



Universidad de Granada
Departamento de Microbiología

**Hospital Universitario Virgen de las
Nieves**

Servicio de Microbiología

Evaluación de la técnica
molecular LightCycler®
SeptiFast en recién nacidos y
lactantes con sospecha de sepsis

Eva Torres Martos

Granada, 2014

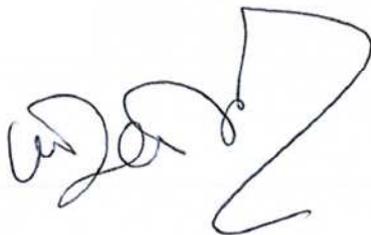
Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Eva Torres Martos
D.L.: GR 1872-2014
ISBN: 978-84-9083-056-7

La Dra. **Mercedes Pérez Ruíz**, Facultativa Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y la Dra. **María Manuela Jiménez Valera** Catedrática del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada Eva Torres Martos “**Evaluación de la técnica LightCycler®SeptiFast en recién nacidos y lactantes con sospecha de sepsis**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Así, estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

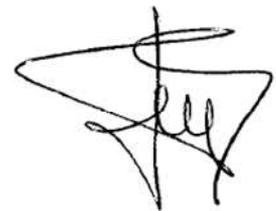
Granada, febrero 2014



Fdo.: Mercedes Pérez Ruíz



Fdo.: María Manuela Jiménez Valera



Fdo.: Eva Torres Martos

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ácido desoxirribonucleico que codifica para ARN ribosomal

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

AEP: Asociación Española de Pediatría

AI: Aspergilosis invasiva

BHI: caldo de cerebro-corazón (del inglés "*brain heart infusión*")

BLEE: betalactamasas de espectro extendido

CBS II: cabina de bioseguridad tipo II

CLSI: "*Clinical Laboratory Standard Institute*"

Cp: "crossing point"

dNTPs: desoxinucleóticos

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EUCAST: "*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*"

FN: falsos negativos

FP: falsos positivos

FRET: transferencia de energía de resonancia fluorescente (del inglés "*fluorescent resonance energy transfer*")

G+: Gram positivo

G-: Gram negativo

HC: hemocultivo

HUVN: Hospital Universitario Virgen de las Nieves

IL: interleuquina

IL-6: interleuquina 6

IP: infección periprotésica

I/M: índice de neutrófilos inmaduros frente a neutrófilos maduros

I/T: índice de neutrófilos inmaduros frente a neutrófilos totales

ITS: espaciadores internos de transcripción "*Internal Transcribed Spacer*"

LCR: líquido cefalorraquídeo

LC-SF; LightCycler® SeptiFast

MALDI-TOF MS: “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry”

miRNA: micro ácido ribonucleico

MPC: MagNA Pure Compact®

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (del inglés “*metilicin resistant Staphylococcus aureus*”)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “*polymerase chain reaction*”)

PCR-TR: PCR en tiempo real

PCT: procalcitonina

RN: recién nacidos

RNyL: recién nacidos y lactantes

RNMBP: recién nacidos de muy bajo peso al nacer

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativo

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SGB: *Streptococcus* grupo B de Lancefield

SGV: *Streptococcus* grupo *viridans*

SIS: SeptiFast Identification Software

SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

Tm: temperatura de disociación (del inglés “*melting*”)

TSB: caldo de triptona y soja (del inglés “*tryptic soy broth*”)

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Sepsis neonatal	3
1.1.1. Introducción	3
1.1.2. Conceptos	3
1.1.3. Definición de sepsis neonatal.....	4
1.1.4. Etiología	7
1.1.5. Incidencia en España	9
1.2. Diagnóstico de sepsis	9
1.2.1. Factores de riesgo	9
1.2.2. Diagnóstico clínico	10
1.2.3. Datos analíticos.....	11
1.2.3.1. Hemograma	11
1.2.3.2. Citocinas	11
1.2.3.3. Reactantes de fase aguda.....	11
1.2.3.4. Otros biomarcadores	12
1.2.4. Diagnóstico microbiológico.....	13
1.2.4.1. Hemocultivo.....	13
1.2.4.1.1. Toma de muestra.....	14
1.2.4.1.2. Periodo de incubación.....	15
1.2.4.1.3. Criterios para la interpretación de resultados positivos.....	16
1.2.4.1.4. Inconvenientes del hemocultivo para el diagnóstico de sepsis neonatal.....	17
1.2.4.1.5. Interpretación de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo en el hemocultivo.....	18
1.2.4.2. Cultivo de otras muestras.....	19
1.2.5. Algoritmo diagnóstico de la sepsis neonatal (Grupo Castrillo)	19
1.3. Sistemas de identificación microbiana	20
1.3.1. Métodos convencionales	20
1.3.1.1. Nuevos métodos fenotípicos	22
1.3.1.2. Métodos moleculares	22
1.4. Diagnóstico directo de microorganismos en sangre	23
1.4.1. Fundamento de la PCR	23
1.4.2. Estrategias de PCR para detección de múltiples patógenos.....	24
1.4.2.1. PCR patógeno específica.....	24

1.4.2.2. PCR universal.....	25
1.4.3. Principales sistemas moleculares comerciales disponibles para el diagnóstico de sepsis a partir de muestra	26
1.5. Sistema LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} (LC-SF).....	26
1.5.1. Fundamento del ensayo LightCycler® SeptiFast Test Mgrade	27
1.5.2. Sensibilidad analítica	30
1.5.3. Aplicaciones de LightCycler® SeptiFast Test Mgrade	30
1.5.3.1. Diagnóstico de sepsis	30
1.5.3.2. Otros contextos clínicos	32
1.5.3.2.1. Endocarditis infecciosa.....	32
1.5.3.2.2. Infección urinaria.....	32
1.5.3.2.3. Aspergilosis invasiva	33
1.5.3.2.4. Infección periprotésica.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1. Pacientes y ámbito del estudio	41
3.2. Muestras	41
3.2.1. Sangre.....	41
3.2.2. Otras muestras.....	41
3.3. Diagnóstico microbiológico	41
3.3.1. Transporte, procesamiento y conservación de las muestras	41
3.3.2. Hemocultivo	42
3.3.2.1. Sistema BACTEC PEDS Plus™/F-BACTEC-9240®	42
3.3.2.2. Procesamiento e identificación de microorganismos en frascos positivos	43
3.3.2.2.1. Identificación presuntiva	43
3.3.2.2.2. Identificación definitiva	44
3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa: LightCycler® SeptiFast Test Mgrade	45
3.3.3.1. Normas generales	45
3.3.3.2. Procedimiento.....	46
3.3.3.2.1. Lisis mecánica.....	46
3.3.3.2.2. Extracción de ácidos nucleicos.....	46
3.3.3.2.3. Amplificación mediante PCR en tiempo real múltiple	48
3.3.3.2.4. Análisis de resultados y cálculo de las temperaturas de disociación	51
3.3.3.2.5. Identificación automática de microorganismos y controles.....	53

3.4. Comparación de métodos de extracción	55
3.4.1. Cepas	55
3.4.2. Extracción mediante el sistema MagNA Pure Compact®	56
3.5. Diagnóstico clínico	57
3.6. Registro y análisis estadístico de los datos	58
3.6.1. Registro de datos	58
3.6.1.1. Datos demográficos	58
3.6.1.2. Datos clínicos	58
3.6.1.3. Datos analíticos	58
3.6.1.4. Datos microbiológicos	59
3.6.2. Análisis estadístico	59
3.6.2.1. Estadística descriptiva	59
3.6.2.2. Análisis bivariante	59
3.6.2.3. Exactitud diagnóstica de la técnica LightCycler SeptiFast	59
3.6.2.4. Estudio de concordancia	59
4. RESULTADOS	63
4.1. Características clínico-epidemiológicas	63
4.2. Resultados microbiológicos	64
4.2.1. Datos globales	64
4.2.2. Resultados del hemocultivo	64
4.2.3. Resultados de la técnica LightCycler® SeptiFast Test Mgrade	65
4.2.4. Comparación del hemocultivo con la técnica LightCycler SeptiFast	65
4.3. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el resultado microbiológico	66
4.4. Diagnóstico clínico final	68
4.4.1. Relación entre el diagnóstico clínico final y los datos clínicos y analíticos	69
4.4.2. Relación entre el diagnóstico clínico final y el resultado microbiológico	70
4.5. Extracción automatizada de ácidos nucleicos con el sistema MagNA Pure Compact®	72
4.6. Anexo	74
5. DISCUSIÓN	79
5.1. Etiología de la sepsis neonatal	79
5.2. Utilidad de la técnica LightCycler SeptiFast en el diagnóstico de sepsis neonatal	80
5.2.1. Utilidad de la extracción automatizada mediante el sistema MagnaPure	84
5.3. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el diagnóstico clínico final	85
5.4. Relación entre la clínica y los datos microbiológicos	86

5.4.1. Relación entre los datos clínicos y analíticos con los resultados microbiológicos.....	86
5.4.2. Relación entre el diagnóstico clínico final y los resultados microbiológicos	87
6. CONCLUSIONES	95
7. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	99
7.1. Tablas.....	99
7.2. Figuras.....	100
8. BIBLIOGRAFÍA.....	105

1 Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sepsis neonatal

1.1.1. Introducción

La sepsis está asociada con altas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (**Angus y cols, 2001**). En el hospedador, la invasión de microorganismos en el torrente circulatorio provoca una respuesta por parte del sistema inmunológico. De esta manera, el daño del paciente séptico viene determinado no sólo por el propio patógeno, que provoca la destrucción de los tejidos por acción directa o indirecta mediante sus toxinas, sino también por la propia respuesta inflamatoria del hospedador que genera daños en órganos y tejidos, al no discriminar bien entre células propias y microbianas (**Nathan, 2002**). Como consecuencia, la sepsis queda definida por alteraciones fisiológicas inespecíficas, siendo difícil discriminar entre la presentación clínica de un paciente con sepsis de un paciente con una respuesta inflamatoria sistémica causada por una inflamación estéril (por ej: pancreatitis, traumatismo o intoxicación) (**Bone y cols, 1992**). Esto junto, con que en un tercio de los casos no se identifica el agente causal (**Bone y cols, 1989**) y el tiempo que requiere la técnica diagnóstica de referencia, el hemocultivo (HC), hasta la obtención de resultados, obliga a la instauración de la terapia antimicrobiana empírica, retrasando el tratamiento adecuado. El uso de antibióticos de amplio espectro contribuye al aumento de resistencias a agentes antimicrobianos (**Wenzel y Edmond, 2000**). Todo esto hace difícil el óptimo manejo del paciente séptico. El uso de biomarcadores específicos de sepsis y de métodos moleculares de diagnóstico parecen ser herramientas prometedoras para mejorar el diagnóstico de sepsis y el manejo del paciente.

1.1.2. Conceptos

La sepsis siempre va a estar asociada con bacteriemia o fungemia, mientras que la bacteriemia o fungemia no siempre se va a deber a la presencia de sepsis. De hecho, aunque los términos de sepsis, septicemia y bacteriemia se suelen usar indistintamente, no es del todo correcto.

La **bacteriemia** hace referencia a la presencia de bacterias en la sangre, confirmada mediante HC positivos, aunque no vayan acompañados de sintomatología. La bacteriemia puede ser:

- a) Transitoria. Suelen ser autolimitadas y de corta duración, pudiendo originarse a partir de procedimientos como técnicas endoscópicas, extracciones dentarias, colocación de dispositivos en el tracto genitourinario, e incluso, durante acciones como cepillarse los dientes (**Foltzer y Reese, 1986**).

