y *Eggertella* lo que ha permitido desarrollar nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en reducir su frecuencia.³³

LIMITACIONES DE LA PCR

Aunque la PCR ofrece ventajas sobre el cultivo bacteriológico, tiene limitaciones.³⁶⁻³⁸ Primero, se requiere que el DNA blanco sea de buena calidad, es decir, que no tenga fragmentaciones. Las muestras biológicas contienen enzimas como endonucleasas y dnasas las cuales degradan el DNA. Segundo, las muestras de sangre contienen diferentes componentes estructurales como anillos de porfirinas que interfieren con la actividad de la Taq DNA polimerasa, lo que reduce la eficiencia de la amplificación y puede dar resultados falsos negativos.²⁹ Tercero, el diseño de los iniciadores por amplificar deben ser específicos para cada bacteria. Cuarto, en la obtención de la muestra y en la extracción del DNA, puede haber contaminación con otras bacterias que no necesariamente corresponden a las de la muestra de origen. Cinco, los productos pequeños de amplificación por PCR, aunque son visualizados en el DGGE, no pueden ser eluidos para su secuenciación, por lo que esas bandas no llegan a ser identificadas.³⁸

Para reducir las interferencias y contaminaciones durante el proceso de amplificación, se han sugerido diversas alternativas que van desde el procesamiento in-

mediato y en frío de la muestra sanguínea, lo que reduce la actividad de las endonucleasas. Se recomienda utilizar albúmina (5.0%) en la mezcla de amplificación para dar mayor estabilización a la Taq DNA polimerasa. Para reducir la actividad de las endonucleasas y de los anillos de porfirinas, es conveniente el calentamiento (60°C) del DNA para su desnaturalización, así como el empleo de micro-columnas.³⁸ Es necesario que todo el material que se emplee para PCR haya sido esterilizado previamente y que el procedimiento se realice en áreas limpias, lo que reducirá posibles contaminaciones de otras bacterias durante el procesamiento.

Se deben incluir dos controles; uno de los cuales no debe tener DNA (control negativo). Si en el gel de agarosa se visualiza una banda de amplificación en este control, indica que existe una contaminación que posiblemente está presente en las muestras de interés. Otro de los controles utilizados (positivo) durante el proceso de amplificación, es la inclusión de genes constitutivos como la β -hemoglobina, GDPH que al ser visualizados en el gel de agarosa, indica que las condiciones de amplificación fueron adecuadas; si por el contrario, este control no se visualiza, indica que las condiciones de amplificación deben modificarse.

CONCLUSIONES

El cultivo bacteriológico es el método más utilizado y valioso en la clínica ya que permite aislar diversas bacterias y establecer la resistencia a diferentes antibióticos; sin embargo, como prueba de diagnóstico en muestras de sangre neonatal, el cultivo bacteriológico tiene baja sensibilidad y especificidad para la detección de los agentes causales de la infección. Por otro lado, la recurrencia de las infecciones en los recién nacidos puede deberse a la participación de asociaciones bacterianas, que no son detectadas por el cultivo bacteriológico, lo que dificulta el tratamiento adecuado de la infección y representa actualmente un reto en las unidades al cuidado de los recién nacidos. El uso de la región variable del gene 16S rDNA, permite identificar diversas bacterias en muestras de sangre que son difíciles de cultivar y de las cuales se desconocía su probable participación como causa de la sepsis neonatal.

Actualmente nuestro grupo de investigación ha iniciado la exploración en muestras de sangre neonatal con

evidencia clínica y subclínica de sepsis para identificar la biota bacteriana (cultivable y no cultivable) que pueda participar en el desarrollo de sepsis neonatal mediante PCR-DGGE. Asimismo, tenemos interés en determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (positivo y negativo) de esta prueba molecular como prueba de diagnóstico clínico.

REFERENCIAS

1. Wegman ME. Annual summary of vital statistics-1992. *Pediatrics* 1993;92:743-54.
2. Cotallo-Coto GD, Ibáñez-Fernández A. Protocolo de diagnóstico-terapéutico de la sepsis neonatal. *Bio Pediatr* 2006;46:125-34.
3. Anuario Estadístico del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinoza de los Reyes". 2003-julio del 2008.
4. Kimberli DW. Herpes simplex virus infections in the newborn. *Semin Perinatol* 2007;31:19-25.
5. Kimberlin DW. Diagnosis of herpes simplex virus in the era of polymerase chain reaction. *Pediatric Infect Dis J*. 2006;25(9):841-2.
6. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: A continuing story. *Semin in Fetal and Neonatal Med* 2006;11:354-62.
7. Natarajan G, Johnson YR, Zhang F, Chen KM, Worsham MJ. Real-time polymerase chain reaction for the rapid detection of group B streptococcal colonization in neonates. *Pediatrics* 2006;118(1):14-22.
8. Jaffe RI, Lane JD, Albury SV, Niemeyer DM. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:3407-12.
9. Kafetsiz DA, Skevaki CL, Skouteri V, Gavrilis S, Peppas K, Kostalos C, Petrochilou V, Michalakis S. Maternal genital colonization with *Ureaplasma urealyticum* promotes preterm delivery: association of the respiratory colonization of preterm infants with chronic lung disease and increased mortality. *Clin Inf Dis* 2004;39:1113-22.
10. Sarkar S, Bhagat I, DeCristofaro JD, Wiswell TE, Spitzer AR. A study of the role of multiple site blood cultures in the evaluation of neonatal sepsis. *J Perinatol* 2006;26:18-22.
11. Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p. 943-98.
12. Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and role of preventive strategies. *Semin Neonatol* 2002;7:259-74.
13. Onderdonk AB, Lee ML, Lieberman E, Delaney ML, Tuomala RE. Quantitative microbiologic models for the preterm delivery. *J Clin Microbiol* 2003;41(3):1073-9.
14. Brown DR, Kutler D, Rai B, Chan T, Cohen M. Perinatal/neonatal clinical presentation: bacterial concentration and blood volume required for a positive blood culture. *J Perinatol* 1995;15:157-9.
15. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol* 1990;3:269-79.
16. Kellogg JA, Ferrentino MH, Goodstein MH, Liss SL, Shapiro SL, Bankert DA. Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatr Infect Dis* 1997;16:381-5.
17. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004;22(5):299-05.
18. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004;22(4):238-45.
19. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(3):596-01.
20. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000;38:2574-8.
21. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;32:335-51.
22. Ehrlich GD, Greenberg SJ. PCR-based diagnostics in infectious disease. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1994. p. 663-5.
23. Ohlin A, Backman A, Bjorkqvist M, Molling P, Jurstrand M, Schollin J. Real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal bacteraemia. *Acta Paediatrica* 2008.
24. Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatrica* 1997;86:1097-99.
25. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:247-53.
26. McCabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, McCabe ER. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences. Automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics* 1995;95:165-9.
27. Quian Q, Tang YW, Kolbert CP, Torgerson CA, Hughes JG, Vetter EA, Harmsen WS, Montgomery SO, Cockerill FR, Persing DH. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: Evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001;39:3578-82.
28. Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, Quinn TC. Detection of bacteremia in emergency department patient at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2002;186:1677-81.
29. Maragakis LL, Winkler A, Tucker MG, Cosgrove SE, Ross T, Lawson E, Carroll KC, Pearl PM. Outbreak of multidrug resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Cont Hosp Epid* 2008;29(5):418-23.
30. Bizarro MJ, Dembry LM, Baltimore RS, Gallagher PG. Case-control analysis of endemic *Serratia marcescens* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Fetal Neonatal* 2007;92:120-6.
31. Muyzer G, De Wall E, Uitterlinder A. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(3):695-700.

32. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nungent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis* 2002;186:1770-80.
33. Burton JP, Devilard E, Cadieux PA, Hammond JA, Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1829-31.
34. Balamurugan R, Janardhan HP, George S, Raghava MV, Muliylil J, Ramakrishna BS. Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46(5):514-9
35. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003;82(5):338-44.
36. Schmidt TM, Pace B, Pace NR. Detection of DNA contamination in Taq polymerase. *Biotechniques* 1991;11:176-7.
37. Bottger EC. Frequent contamination of Taq polymerase with DNA. *Clin Chem* 1990;36:1258-9.
38. Fredricks DN, Marrazzo JM. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999;29:475-88.