- b) Intermitente o recurrente. Los HC son positivos de forma intermitente. Se asocia a situaciones de obstrucción intermitente de un foco de infección, por ejemplo, infección de las vías biliares (**Foltzer y Reese, 1986**).
- c) Continua. Es la que tiene una duración más prolongada, donde los HC positivos se detectan desde varias horas hasta varios días. Suele sugerir un foco intravascular, como endocarditis o tromboflebitis séptica (**Foltzer y Reese, 1986**). Asimismo, tienen lugar en los estados tempranos de algunas infecciones como brucelosis, fiebre tifoidea y tularemia (**Bryan, 1989**).

La **sepsis** es el conjunto de efectos nocivos producidos por los microorganismos o sus productos, aunque los HC sean negativos. La **septicemia** se define como bacteriemia asociada a sintomatología clínica y signos de laboratorio de infección (**Foltzer y Reese, 1986; Bryan, 1989**).

1.1.3. Definición de sepsis neonatal

Aunque el concepto de sepsis forma parte de la práctica diaria de los hospitales, hasta el momento no existe un consenso internacional para definir de forma clara y unívoca la sepsis neonatal. Los primeros intentos de obtener una definición de **sepsis**, fue en 1991, cuando tuvo lugar la primera reunión de consenso cuyos principales objetivos fueron definir en **adultos** la sepsis y otros términos relacionados, y desarrollar guías para la investigación de terapias nuevas para la sepsis. Esta reunión tuvo lugar en Northbrook (EE.UU.) con el auspicio del *American College of Chest Physicians* (ACCP) y la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) (ACCP/SCCM, 1992). A partir de esta conferencia de consenso, se popularizó el concepto de “**síndrome de respuesta inflamatoria sistémica**” (SRIS). El SRIS se define como el conjunto de hallazgos encontrados tras la activación generalizada del sistema inmunitario, con independencia de la causa desencadenante. Entre estos criterios se incluyen criterios clínicos (fiebre, taquicardia, taquipnea) y de laboratorio (leucocitosis o leucopenia), definiendo la *sepsis* como SRIS en presencia de infección.

En 2001, en una nueva conferencia internacional celebrada en Washington (EE.UU.) (**Levy y cols, 2003**), se ratificaron las definiciones originales, profundizándose en otros aspectos como el uso de escalas de gravedad para la sepsis. Algunas novedades fueron introducidas, como un listado flexible de signos y síntomas de SRIS sugestivos de infección.

Aunque la Conferencia de Consenso de Washington había introducido algunas puntualizaciones referentes a la población pediátrica, los conceptos aquí definidos no podían ser aplicados a este grupo.

En 2002 una nueva conferencia con sede en San Antonio (EE.UU.) se encargó de adaptar los conceptos definidos en la Conferencia de Washington a los distintos grupos de edad pediátricos (**Goldstein y cols, 2005**), en la denominada **Conferencia Internacional de Consenso de Sepsis Pediátrica**. En este simposio se define el SRIS con los mismos criterios clínicos y de laboratorio que en los adultos, aunque teniendo en cuenta las peculiaridades que presenta este grupo poblacional. Entre estas modificaciones cabe destacar el establecimiento de valores de normalidad específicos para cada grupo de edad, la inclusión tanto de taquicardia como bradicardia, para los menores de 1 año, y la presencia obligada dentro de los criterios de SRIS, de alteraciones de la temperatura corporal y/o del recuento leucocitario. Las definiciones de infección y de sepsis no fueron modificadas. En este grupo poblacional, sepsis se define como SRIS asociado a infección, considerándose infección cuando ésta ha sido comprobada por métodos de laboratorio y en determinadas situaciones clínicas (petequias y púrpura en una situación de inestabilidad hemodinámica; fiebre, tos e hipoxemia asociado a leucocitosis e infiltrados pulmonares; distensión abdominal con fiebre y leucocitosis asociado a perforación intestinal). Sin embargo, este consenso excluye a los recién nacidos (RN) prematuros, dado que la conferencia se centró en las unidades pediátricas, sin tener en cuenta las unidades de cuidados intensivos, que es donde fundamentalmente reciben atención sanitaria estos pacientes. Debido a esto, es necesario llegar a un consenso sobre las definiciones de SRIS y sepsis en las unidades neonatales, que incluyan además a los niños prematuros. Para ello es necesario tipificar los síntomas clínicos que mejor definan el SRIS neonatal y determinar los valores de hemograma, proteína C reactiva, procalcitonina (PCT) e interleuquinas (IL) que mejor se ajusten a la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica.

En España, desde el año 1995, el **Grupo de Hospitales Castrillo**, integrado por 35 Unidades/Servicios de Neonatología, incluido el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), y coordinado desde el Hospital Universitario Central de Asturias en Oviedo, dedica su actividad al estudio de las infecciones peri-neonatales. Tomando en consideración los consensos internacionales, definen la **sepsis neonatal** como el síndrome clínico caracterizado por mala perfusión, mala tolerancia oral, distrés respiratorio e hipotensión, más positividad de datos de laboratorio (recuento leucocitario alterado según criterios de Manroe y cols y/o proteína C reactiva > 10 mg/L y/o PCT ≥ 0,65 ng/mL) (**Manroe y cols, 1979; López Sastre y cols, 2008**). En el trabajo de Manroe y cols, se establecen los rangos de referencia (valores máximos y mínimos) para el número total de neutrófilos y el índice de neutrófilos inmaduros frente a totales (I/T), desde las primeras horas de vida de los RN hasta los 28 días. Tras el nacimiento, el número **total de neutrófilos** va aumentando hasta alcanzar un pico máximo de 7800-14500 células/mm³ a las 12-14 horas. Este rango va disminuyendo hasta alcanzar un mínimo a las 72 horas de unas 1750 células/mm³, mientras que el valor máximo se

estabiliza en torno a 5400 células/mm³. Estos valores se mantienen hasta 28 días. Respecto al I/T, los valores normales alcanzan un máximo en las primeras 24 horas de vida que se establece en $\leq 0,16$, va cayendo progresivamente hasta las 60 horas en que el valor I/T normal es de $\leq 0,13$, y se mantiene constante en $\leq 0,12$ durante 5 a 28 días.

Además llegaron a un consenso para definir las diferentes situaciones que se pueden presentar a la hora de obtener un diagnóstico de sepsis. **Sepsis comprobada** se basa en la constatación de síntomas o signos clínicos de infección, marcadores biológicos de SRIS (recuento leucocitario alterado según los criterios de Manroe (**Manroe y cols, 1979**), proteína C reactiva >12 mg/L) y HC positivo; **sepsis clínica** en caso de presencia de datos clínicos y marcadores biológicos de SRIS pero HC negativo; **bacteriemia asintomática** por la ausencia de datos clínicos, normalidad de los marcadores biológicos y HC positivo; y **ausencia de infección** en caso de falta de síntomas o signos clínicos, marcadores biológicos normales y hemocultivo negativo (**López Sastre y Pérez Solís, 2006**).

Según el mecanismo de transmisión al RN, la sepsis se clasifica en **sepsis vertical** y **sepsis nosocomial**. La **sepsis de transmisión vertical** es aquella que se produce por vía ascendente al final de la gestación, o por contacto en el momento del parto con microorganismos de la microbiota vaginal. La clínica suele iniciarse en las primeras 72 horas de vida, con frecuencia en forma de enfermedad sobreaguda y habitualmente es posible constatar la existencia de complicaciones obstétricas, que se consideran factores de riesgo de infección bacteriana fetal. La **sepsis de origen nosocomial** es producida por microorganismos procedentes del entorno hospitalario, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), que colonizan al neonato por contacto del personal sanitario (manos contaminadas) o a partir de material contaminado (**López Sastre y cols, 2002**). La clínica suele iniciarse después de las 72 horas de vida y se asocia con algún factor de riesgo relacionado con el empleo de procedimientos invasivos de diagnóstico y tratamiento.

Según el momento de presentación de la infección neonatal, ésta se puede clasificar en **sepsis de inicio precoz** y **sepsis de inicio tardío**. La primera normalmente es de transmisión vertical (aunque a veces se han descrito casos de sepsis precoz de origen hospitalario) y se presenta desde el nacimiento hasta los 7 días de vida. La sepsis de inicio tardío se presenta a partir de los 7 días (**Benjamin y Stoll, 2006**). La sepsis tardía es de transmisión horizontal, y se produce por contacto con personas colonizadas, entre las que se encuentra el ámbito hospitalario. También se ha descrito la leche materna de la madre colonizada como otra posible vía de transmisión (**López Sastre y cols, 2000; López Sastre y cols, 2002**).

1.1.4. Etiología

La etiología suele ser diferente en la sepsis vertical y nosocomial. La **sepsis de transmisión vertical** se produce por la exposición del RN a microorganismos presentes en el tracto genital materno, principalmente en el momento del parto. Los microorganismos más frecuentes asociados a sepsis vertical son *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* grupo B de Lancefield, SGB) y *Escherichia coli* (López Sastre y cols, 2000; Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006; Verani y cols, 2010; Stoll y cols, 2011), y otros menos frecuentes son *Enterococcus faecalis*, otros *Streptococcus*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* y *Haemophilus influenzae*. La transmisión transplacentaria también es posible, causada principalmente por *Listeria monocytogenes* (Kaufman y Fairchild, 2004) aunque este microorganismo se aísla con escasa frecuencia en España en este contexto (López Sastre y cols, 2000).

La causa más común de **sepsis nosocomial** en el RN es *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), seguido de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Pseudomonas spp* (Stoll y cols, 2002; Bizzarro y cols, 2005). Entre los SCN, destaca *Staphylococcus epidermidis* (Burnie y cols, 1997; de Silva y cols, 2001). *S. epidermidis* es el más frecuente entre los Gram positivo (G+), y *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* entre los Gram negativo (G-). *Candida spp* también es un patógeno asociado a sepsis nosocomial, más frecuentemente en niños de muy bajo peso al nacer (RNMBP) (Benjamin y cols, 2003).

La etiología en **España** es similar a la de los países desarrollados. En la tabla 1.1 se muestra los microorganismos causantes de sepsis vertical (Fernández Colomer y cols, 2008) y nosocomial (Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006) en España, según datos recogidos por el Grupo de Hospitales Castrillo. Se muestran tres periodos de estudio para la sepsis de transmisión vertical, observándose recientemente una reducción de casos debidos a microorganismos G+, pasando de más del 75% en los años 90 a casi un 50% en el 2006. Esto se debe fundamentalmente a la disminución de casos de sepsis neonatal por SGB, gracias a la implantación generalizada de los programas de prevención (Fernández Colomer y cols, 2008).

Tabla 1.1. Etiología de la sepsis vertical y nosocomial en España (Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006; Fernández Colomer y cols, 2008)

Patógeno	Sepsis de transmisión vertical [n (%)]		
	1996-1997; n = 367	2001-2002; n = 211	2006; n = 97
Gram-positivo	293 (79,8)	134 (63,5)	58 (59,8)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	186 (50,7)	78 (37)	30 (30,9)
<i>Enterococcus faecalis</i>	33 (9)	21 (9,9)	11 (11,3)
Otros estreptococos	32 (8,7)	13 (6,1)	6 (6,2)
<i>Listeria monocytogenes</i>	5 (1,3)	7 (3,3)	7 (7,2)
Otros	37 (10,1)	15 (7,1)	4 (4,1)
Gram-negativo	74 (20,1)	73 (34,6)	36 (26,8)
<i>Escherichia coli</i>	41 (11,2)	55 (26,1)	26 (26,8)
<i>Klebsiella</i>	10 (2,7)	7 (3,3)	4 (4,1)
<i>Enterobacter</i>	3 (0,82)	3 (1,4)	3 (3,1)
<i>Haemophilus influenzae</i>	3 (0,82)	4 (1,9)	- (-)
Otros	17 (4,6)	4 (1,9)	3 (3,1)
<i>Candida</i> spp	- (-)	3 (1,4)	3 (3,1)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	- (-)	1 (0,5)	- (-)
Patógeno	Sepsis Nosocomial [n (%)]		
	1996-1997; n = 730		
Gram-positivo	432 (59,2)		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	310 (44,2)		
<i>Enterococcus faecalis</i>	57 (7,8)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	31 (4,2)		
Otros	34 (4,7)		
Gram-negativo	209 (26,6)		
<i>Escherichia coli</i>	58 (7,9)		
<i>Klebsiella</i> spp	51 (7)		
<i>Pseudomonas</i>	36 (4,9)		
<i>Enterobacter</i> spp	28 (3,8)		
Otros	26 (3,6)		
Hongos	89 (12,2)		
<i>Candida</i> spp.	85 (11,6)		
Otros	4 (0,5)		

Según los datos de **sepsis nosocomial** recogidos por el Grupo de Hospitales Castrillo en el período 1996-1997, casi el 60% de todos los aislados fueron G+, destacando *S. epidermidis* (44,2%), más del 25% G- y el 12% hongos. De los casos de sepsis por microorganismos G-, los patógenos aislados más frecuentemente fueron *E. coli* y *Klebsiella* spp. La sepsis causada por *E. coli*, *Enterobacter* spp. y *Streptococcus* grupo *viridans* (SGV) fueron significativamente más frecuentes en

neonatos con un peso al nacer ≥ 1500 g que en RNMBP (10,0% vs 5,7%; 5,4% vs 2,2%; 3,5% vs 0,3% respectivamente) (López Sastre y cols, 2002).

1.1.5. Incidencia en España

El Grupo de Hospitales Castrillo llevó a cabo estudios epidemiológicos de sepsis vertical y de sepsis nosocomial, situando la incidencia en España de sepsis de transmisión vertical en 2,5 por mil RN vivos (López Sastre y cols, 2000), y la sepsis nosocomial en 2,1 por cien RN ingresados en unidades neonatales, siendo de 15,6% RNMBP, y 1,16% para los RN de peso ≥ 1500 g. La tasa de mortalidad en la sepsis vertical es del 8,7%, mientras que en la sepsis nosocomial alcanza el 11,8%, siendo mayor en RNMBP (17,3% vs 6,5%) (López Sastre y cols, 2000; López Sastre y cols, 2002).

Durante el periodo 1996-2007, se observa en España una disminución del 56% en la frecuencia de sepsis vertical pasando de una incidencia del 2,4‰ en 1996 al 1,04‰ en 2007 (López Sastre y cols, 2008). La causa fundamental de este descenso es la implantación de los programas de prevención de sepsis neonatal por SGB, mediante profilaxis intraparto en las madres colonizadas y/o con factores de riesgo (Verani y cols, 2010), los cuales lograron reducción de la sepsis por SGB del 73% (1,25‰ en 1996 vs 0,34‰ en 2007). Un problema relacionado con la profilaxis intraparto, podría ser el aumento de sepsis vertical por otros microorganismos, especialmente *E. coli*, causante de infecciones más graves y que implican además un aumento de la resistencia antimicrobiana (López Sastre y cols, 2000). Esta situación fue analizada en los 11 años de seguimiento y no observaron un incremento significativo de la incidencia de sepsis vertical por *E. coli* (variaciones entre 0,2-0,3‰).

1.2. Diagnóstico de sepsis

1.2.1. Factores de riesgo

Los factores de riesgo implicados en el desarrollo de *sepsis de transmisión vertical* en el RN son parto prematuro, ruptura prematura de membranas superior a 18 h, fiebre materna intraparto y corioamnionitis (López Sastre y cols, 2000).

Dentro de la *sepsis nosocomial*, la presencia de catéter venoso epicutáneo, de ventilación mecánica y la administración de nutrición parenteral, lípidos intravenosos y/o antibioterapia previa han destacado de forma significativa como factores de riesgo dentro del grupo de RNMBP en comparación con los neonatos de peso ≥ 1500 g. Por el contrario, la cirugía previa se ha registrado más frecuentemente y de forma significativa en este último grupo (López Sastre y cols, 2002).

1.2.2. Diagnóstico clínico

Las manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal pueden ser muy variadas (tabla 1.2). Estas características suelen ser inespecíficas, sutiles y difíciles de reconocer. Los síntomas y signos tales como taquipnea transitoria, síndrome de aspiración del meconio, distrés respiratorio, apnea (en prematuros) y exacerbación aguda de un trastorno pulmonar están asociados a sepsis neonatal, pero también se pueden presentar por otras causas (Ng, 2004).

Tabla 1.2. Manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal

Clínica inicial
<ul style="list-style-type: none">- “No va bien”- Mala regulación de la temperatura (fiebre/hipotermia)- Dificultades para la alimentación- Apnea- Taquicardia inexplicable
Fase de estado. Se acentúa la clínica inicial y además:
Síntomas digestivos: <ul style="list-style-type: none">- Rechazo de tomas- Vómitos / diarrea- Distensión abdominal- Hepatomegalia- Ictericia
Síntomas respiratorios: <ul style="list-style-type: none">- Quejidos, aleteo, retracciones- Respiración irregular- Taquipnea- Cianosis- Fases de apnea
Signos neurológicos: <ul style="list-style-type: none">- Apatía / irritabilidad- Hipotonía / hipertonía- Temblores / convulsiones- Fontanela tensa
Fase tardía. Se acentúa la clínica anterior y además:
Signos cardiocirculatorios: <ul style="list-style-type: none">- Palidez / cianosis / moteado (“aspecto séptico”)- Hipotermia, pulso débil- Respiración irregular- Relleno capilar lento- Hipotensión
Signos hematológicos: <ul style="list-style-type: none">- Ictericia a bilirrubina mixta- Hepatoesplenomegalia- Palidez- Púrpura- Hemorragias

(tomado de Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006)

1.2.3. Datos analíticos

Tan importante como establecer el diagnóstico de sepsis es llegar al mismo de forma precoz para iniciar tratamiento empírico. Los resultados microbiológicos, principalmente basados en el HC pueden tardar varios días. A lo largo de los años se han empleado diferentes marcadores analíticos de infección, que ofrecen una elevada sensibilidad y valor predictivo negativo (VPN), cuyos valores se miden en base a unos puntos de corte, y que han demostrado ser útiles en el diagnóstico precoz de sepsis neonatal, especialmente los datos del hemograma y la determinación de citocinas y de reactantes de fase aguda (Ng y Lam, 2006).

1.2.3.1. Hemograma

En el período neonatal los límites del recuento leucocitario normal son muy amplios. Aún así, los resultados del hemograma que han demostrado mayor relación con la sepsis son la presencia de leucopenia (<5.000 células/mm³), leucocitosis (>30.000 células/mm³), el índice de neutrófilos inmaduros/ neutrófilos maduros (I/M) $>0,20$ y el índice neutrófilos inmaduros/ neutrófilos totales (I/T) $>0,16$ (Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006; García del Río y cols, 2008).

1.2.3.2. Citocinas

Las citocinas son factores solubles no específicos de antígeno producidos mayoritariamente por leucocitos implicadas en la respuesta frente a agentes infecciosos, encontrándose elevadas en infecciones, en otros procesos patológicos como traumatismos, e incluso en parto normal (Ng y cols, 1997; Chiesa y cols, 2003). En caso de infección, entre las distintas citocinas, es la interleuquina 6 (IL-6) la que se eleva rápidamente después de la infección bacteriana, precediendo a la elevación de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva. Presenta una vida media muy corta, siendo prácticamente indetectable a las 24 horas (Ng y cols, 2003). Además la IL-6 se eleva en presencia de corioamnionitis y de estrés fetal, entre otras situaciones. Debido a la estrecha ventana de detección, se recomienda su uso en combinación con otros marcadores más tardíos, como la proteína C reactiva, para mejorar su utilidad como biomarcador de sepsis (Ng y cols, 1997).

1.2.3.3. Reactantes de fase aguda

Los reactantes de fase aguda son proteínas inespecíficas, producidas principalmente por el hígado en respuesta a inflamación tisular, infección y trauma (Chiesa y cols, 2003). Los de mayor utilidad en el contexto de la sepsis neonatal son la proteína C reactiva y la PCT.

- Proteína C reactiva

Es una proteína sintetizada predominantemente en los hepatocitos y los macrófagos alveolares en respuesta a una variedad de citocinas, incluyendo IL-6. Posee un importante papel inmunomodulador, al participar en la cascada del complemento y en la regulación de la opsonización bacteriana y la fagocitosis. La proteína C reactiva sérica se caracteriza por una rápida respuesta a la inflamación y una corta vida media. Aunque se encuentra elevada en la sepsis, no constituye un marcador específico, ya que puede estar aumentada en otras situaciones no infecciosas (**Benitz y cols, 1998**) como neumotórax, hemorragia intraventricular, síndrome de aspiración de meconio, uso de esteroides y profilaxis antibiótica intraparto (**Chiesa y cols, 2011**). Por otro lado, no se encuentra elevada en otros procesos con una sintomatología semejante a la sepsis, como son el síndrome de distrés respiratorio y la asfixia perinatal. La mayoría de infecciones virales no están asociadas con un aumento de proteína C reactiva, aunque en algunas infecciones virales se puede encontrar elevada, pudiendo ser indicativo de sobreinfección bacteriana (**Benitz y cols, 1998**). La determinación de la proteína C reactiva está ampliamente implantada en los laboratorios clínicos, no suponiendo un coste elevado. En la sepsis neonatal, un valor superior a 1 mg/dL de proteína C reactiva se considera patológico.

- Procalcitonina

La PCT es un polipéptido precursor de la calcitonina, que se sintetiza en la mayoría de tejidos en respuesta a una gran variedad de procesos patológicos e infecciosos, alcanzando una concentración elevada en sangre a partir de las tres horas del estímulo. Sin embargo, la PCT puede elevarse en presencia de complicaciones maternas y perinatales, sin que ello suponga desarrollo de sepsis en el neonato. La colonización materna por SGB, ruptura de membranas ≥ 18 horas, corioamnionitis, preeclampsia en la madre e hipoxemia en el RN, son ejemplos de ello (**Chiesa y cols, 2003**), además de elevarse de manera fisiológica en las primeras 48 horas de vida. Los valores patológicos de PCT en la sepsis neonatal están por encima de 0,7 ng/mL.

1.2.3.4. Otros biomarcadores

- Receptores leucocitarios

Durante una respuesta inflamatoria sistémica, en la superficie de los leucocitos polimorfonucleares circulantes se expresan los receptores CD64. Son glicoproteínas con una alta afinidad por la fracción Fc de la IgG, y que juega un papel coordinando procesos tales como endocitosis, fagocitosis y producción de citocinas (**Van Vugt y cols, 1999**). Se ha demostrado que el porcentaje de polimorfonucleares expresando CD64 es mayor en pacientes con SRIS que en los no-

SRIS (**Qureshi y cols, 2001**). La determinación del índice CD64 en neonatos críticos podría ser útil en la detección de sepsis en combinación con otros biomarcadores con mayor sensibilidad (**Icardi y cols, 2009; Labib y cols, 2013**). Otros receptores celulares de superficie de leucocitos son CD69, CD25, CD28, etc que se han descrito como biomarcadores de sepsis (**Pierrakos y Vincent, 2010**).

- **microRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de pequeñas moléculas de ARN no codificantes, que controlan la expresión génica post-transcripcional de ARNm y juegan un papel importante en la regulación de numerosos procesos celulares, incluidos inflamación e inmunidad. Algunos estudios han observado que un número limitado de miRNA muestran una expresión alterada en el contexto de inflamación o sepsis (**Vasilescu y cols, 2009; Wang y cols, 2010**).

Mediante técnicas de secuenciación masiva, recientemente, se han identificado algunos miRNAs y se ha analizado la expresión diferencial de cada uno de ellos en el contexto de la sepsis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) cuantitativa (**Ma y cols, 2013**). Destacan dos de estos marcadores, denominados miR-4772-5p iso y miR-150, que se encuentran significativamente disminuídos en el contexto de la sepsis. Estos biomarcadores podrían suponer una herramienta muy prometedora para el diseño y comercialización de sistemas “point of care” para el diagnóstico precoz de sepsis.

1.2.4. Diagnóstico microbiológico

Las muestras y procedimientos recomendados para el diagnóstico de sepsis neonatal son HC, cultivo del líquido cefalorraquídeo (LCR), urocultivo y cultivo de exudados periféricos (**Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006**).

1.2.4.1. Hemocultivo

El cultivo de sangre está considerado como la técnica de referencia para el diagnóstico de sepsis y es el único método para aislar e identificar el microorganismo responsable de bacteriemia en el paciente (**Aronson y Bor, 1987**), y además permite realizar posteriores pruebas de sensibilidad a antimicrobianos. Esto es primordial para establecer el tratamiento antimicrobiano óptimo y la duración adecuada del mismo. La exclusión de bacteriemia también es importante, ya que permite reducir la estancia y coste hospitalarios, así como el tratamiento antibiótico innecesario, lo cual a su vez, disminuye el desarrollo de resistencias.

Los HC actualmente se llevan a cabo en sistemas de monitorización continua usando equipos totalmente automatizados, que incuban las muestras de HC. Estos equipos detectan crecimiento microbiano mediante el análisis de la liberación de CO₂ como consecuencia del metabolismo microbiano. Los sensores que detectan esto pueden ser por ejemplo, fluorimétricos (Sistema Bactec 9240; Becton Dickinson) o colorimétricos (Sistema BacT/Alert; bioMerieux).

En caso de sospecha de *sepsis relacionada con catéter* se realiza, además del cultivo de la sangre obtenida por venopunción, el cultivo de sangre a través del catéter intravascular (**Aronson y Bor, 1987**). Teóricamente, los HC que parten de un mayor inóculo bacteriano (los sembrados con sangre obtenida por la luz del catéter) deben tener tiempos de crecimiento más cortos que los inoculados con sangre periférica. Las diferencias en tiempo de crecimiento de un mismo microorganismo, entre HC simultáneamente tomados por venopunción y a través de catéter, ha demostrado ser útil para orientar sobre el origen de la bacteriemia, asociándolo a la presencia del catéter. Blot y cols. establecen que una bacteriemia puede ser asociada a la presencia del catéter cuando el mismo microorganismo crece en el HC tomado a través de catéter y en el HC por venopunción (tomados ambos simultáneamente) con una diferencia mínima de 120 minutos (**Blot y cols, 1998**). El cultivo de la punta de catéter, si éste es retirado, y del exudado de la conexión o del exudado de la zona de inserción del catéter son también de utilidad (**Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006**).

Existen una serie de factores que van a influir en los resultados del HC y en la relevancia clínica de los mismos.

1.2.4.1.1. Toma de muestra

- Desinfección de la piel

La extracción de sangre se debe realizar en condiciones estériles. La causa más frecuente de contaminación del HC es una pobre preparación de la piel (**Washington e Ilstrup, 1986**). La técnica más recomendada es la desinfección de la zona de punción con alcohol de 70° y posteriormente con gluconato de clorhexidina al 0,5%. En RN no es recomendable usar antisépticos yodados por la posible afectación de la función tiroidea.

- Momento de la extracción

El momento óptimo para la extracción de sangre para HC sería cuando la concentración de microorganismos en el torrente circulatorio es máxima. Esto ocurre 1-2 horas antes de la aparición de fiebre y/o escalofríos, por lo que esta muestra es casi imposible de conseguir. Por ello, se recomienda la toma de HC “lo antes posible” en el transcurso de un episodio febril (**Aronson y Bor,**

1987). La extracción de sangre debe realizarse antes de la administración de antimicrobianos; si esto no fuera posible, se debe extraer justo antes de la siguiente dosis de antimicrobiano.

- **Volumen de sangre**

El volumen de sangre recomendado para HC viene definido en función de la edad (**Schelonka y cols, 1996**):

- $\geq 0,5$ mL para pacientes hasta el primer mes de vida
- ≥ 1 mL para pacientes entre 1 mes y 36 meses
- ≥ 4 mL para pacientes ≥ 36 meses

- **Número de extracciones y/o lugares anatómicos**

El número de extracciones óptimo para documentar una bacteriemia se recomienda que sea de 2 a 3, tomadas de diferentes lugares anatómicos. De esta forma se detectan más del 95% de las bacteriemias (**Loza y cols, 2003**), ya que mejora la detección de patógenos en caso de bacteriemias intermitentes y de baja densidad bacteriana (**Wiswell y Hachey, 1991**), además se incrementa la capacidad de diferenciar entre contaminación y verdadera infección (**Mylotte y Tayara, 2000**). Un número de extracciones superior a 3 se desaconseja por no ser coste/efectivo y por aumentar innecesariamente el trabajo de laboratorio. Algunos autores defienden que una sola extracción es suficiente para constatar un episodio séptico en un neonato, ya que en éste, el aclaramiento bacteriano es más lento y la bacteriemia es más continua que la que se da en el adulto (**Sarkar y cols, 2006**), aunque recomendando un volumen de sangre ≥ 1 mL.

Habitualmente debido a las características clínicas de los neonatos sólo se consigue obtener un único HC y en muchas ocasiones con un volumen inferior a 1 mL. Debido a que la sepsis causada por microorganismos anaerobios en la población neonatal es extremadamente rara, a menos que se especifique lo contrario, es preferible usar el total de dicho volumen de sangre para el cultivo aerobio (**Kellogg y cols, 2000**).

La Asociación Española de Pediatría (AEP) recomienda dos extracciones de sangre periférica diferentes, siempre que sea posible, ya que fundamentalmente en RN prematuros puede haber mucha dificultad para realizarlas, y se acepta una sola punción periférica (**Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006**).

1.2.4.1.2. Periodo de incubación

Actualmente, el HC se lleva a cabo en sistemas comerciales líquidos que se incuban en equipos donde se realiza la incubación del HC y la lectura continua y automática del crecimiento

microbiano. Habitualmente, los HC se incuban durante 5-7 días, excepto cuando existe sospecha de infección por microorganismos de crecimiento más lento y/o dificultoso, como *Haemophilus*. Es importante que el clínico notifique esta sospecha para que la incubación del HC se prolongue hasta al menos 14 días.

1.2.4.1.3. Criterios para la interpretación de resultados positivos

Aunque el HC es el método de referencia para el diagnóstico de sepsis, posee numerosos inconvenientes asociados al mismo como son la detección de microorganismos potenciales contaminantes, la disponibilidad de pocas tomas de un mismo episodio, etc. Por ello, en general, para la interpretación de un resultado positivo del HC se pueden usar diferentes herramientas, como son: microorganismo identificado, número de tomas positivas, cuantificación del HC y tiempo de positividad.

- Se consideran **microorganismos con un papel probablemente patógeno**: las enterobacterias, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, SGB y *L. monocytogenes*, entre otros. Por el contrario, son **microorganismos potencialmente contaminantes** SCN, SGV, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Propionibacterium acnes* y otros. En algunas situaciones estos microorganismos pueden ser responsables de auténticas bacteriemias y, no ser meras contaminaciones, por tanto, hay que tener en cuenta otros parámetros.
- El **número de extracciones**, sobre todo cuando el microorganismo causal es un potencial contaminante, puede ayudar a diferenciar entre verdadera bacteriemia de contaminación.
- El **HC cuantitativo** consiste en realizar un contaje de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el HC. Aunque se ha observado una correlación entre la densidad de bacterias en sangre y la clínica en el caso de sepsis estafilocócica, no ocurre lo mismo con los microorganismos frecuentemente patógenos en niños, *S. pneumoniae*, SGB, *L. monocytogenes* y *H. influenzae* tipo *b* (Phillips y Bradley, 1990).
- En neonatos, el **tiempo de detección** del microorganismo en el HC constituye una herramienta útil para poder diferenciar probable causa de sepsis de contaminación, especialmente en microorganismos que son contaminantes potenciales de la toma. Los patógenos clínicamente importantes se detectan en las primeras 24 horas de incubación (Jardine y cols, 2006). De hecho, bacterias como *E. coli* y SGB suelen detectarse antes de 16 horas de incubación. Por el contrario, si un microorganismo

es detectado en un período superior a 3 días, muy probablemente se puede asociar con contaminación (**Ruderman y cols, 1988**).

1.2.4.1.4. Inconvenientes del hemocultivo para el diagnóstico de sepsis neonatal

La determinación de la sensibilidad y especificidad del HC es difícil debido a que no existe un patrón de oro independiente para compararlo (**Aronson y Bor, 1987**). Por ello, aunque sigue considerándose la técnica de referencia para el diagnóstico de sepsis, tiene un valor muy limitado en el período neonatal. Esto es debido al elevado número de falsos negativos (FN) y falsos positivos (FP) que con frecuencia se obtienen con estos cultivos.

Otras dificultades que se pueden añadir al HC es el hecho de requerir varios días de incubación y que la bacteriemia en los RN es a menudo transitoria o intermitente, especialmente en los primeros estadios de la infección (**Polin, 2003**).

- Falsos negativos

En los RN es frecuente obtener HC negativos en presencia de fuertes indicios de sepsis clínica (**Kaufman y Fairchild, 2004**). Sólo el 25,2% de pacientes pediátricos ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), con evidencia clínica de sepsis tienen HC positivo (**Jacobs y cols, 1990**). De entre los posibles factores causantes de estos FN, el más importante es el limitado volumen de sangre (**Hall y cols, 1976; Jawaheer y cols, 1997**). Las bacteriemias de bajo nivel, definidas como aquellas con una concentración de patógenos en sangre ≤ 10 UFC/mL se presentan, según los datos de Kellogg y cols, en el 68% de los casos de sepsis, donde un 47% tiene una concentración de bacterias en sangre ≤ 1 UFC/mL (**Kellogg y cols, 1997**). Por ello, se recomiendan dos extracciones de sangre, aunque en la mayoría de los RN críticos esto no es posible. El uso de antibióticos intraparto también puede ser causa de resultados FN del HC del RN con sepsis (**López Sastre y cols, 2008**).

- Falsos positivos

Las contaminaciones del HC representan un gran problema para los laboratorios clínicos de microbiología y para las instituciones sanitarias. Los HC contaminados pueden derivar en una administración innecesaria de antimicrobianos, estancias hospitalarias prolongadas y un aumento significativo de los costes hospitalarios. Según un estudio previo, un HC contaminado puede incrementar la estancia del paciente en 4,5 días y derivar en un coste global de 5000 \$ (**Ernst, 2004**). De acuerdo con la *American Society for Microbiology*, la tasa de HC contaminados en un hospital no debe exceder del 3%. Los principales microorganismos contaminantes suelen proceder de la microbiota epitelial, donde destaca el papel de SCN (**Ernst, 2004**).

1.2.4.1.5. Interpretación de *Staphylococcus coagulasa negativo* en el hemocultivo

SCN constituye uno de los patógenos más comunes de sepsis nosocomial en los RN de las UCIN. Esto se debe fundamentalmente a que en estos pacientes aumenta el uso de catéteres venosos centrales y a que suelen recibir alimentación parenteral y lípidos intravenosos (Huang y cols, 2006). Sin embargo, SCN como principal integrante de la microbiota epitelial, constituye el microorganismo más asociado a contaminaciones del HC. Para diferenciar una verdadera bacteriemia de una contaminación por SCN, son útiles algunas de las herramientas descritas anteriormente.

- **Número de tomas positivas.** El aislamiento de un mismo SCN en todas las tomas de un HC junto con los datos clínicos y analíticos podría establecer este microorganismo como agente causal de un episodio de sepsis neonatal (García García y cols, 1990). Sin embargo, algunos autores han postulado que la obtención de dos muestras de sangre simultáneas de sitios diferentes en este grupo de pacientes es, además de difícil de conseguir, de dudosa eficacia para distinguir entre patógeno y contaminante (Mirrett y cols, 2001).
- **Hemocultivo cuantitativo.** Phillips y Bradley, en 1990, no detectaron ningún caso de sepsis por SCN con un conteo ≤ 5 UFC/mL obteniendo una media de 39,5 UFC/ml.
- **Tiempo de positividad.** El tiempo de positividad para detectar SCN en un HC puede ser una de las herramientas más útiles para diferenciar entre patógeno y contaminante, sobre todo cuando sólo es posible realizar una extracción, como ocurre frecuentemente en los RN, y más aún en los ingresados en UCIN. Si el tiempo de positividad es ≤ 15 horas presenta un valor predictivo positivo (VPP) como patógeno del 84%, y si es ≥ 22 horas, tiene un VPP como contaminante del 87% (Haimi-Cohen y cols, 2003; Jardine y cols, 2006).

1.2.4.2. Cultivo de otras muestras

- **Líquido cefalorraquídeo.** Más de un tercio de las sepsis neonatales se asocian a meningitis bacterianas. Se ha demostrado un elevado porcentaje de FN del HC en casos de meningitis confirmadas en la muestra de LCR (**Benjamin y Stoll, 2006**). Por ello, es necesario realizar punción lumbar para cultivo del LCR, si las condiciones clínicas del neonato lo permiten.
- **Orina.** El urocultivo es obligado en todos los RN con sospecha de sepsis nosocomial. Debe ser realizado a partir del tercer día de vida, por la baja sensibilidad que presenta si se lleva a cabo antes de las 72 horas. La muestra de orina debe ser obtenida por punción suprapúbica o por cateterización de la uretra. Las bolsas adhesivas perineales para la recogida de orina son difíciles de evaluar debido a las frecuentes contaminaciones que presentan (**Dalet y cols, 2002**).
- **Exudados periféricos.** En la sepsis de transmisión vertical están indicados el examen de frotis recto-vaginal materno en el momento del parto para detección de SGB (si no se realizó este cribado durante la gestación en las semanas 35-37) y los cultivos de exudados periféricos en el RN. Las muestras de superficies cutáneas y mucosas que más se utilizan son: frotis ótico, frotis faríngeo, frotis umbilical. Sólo indican exposición a un agente infeccioso, pero tienen un papel orientativo en la identificación etiológica de la sepsis vertical, fundamentalmente en presencia de clínica séptica y HC negativo (Rosa-Fraile y cols, 2002), resultado que puede deberse al tratamiento antibiótico intraparto administrado a la madre. El cultivo de exudados periféricos en RN para diagnóstico de sepsis vertical ha sido objeto de crítica por ser en muchos casos de rentabilidad dudosa, por lo que algunos aconsejan su reducción e incluso prescindir de ella (**Evans y cols, 1988; Fulginiti y Ray, 1988**). Para reducir el coste, actualmente muchos autores recomiendan el cultivo de los exudados periféricos de mayor rentabilidad como son el frotis ótico y faríngeo (**Gasser Laguna y cols, 1996**).

1.2.5. Algoritmo diagnóstico de la sepsis neonatal (Grupo Castrillo)

En España, el Grupo Castrillo establece un algoritmo diagnóstico para la sepsis neonatal. Ante RN con factores de riesgo para el desarrollo de sepsis vertical o nosocomial y con “clínica séptica”, la demostración de datos analíticos patológicos, permiten definir el síndrome como *sepsis probable*, ante la cual se puede y debe comenzar un tratamiento empírico precoz. La *sepsis probable* puede ser *sepsis probada*, si el resultado microbiológico es positivo o *sepsis clínica*, cuando se cumplen los criterios clínicos y analíticos pero el resultado microbiológico es negativo (figura 1.1) (**Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006**).

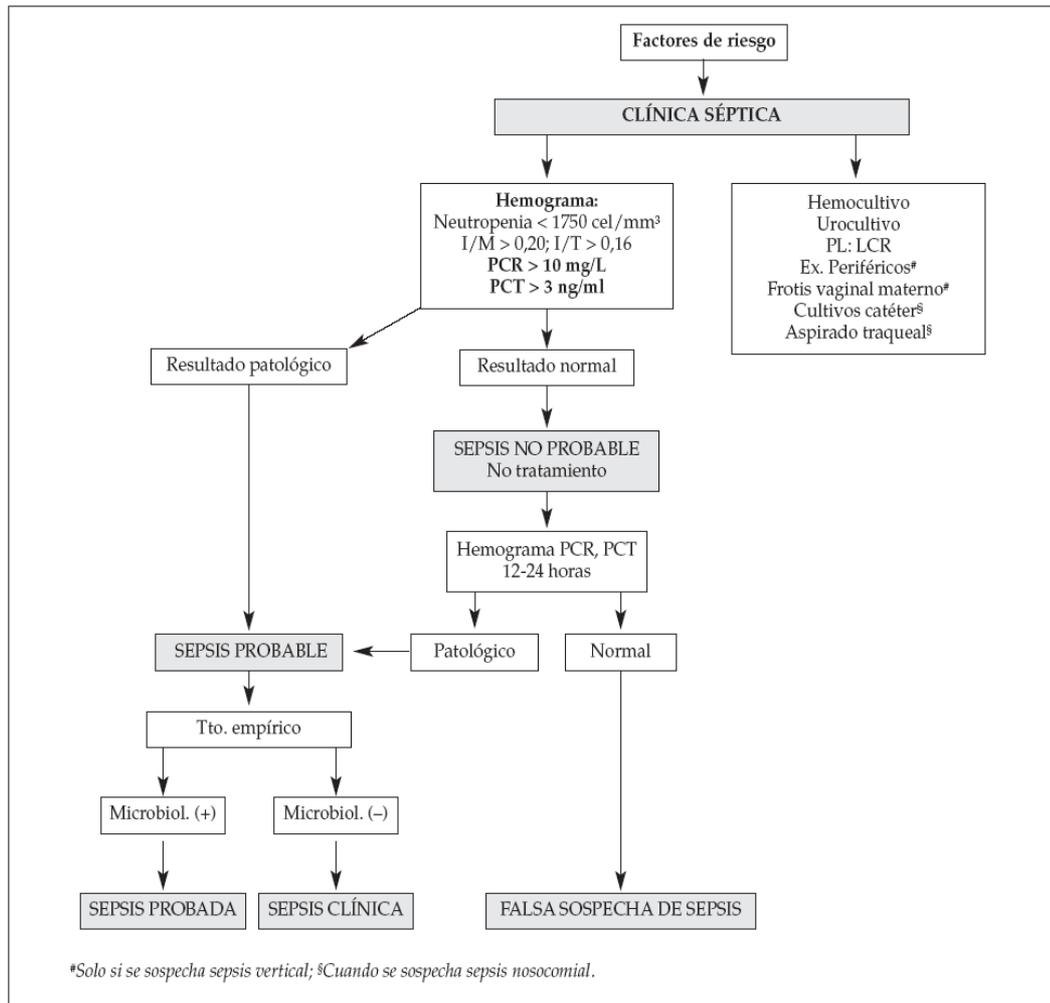


Figura 1.1. Algoritmo diagnóstico de la sepsis neonatal (tomado de Coto Cotallo e Ibáñez Fernández, 2006). I/M: índice neutrófilos inmaduros/neutrófilos maduros; I/T: índice neutrófilos inmaduros/neutrófilos totales.

1.3. Sistemas de identificación microbiana

Una vez que el sistema automatizado detecta crecimiento en los frascos de HC, la identificación de los posibles patógenos se puede realizar aplicando directamente determinadas técnicas al contenido de los frascos o bien haciendo previamente un subcultivo del mismo en medio de cultivo sólido.

1.3.1. Métodos convencionales

- **Tinción de Gram.** Es una tinción diferencial, que en función de la morfología celular y la composición de la pared celular bacterianas es capaz de separar en cuatro grupos a las bacterias: cocos G+, cocos G-, bacilos G+ y bacilos G- (**Koneman y cols, 2006**). Cuando el sistema automatizado detecta crecimiento bacteriano, el contenido de la botella es analizado mediante la tinción de Gram y la realización de subcultivos. Los

hallazgos de la tinción de Gram se informan a los clínicos para una adecuada selección del tratamiento antimicrobiano, además de ser útil en la elección de las pruebas bioquímicas de identificación.

- **Procedimientos bioquímicos.** Sobre las colonias crecidas en los subcultivos, se pueden realizar varias observaciones preliminares bioquímicas. Ejemplo de ello, es la evaluación de las propiedades de la utilización de la lactosa de los bacilos G-, que se puede realizar directamente sobre el agar MacConkey observando una pigmentación roja de las colonias. Además, también se pueden realizar sobre colonias aisladas en los subcultivos distintas pruebas “rápidas”, que pueden aportar información para seleccionar una posterior batería de pruebas bioquímicas o incluso, dar una buena identificación a nivel de especie (prueba de la catalasa, prueba de la oxidasa, prueba de la coagulasa, etc). La batería de pruebas bioquímicas se basa en la detección de sistemas enzimáticos característicos de cada especie. Estas enzimas se detectan al añadir un determinado inóculo bacteriano sobre sustratos específicos (ejemplo, hidratos de carbono) e indicadores químicos. Por medio de estos indicadores, se pueden observar cambios en el pH o cambios de color, provocados por la utilización de los sustratos o por los productos específicos generados. Actualmente existen sistemas comerciales como sistema API (bioMérieux), Vitek2 (bioMérieux) o MicroScan (Dade Behring, West Sacramento, CA), que son sistemas miniaturizados de estas características bioquímicas, que permiten obtener una buena identificación bacteriana, con un coste relativamente bajo (**Koneman y cols, 2006**).
- **Antibiograma.** La sensibilidad de un microorganismo patógeno a determinados antimicrobianos sirve como guía para el tratamiento de las infecciones. La realización del antibiograma sólo es posible a partir de colonias aisladas en cultivo. Hay excepciones que pueden determinar la existencia de genes de resistencia o bien la presencia de determinados enzimas responsables del fenotipo de resistencia. El estudio fenotípico del perfil de susceptibilidad de un microorganismo se estudia actualmente mediante los paneles anteriormente citados que incluyen antibiograma, así como por otros métodos como son disco-placa, E-test etc, en base a los procedimientos recomendados en los documentos específicos de los principales organismos oficiales: *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)* (**Wayne, 2008**) y *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/.

1.3.1.1. Nuevos métodos fenotípicos

MALDI-TOF MS (“*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*”) es una técnica recientemente introducida que permite la identificación de microorganismos, al analizar péptidos o proteínas específicos. Los microorganismos son embebidos en una matriz, y cargados en el interior de un espectrómetro de masas, donde son bombardeados con láser UV. La matriz absorbe la energía procedente del láser y la muestra se vaporiza, liberándose iones de distintos tamaños. Estos iones presentan en función de su masa, distintos tiempos de vuelo a través del denominado “*flight tube*”, y son recogidos por un detector. A partir de los tiempos de vuelo se calcula la masa de los iones y se genera el correspondiente espectro de masas, que es más o menos específico de un género o especie microbiana. Los espectros de masas se comparan con una base de datos y se obtiene la identificación del microorganismo (**Giebel y cols, 2010**). Esta técnica puede ser utilizada a partir de las colonias crecidas en el subcultivo en placa del HC o directamente a partir del frasco de HC (**La Scola y Raoult, 2009**). También se usa para la identificación de factores de virulencia bacterianos (**Bernardo y cols, 2002**) y marcadores de resistencia antibiótica (**Edwards-Jones y cols, 2000**).

El tiempo total de realización de la técnica es de unos pocos minutos, por lo que es una herramienta muy útil para la identificación rápida de microorganismos a partir de HC positivos.

1.3.1.2. Métodos moleculares

El empleo de métodos moleculares, fundamentalmente los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es especialmente útil a partir del HC para identificar microorganismos y genes de resistencia que generan un gran impacto sanitario, como son *S. aureus* junto con la detección del gen *mecA* que determina resistencia a metilina (MRSA), *Enterococcus* junto con los genes *van* que confieren resistencia a glicopéptidos y enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas. Aunque determinados laboratorios clínicos especializados tienen sus propios protocolos de PCR caseras para realizar estas determinaciones, en la mayoría de los casos se utilizan sistemas fenotípicos y, en caso de usar sistemas moleculares, son preferibles los sistemas comerciales bien estandarizados. Ejemplos de estos sistemas comerciales usados tanto a partir del HC positivo como de muestra clínica directa son: GenoType MRSA Direct (Hain Lifescience), BDGeneOhm MRSA real-time PCR assay (BBL), Cepheid Xpert MRSA assay (Cepheid); Genotype BacIDent (Hain Lifescience), capaz de identificar 14 especies bacterianas de importancia clínica y los genes de resistencia *mecA*, *vanA* y *vanB*. Otros sistemas comerciales como Check-MDR CT-103 (Check-Point) detecta un gran número de marcadores de resistencia: carbapenemasas, BLEE y AmpC,

a partir de colonias aisladas en el cultivo; y otros como Verigene Gram-Positive Blood Culture (Nanosphere) y Verigene Gram-Negative Blood Culture (Nanosphere) identifica a partir de HC positivos. Los primeros identifica 12 microorganismos G+ de importancia clínica y 3 determinantes de resistencia (*mecA*, *vanA* y *vanB*) y los segundos proporciona identificación a nivel de género y a nivel de especie de bacterias G- de relevancia clínica, además de detectar marcadores de resistencia antibiótica incluyendo carbapenemasas (KPC, NDM, VIM, IMP), BLEE (CTX-M), y oxacilinasas.

1.4. Diagnóstico directo de microorganismos en sangre

Los resultados del HC pueden tardar de 6-48 h, además el HC puede dar resultados FN como consecuencia del tratamiento antimicrobiano previo a la toma que tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento microbiano. La introducción reciente de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR para la detección directa de microorganismos en sangre, ha demostrado una buena sensibilidad y especificidad, y ofrecen una mayor rapidez diagnóstica que el HC en muchos casos. **(Peters y cols, 2004; Andrade y cols, 2008)**. La PCR es la técnica más utilizada para la detección directa de microorganismos en sangre porque son las que ofrecen mayor sensibilidad y especificidad.

1.4.1. Fundamento de la PCR

La PCR es un método “in vitro” que permite la amplificación exponencial de secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) merced a la acción enzimática de la ADN polimerasa. Fue ideada en 1983, por Mullis **(Mullis y cols, 1986)** (premio Nobel de Química, 1993) y perfeccionada por **(Saiki y cols, 1988)**, gracias a la introducción de una ADN polimerasa termoestable (aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) y de los equipos termocicladores. Previa extracción de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, estos equipos realizan ciclos sucesivos de 3 pasos: desnaturalización del ADN, hibridación de cada una de las cadenas a cebadores, que son oligonucleótidos complementarios a un fragmento del ADN diana y elongación de la cadena mediante incorporación de desoxinucleóticos (dNTPs) presentes en el tubo de reacción desde el extremo 3' del cebador por medio de la ADN polimerasa. Teóricamente en cada ciclo de PCR se consigue duplicar el ADN diana **(Mullis y cols, 1986)**. Las nuevas cadenas de ADN producidas en cada ciclo sirven a su vez de molde en el ciclo siguiente. Dado que se incluyen dos cebadores, cada uno complementario a cada una de las cadenas de ADN, teóricamente en cada ciclo sucesivo de PCR se consigue una amplificación exponencial del material de partida igual a 2^n , siendo “n” el nº de ciclos realizados.

Aunque los métodos de PCR convencional, PCR simple, PCR anidada, etc., fueron los primeros introducidos en microbiología clínica, poseen una serie de inconvenientes, principalmente en lo que respecta a problema de contaminación y tiempo total requerido para completar el procedimiento que hoy día han sido solventados por la PCR-TR.

La PCR-TR permite la amplificación y detección (mediante lectura de fluorescencia) de forma simultánea. El procedimiento se realiza en un aparato que es termociclador (para llevar a cabo la amplificación) y fluorímetro (para la lectura de la fluorescencia emitida en cada ciclo de PCR). Esta fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN sintetizado durante la amplificación. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. No requiere de un proceso posterior de lectura lo cual acorta el procesamiento y reduce el riesgo de contaminación. La detección se basa en la lectura de la fluorescencia emitida por determinadas moléculas con diversos mecanismos de emisión de fluorescencia. En función de éstos, se han descrito diferentes tecnologías para detectar el amplificado en una PCR-TR: detección mediante colorantes fluorescentes como SYBR green I, que se une específicamente al ADN de doble cadena, o mediante sondas marcadas con varios fluoróforos que actúan como donadores o aceptores de energía de resonancia fluorescente cuando son excitados y son capaces de emitir fluorescencia, a una determinada longitud de onda, la cual recoge el aparato (**Mackay y cols, 2002**).

1.4.2. Estrategias de PCR para detección de múltiples patógenos

Las tres estrategias de PCR más usadas han sido la PCR simple y múltiple patógeno-específica y PCR universal y posterior secuenciación de los productos de PCR.

1.4.2.1. PCR patógeno específica

Va dirigida a genes específicos de género o de especie. Los formatos de PCR **específica frente a un sólo microorganismo** (género o especie) tiene una utilidad limitada como técnica de detección directa de la sangre dado que los patógenos implicados en sepsis son muchos (**Mancini y cols, 2010**). Es más utilizada como método de identificación y detección de genes de resistencia a partir de HC en función de la identificación presuntiva mediante tinción de Gram y/o aislamiento en placa (**Eigner y cols, 2005**).

Los ensayos de **PCR múltiple** específica para varios patógenos ofrecen mayor utilidad en estos casos, ya que permiten la detección en paralelo de dianas específicas de especie o de género de los patógenos potencialmente implicados. Las moléculas dianas más usadas son secuencias de

ADN ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacer*). Las regiones ITS son secuencias no codificantes que se encuentran entre genes altamente conservados para los ARN ribosomiales (ARNr) bacterianos y ARNr fúngicos, mostrando un alto nivel de heterogeneidad entre diferentes especies y géneros (**Murray y cols, 2003**). Estas características hacen que con una variedad limitada de cebadores para la amplificación y el empleo de sondas dirigidas a estas regiones ITS, se consiga la identificación específica de especie (**Lehmann y cols, 2008**). Varias son las técnicas descritas que incluyen PCR múltiple seguida de lectura de amplicones mediante enzimoimmunoanálisis o hibridación (**Wellinghausen y cols, 2004a**) y ensayos de PCR-TR (**Wellinghausen y cols, 2004b**).

1.4.2.2. PCR universal

La utilidad clínica de la PCR universal aplicada a la identificación de patógenos a partir de HC positivos es limitada. La principal desventaja es que después de la amplificación de la diana, son necesarios procesos de identificación, como son la secuenciación o hibridación de los amplicones. Schabereiter-Gurtner y cols, postulan que esta estrategia de PCR podría ser útil ante una situación de HC negativos de forma persistente y una alta sospecha clínica de bacteriemia o fungemia, como es el caso de endocarditis infecciosa (**Schabereiter-Gurtner y cols, 2008**).

En la PCR **universal** la diana de amplificación son secuencias altamente conservadas en el genoma fúngico o bacteriano, como son los genes ARNr 16S, 5S y 23S presentes en todas las bacterias, y los genes panfúngicos ARNr 18S, 5,8S y 28S. Para identificación bacteriana, la región ADNr 16S se ha mostrado especialmente útil ya que poseen secuencias altamente conservadas en todas las bacterias y además tienen una serie de regiones hipervariables, que la hacen única de cada especie (**Millar y cols, 2002**). Se encuentran presentes en múltiples copias en el genoma bacteriano (**Wilson y cols, 1990**).

El primer estudio que aplicó estas técnicas de PCR universal ADNr 16S a la detección de sepsis en neonatos fue llevada a cabo en el **2000** por **Jordan y Durso**. Compararon los resultados del HC con los obtenidos mediante PCR. Previamente a la amplificación realizaron enriquecimiento en caldo de tripton y soja (TSB) durante 5-10 horas. Cada amplicón se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, y los positivos obtenidos se sometieron a hibridación dot blot para determinar el género/especie bacteriana. El tiempo requerido del HC hasta obtener un resultado final puede ser de 1-2 días, siendo de hasta 5 días para un resultado negativo. Con la metodología de Jordan y Durso, este tiempo se redujo a 1 día. Posteriormente, realizaron el mismo estudio comparativo con la salvedad de no realizar el enriquecimiento previo con TSB y elegir la secuenciación como método de detección. De esta manera el tiempo se redujo a 8 horas, pero conlleva el inconveniente de que la

mayoría de laboratorios clínicos no disponen de la tecnología necesaria para llevar a cabo la secuenciación. Gracias a la incubación previa a la PCR, los valores de sensibilidad, especificidad y VPN obtenidos superan el 95%, mientras que el VPP es 88,9% (**Jordan y Durso, 2000**). La sensibilidad disminuye hasta el 66,7% cuando no se realiza el enriquecimiento previo en TSB (**Reier-Nilsen y cols, 2009**).

1.4.3. Principales sistemas moleculares comerciales disponibles para el diagnóstico de sepsis a partir de muestra

Actualmente existen kits comerciales validados para su uso en el diagnóstico de sepsis directamente de muestra de sangre. Los más comunes son los formatos de PCR-TR y PCR seguida de secuenciación (**Peters y cols, 2004; Andrade y cols, 2008**), entre los que destacan:

- **SepsiTest[®] Blood test** (Molzylm, Bremen, Alemania) es un sistema que combina la amplificación de genes ARNr 16S de bacterias y ADNr 18S de hongos, con la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos (**Lehmann y cols, 2008; Wellinghausen y cols, 2009**). Este sistema permite la identificación de más de 300 patógenos diferentes, pero con el inconveniente del alto riesgo de contaminaciones de ADN, debido a los procesos de postamplificación de los amplicones. El tiempo de realización de todo el proceso es superior a 8-12 horas, por lo que se cuestiona su utilidad como test de diagnóstico rápido (**Muhl y cols, 2010**)
- **Vyoo[®]** (SIRS-Lab, Jena, Alemania) es un ensayo de PCR múltiple que detecta patógenos en sangre, usando como método de detección electroforesis en gel (**Horz y cols, 2008**)
- **LightCycler[®] SeptiFast Test M^{grade}** (LC-SF) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) fue el primer ensayo comercial de PCR múltiple a tiempo real disponible para el diagnóstico de sepsis (**Lehmann y cols, 2008**).

1.5. Sistema LightCycler[®] SeptiFast Test M^{grade} (LC-SF)

El LC-SF es una prueba de amplificación de ácido nucleico *in vitro* para la detección e identificación de ADN bacteriano y fúngico de 25 microorganismos en sangre humana recogida en tubo con anticoagulante (etilendiaminotetracético, EDTA) mediante el equipo LightCycler[®] 2.0. Es capaz de detectar patógenos bacterianos y fúngicos que representan aproximadamente el 90% de las bacteriemias/fungemias en población adulta (**Lehmann y cols, 2008**) (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Relación de microorganismos detectados por LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}

Gram negativos	Gram positivos	Hongos
<i>Eschechia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella(pneumoniae/oxytoca)</i>	SCN	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

SCN, *Staphylococcus coagulasa-negativa* ; *Streptococcus spp.*, especies de *Streptococcus* (incluyendo por ej. *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*)

1.5.1. Fundamento del ensayo LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}

El método de **extracción de ácido nucleico** recomendado por el fabricante es la extracción manual, mediante lisis mecánica y posterior purificación. Este purificado es procesado en tres PCR-TR múltiples paralelas (bacterias G-, bacterias G+ y hongos).

La **amplificación** mediante PCR-TR se realiza gracias a la acción de la **polimerasa FastStart Taq** (Taq polimerasa) y de **cebadores genéricos o específicos**. Se obtienen tres mezclas de reacción para la amplificación de G-, G+ y hongos, constituidas por los cebadores/sondas de las respectivas PCRs, la Taq polimerasa, dNTPs y Mg²⁺. Además se incluye la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa), que reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina (presente en los amplicones), pero no del ADN que contiene desoxitimidina (ADN diana). Al someter la mezcla (reactivos y ADN extraídos de la muestra) a la acción de la AmpErase (antes de la PCR), se destruyen los amplicones que pudieran haber contaminado el tubo de reacción durante el proceso de preparación de la mezcla.

Los productos de amplificación obtenidos en cada ciclo se detectan mediante **sondas FRET**, contituidas por dos sondas que se unen a secuencias adyacentes (separadas entre sí 2-10 nucleótidos) del ADN diana. Estas sondas están marcadas por dos tipos de fluoróforos, un donador (en el extremo 3' de la sonda a la izquierda o hacia el extremo 5' de la secuencia de ADN diana complementaria) y un aceptor (en el extremo 5' de la sonda a la derecha). La fase en la cual estas sondas realizan la detección del producto amplificado es durante la hibridación. El proceso se basa en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre el fluoróforo donador en el extremo 3' de una de las sondas, y el fluoróforo aceptor en el extremo 5' de la otra, cuando la muestra es excitada con luz y están hibridadas con el ADN diana. En este momento, los dos fluoróforos están próximos entre sí y es posible la transferencia de energía a la sonda aceptora, la cual emite la fluorescencia a una longitud de onda diferente, que es detectada por el lector del

equipo. Al producirse la elongación del ADN diana, por la acción de la ADN polimerasa (a 72°C), se produce la disociación de las sondas FRET, cesando así la señal fluorescente y liberándose las sondas para hibridar con nuevos amplicones en los sucesivos ciclos de la PCR (figura 1.2).

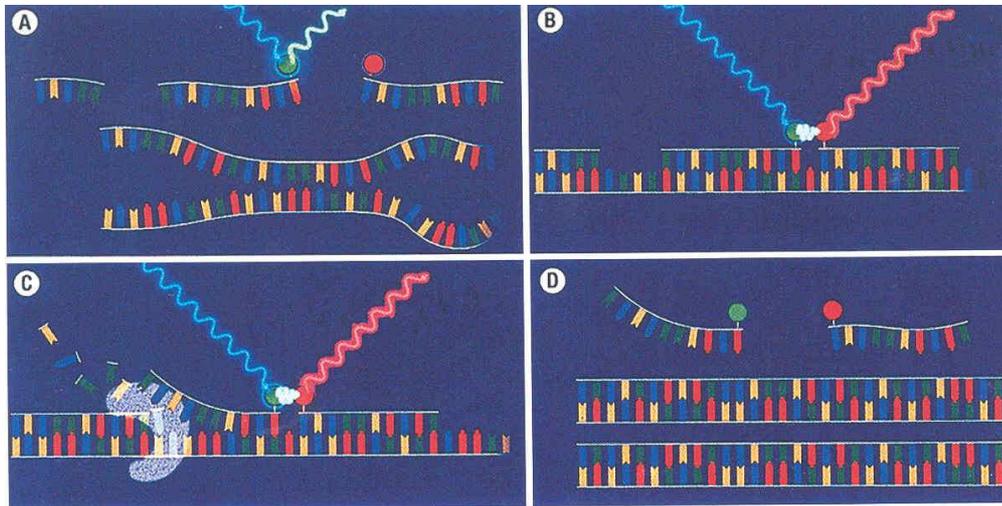


Figura 1.2. PCR en tiempo real con sondas FRET de detección. **A.** Las sondas y el ADN diana están disociados, por lo que la sonda donadora no puede transferir la energía de resonancia fluorescente a la aceptora. **B. Fase de hibridación** de las sondas al ADN, en la que se produce la transferencia de energía por proximidad de las sondas. **C. Fase de elongación**, la ADN polimerasa realiza su función 5'-3' exonucleasa y separa las sondas a medida que incorpora nucleótidos a la nueva cadena de ADN. **D. Final de la elongación**, en la que dos nuevas moléculas de ADN se han sintetizado y las sondas están disponibles para hibridar en un nuevo ciclo de PCR.

A medida que se van produciendo más amplicones durante la PCR, la fluorescencia va aumentando. El equipo permite visualizar en cada momento el aumento de fluorescencia indicativo del crecimiento exponencial de los productos de PCR. El ciclo a partir del cual se produce un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, se denomina Cp ("crossing point") (figura 1.3).

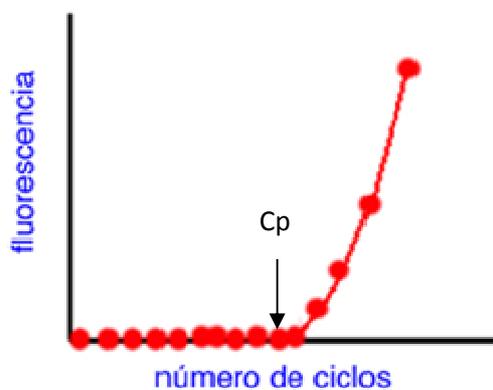


Figura 1.3. Curva de fluorescencia de PCR-TR. La flecha indica el Cp, ciclo umbral a partir del cual la PCR pasa a fase exponencial y comienza a aumentar de forma significativa la fluorescencia.

Al final del proceso de la PCR, la muestra se somete a desnaturalización (95°C) y posterior renaturalización a 40°C. En este momento, la fluorescencia emitida es máxima ya que las sondas se han unido a todos los amplicones generados en la PCR. Posteriormente, se va aumentando lentamente la temperatura, de forma que las sondas se van separando poco a poco de los amplicones. La lectura de fluorescencia durante este proceso de aumento lento de temperatura se realiza de forma continua. Si se representa en una gráfica la derivada negativa de la fluorescencia en función de la temperatura frente a ésta, se obtiene una curva con un pico máximo que representa la temperatura de disociación o T_m , a la cual el 50% de la sonda se ha disociado de su ADN complementario. La T_m determina la especificidad de la PCR, ya que depende de la longitud del fragmento y composición de la secuencia, y del grado de homología entre la sonda de hibridación y la diana de ADN. (figura 1.4).

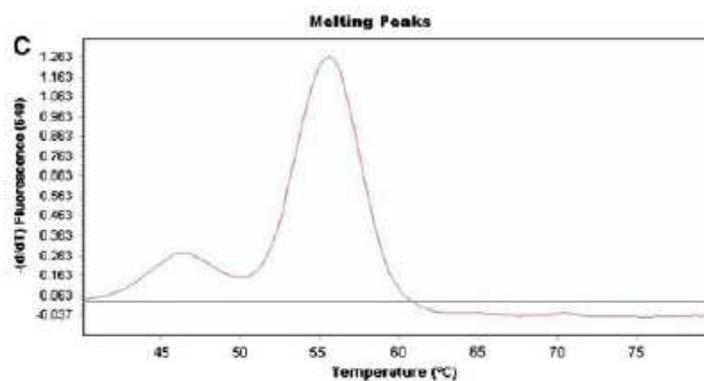


Figura 1.4. Curva de disociación de las sondas FRET tras el proceso de PCR-TR. El pico equivale a la T_m específica de cada diana y sus correspondientes sondas FRET

En el ensayo LC-SF la diana la constituyen las **regiones ITS**. Esta zona ofrece una mayor sensibilidad analítica que otros genes porque existen varios operones en los genomas de bacterias y hongos. Además, con la región ITS se pueden diferenciar más microorganismos que con el ADNr. Se halla situada entre las secuencias de ADNr 16S y 23S de todas las bacterias G+ y G- y entre las secuencias de ADNr 18S y 5,8S de todos los hongos (figura 1.5) (Lehmann y cols, 2008).

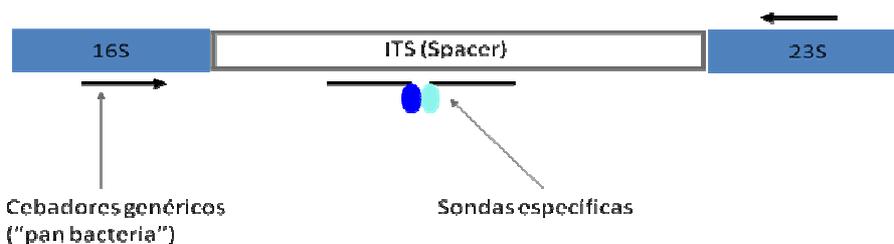


Figura 1.5. Esquema de un fragmento de genoma bacteriano conteniendo la región ITS

Además se incluye un control interno, que consiste en moléculas de ADN de doble cadena con sitios de unión de cebadores idénticos a los de las secuencias diana, pero que se diferencian en que presentan regiones de unión de sondas diferentes de la diana específica, lo que permite diferenciar la amplificación del control interno de la del ADN diana por el cálculo de la T_m . La amplificación del control interno en muestras con resultado negativo permite descartar inhibición de la PCR.

Tras el cálculo manual de las T_m para cada mezcla de reacción y canal de lectura de fluorescencia, los resultados son interpretados en el ensayo LC-SF mediante un programa de identificación especial denominado “SeptiFast Identification Software”, SIS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), específicamente diseñado para la interpretación de la T_m de los productos amplificados.

El SIS permite además discriminar entre contaminaciones (baja carga bacteriana), cuando el resultado es positivo con un $C_p > 20$, y resultados verdaderos positivos, cuando el C_p es ≤ 20 (Lehmann y cols, 2008).

1.5.2. Sensibilidad analítica

El límite de detección del LC-SF se sitúa en 30 UFC/ml para los 25 patógenos incluidos en la lista maestra, excepto para SCN, *Streptococcus* spp. y *C. glabrata* cuyo límite de sensibilidad es de 100 UFC/ml (Lehmann y cols, 2008).

1.5.3. Aplicaciones de LightCycler® SeptiFast Test Mgrade

1.5.3.1. Diagnóstico de sepsis

LC-SF está diseñado principalmente para diagnóstico de sepsis, mediante detección de los patógenos en muestra de sangre. La mayoría de los estudios están dirigidos a pacientes adultos ingresados en UCI. Sólo algunos estudios se centran en el diagnóstico de sepsis en recién nacidos y lactantes (RNyL) (Paolucci y cols, 2009; Vroni y cols, 2012). La mayoría de ellos, calculan los parámetros de sensibilidad y especificidad con respecto al HC, aunque algunos usan como estándar de referencia la combinación de datos clínicos y de laboratorio. Los valores de especificidad se mantienen prácticamente estables en valores altos, pero los de sensibilidad son bastante heterogéneos (tabla 1.4). De esta manera unos autores encuentran valores de sensibilidad tan bajos como un 26% hasta valores de 97%, cuando son calculados teniendo como referencia el HC, y un

mínimo de 51% cuando se tiene en cuenta el global de datos clínicos y de laboratorio. **Casalta y cols, 2009**, centran su estudio en pacientes con endocarditis y atribuye la baja sensibilidad del LC-SF a que éste no detecta los microorganismos del grupo HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*), las bacteriemias de baja carga bacteriana y algunos SCN y *Streptococcus* spp por el valor umbral de Cp. Las diferencias en las características y condiciones clínicas de los pacientes en estudio, el espectro de microorganismos detectado, el número de tomas de HC, el volumen de sangre extraído, y la presencia o ausencia de terapia antibiótica en el momento de la toma de muestra pueden influir en esta variabilidad. Una de las conclusiones de estos estudios es que la información aportada por el ensayo LC-SF, ayudaría a tomar la decisión del cese o cambio del tratamiento antibiótico, disminuyendo así el número de pacientes con antibioterapia inadecuada.

Tabla 1.4. Estudios que reflejan la sensibilidad y especificidad del ensayo LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} usando como estándar de referencia el hemocultivo o el global de datos clínicos y de laboratorio

Autor, año	Paciente (n)	Servicio	%S ^a	%E ^b	Estándar de referencia	Comentario
Avolio, 2010	adultos (144)	Urgencias	91	90	HC ^c	
Bravo, 2011	adultos (53)	UCI ^d	55	91	HC	Disminuye ATB ^e inadecuado
Bravo, 2011	adultos (33)	Hematología	60	95	HC	
Casalta, 2009	adultos (63)	ND ^f	86,7	86,9	HC	Disminuye ATB inadecuado
Grif, 2012	adultos (61)	UCI y otros	63	81	HC	Disminuye ATB inadecuado
Guido, 2012	adultos (166)	Hematología	91,3	88,1	HC	Disminuye ATB inadecuado
Herne, 2013	adultos (144)	UCI y otros	88,3	99	DCyL ^g	
Kasper, 2013	RNMBP (46)	UCIN ^h	91	80	DCyL	
Lamoth, 2010	adultos, niños	Hematología	26	75	HC	Disminuye ATB inadecuado; Útil LC-SF ⁱ en detección temprana de infecciones fúngicas
Lucignano, 2011	niños 0-18 años (811)	UCI y otros	85	93,5	HC	Disminuye ATB inadecuado
Mancini, 2008	adultos (34)	Hematología	97	99	HC	
Maubon, 2010	adultos (110)	Hematología	51	83	DCyL	Disminuye ATB inadecuado
Mauro, 2012	adultos (79)	Hematología y otros	87	95	DCyL	
Paolucci, 2013	adultos, niños (201)	Hematología	52	88	HC	Limitaciones: muchos FN ^j en LC-SF
Pasqualini, 2012	adultos (391)	Medicina Interna	71	100	DCyL	Disminuye ATB inadecuado
Rath, 2012	adultos (170)	Trasplante	71	76	HC	
Varani, 2009	adultos, niños (100)	Hematología	76	83	DCyL	Disminuye ATB inadecuado
Vince, 2008	adultos (36)	UCI, Hematología	43	71	HC	Disminuye ATB inadecuado
von Lilienfeld-Toal, 2009	adultos (70)	Hematología	38	86	HC	Disminuye ATB inadecuado; Útil LC-SF en detección temprana de infecciones fúngicas
Wallet, 2010	adultos (72)	UCI	40 78	88 99	HC DCyL	Disminuye ATB inadecuado

a: S, sensibilidad; b: E, especificidad; c: HC, hemocultivo; d: UCI, unidad de cuidados intensivos; e: ATB, antibioterapia; f: ND, no disponible; g: DCyL, datos clínicos y de laboratorio; h: UCIN, unidad de cuidados intensivos neonatal; i: LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}; j: FN, falsos negativos.

1.5.3.2. Otros contextos clínicos

A pesar de que LC-SF se recomienda para detección de microorganismos en sangre anticoagulada, el enorme potencial de esta técnica ha hecho que diversos autores la hayan optimizado para su uso en otros contextos y/o muestras clínicas.

1.5.3.2.1. Endocarditis infecciosa

Se ha recomendado el uso de LC-SF junto con el HC en pacientes con endocarditis en tratamiento con antibióticos, ya que en estos casos el HC da lugar frecuentemente a FN (**Casalta y cols, 2009**). La sensibilidad del LC-SF obtenida fue superior al HC, siendo de 86,7% y una especificidad de 86,9%.

Posteriormente, en **2010, Fernández y cols.** demostraron una sensibilidad del ensayo LC-SF realizado sobre tejido valvular cardíaco del 100%, mientras que la del cultivo de vegetaciones fue de 30,7%. La sensibilidad del LC-SF de sangre y del HC fue similar. Ambos estudios resaltan la utilidad del ensayo LC-SF en el diagnóstico de endocarditis infecciosa junto con el cultivo y el HC. Por otro lado, señalan que LC-SF realizado a partir de muestras de sangre no detecta como patógeno a SCN y *Streptococcus spp.*, debido al punto de corte relativamente alto del LC-SF. Dicho punto de corte no afecta al LC-SF realizado a partir de tejido valvular cardíaco (**Fernández y cols, 2010**). Además, LC-SF no detecta otros posibles patógenos implicados en la endocarditis infecciosa, como son los microorganismos del grupo HACEK, *Gemella*, *Coxiella* y *Bartonella*, con lo que un resultado negativo del LC-SF no descarta endocarditis infecciosa.

1.5.3.2.2. Infección urinaria

En el trabajo realizado por **Lehmann y cols, en 2011** recomendaron la utilización del LC-SF junto con el urocultivo en pacientes bajo tratamiento antimicrobiano a causa de infecciones urinarias recurrentes o pacientes sometidos a nefrostomía, debido a la negatividad del urocultivo a consecuencia de la antibioterapia.

1.5.3.2.3. Aspergilosis invasiva

El diagnóstico de Aspergilosis invasiva (AI) por síntomas clínicos y hallazgos radiográficos son a menudo inespecíficos. La detección de antígeno de galactomanano, un componente de la pared celular de especies de *Aspergillus*, en suero o en lavado broncoalveolar se utiliza para el diagnóstico precoz de AI. El elevado porcentaje de FP de galactomanano junto con que en la mayoría de los casos el HC es negativo a *Aspergillus*, hacen que el diagnóstico de AI sea complejo. Por ello, diversos trabajos recomiendan el empleo adicional de LC-SF en la detección de *A. fumigatus* a partir de muestras de sangre (Steinmann y cols 2009; Palomares y cols, 2011; Rath y cols, 2012) y del lavado broncoalveolar (Steinmann y cols 2009). Sin embargo, el ensayo LC-SF presenta algunas limitaciones, ya que no es posible la detección de especies de *Aspergillus* distintas a *A. fumigatus*, así como de otros hongos.

1.5.3.2.4. Infección periprotésica

Los dispositivos y prótesis ortopédicas se utilizan para el tratamiento de la enfermedad degenerativa de las articulaciones y de fracturas óseas. La infección de estas prótesis es una de las complicaciones más temidas. Actualmente, el cultivo de líquido sinovial y tejido periprotésico representan el método estándar para el diagnóstico de infección periprotésica (IP). Otras técnicas han sido recientemente implantadas como la sonicación del implante extraído para incrementar la sensibilidad. Sin embargo, persiste una proporción de pacientes con IP, en los que el agente etiológico no es identificado. Esto es frecuente en aquellos con tratamiento antimicrobiano previo. Un estudio realizado por Achermann y cols, en 2010 ponen de manifiesto que el ensayo LC-SF del material sometido a ultrasonido mejora el diagnóstico de IP, detectando el 78% de los casos frente al 62% y 65% identificado por cultivo del líquido de sonicación y del tejido periprotésico, respectivamente. Además, de los pacientes que habían recibido tratamiento antibiótico previo, los cultivos fueron positivos en un 42%, mientras que LC-SF mostró resultados positivos en el 100% de los casos.

2 *Objetivos*

2. OBJETIVOS

La identificación rápida de los patógenos causantes de sepsis es crucial para la instauración del tratamiento antimicrobiano específico. El hemocultivo tiene una rentabilidad variable, ya que aparecen con frecuencia resultados falsos positivos debidos a contaminación en el momento de la toma de la muestra y falsos negativos especialmente en pacientes con antibioterapia previa a la toma. En recién nacidos y lactantes, a los inconvenientes anteriores que limitan el valor del hemocultivo, hay que añadir la dificultad para obtener volúmenes y/o nº de tomas adecuados para una interpretación de resultados fiable en muchos casos.

Las técnicas de PCR para detección de ADN microbiano en sangre de pacientes con sospecha de sepsis pueden ser una herramienta útil para el diagnóstico etiológico de la misma. Además, ofrecen la ventaja potencial de disminuir el tiempo de obtención de resultados considerablemente con respecto al requerido por el hemocultivo. Una de las primeras técnicas de PCR que se comercializaron, LC-SF, permite detectar los 25 patógenos más frecuentemente asociados a sepsis en población adulta. Está por determinar su utilidad real en población pediátrica, ya que en este grupo de población, especialmente en recién nacidos y lactantes, los patógenos más frecuentes pueden ser diferentes a los asociados a sepsis en adultos.

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar la utilidad de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} en recién nacidos y lactantes con sospecha de sepsis.

Los **objetivos concretos** de este trabajo son:

1. Investigar por PCR la presencia de ADN bacteriano y fúngico mediante la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} en muestras de sangre de recién nacidos y lactantes, ingresados con sospecha de sepsis en la unidad de cuidados intensivos neonatal del Hospital Virgen de las Nieves.
2. Comparar los resultados obtenidos mediante LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} con los del hemocultivo paralelo.
3. Analizar los factores clínicos influyentes en el rendimiento diagnóstico de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} en comparación con el hemocultivo, así como la concordancia de cada técnica con el diagnóstico clínico final.
4. Evaluar la utilidad de un sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos para la investigación de patógenos en sangre mediante LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}.

3 Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes y ámbito del estudio

Los sujetos incluidos en el estudio fueron RNyL (edad postgestacional < 44 semanas) ingresados por sospecha de sepsis en la UCIN del HUVN, durante el periodo comprendido entre abril de 2007 y abril de 2009.

3.2. Muestras

3.2.1. Sangre

Se recogieron muestras de sangre para estudio microbiológico de los episodios febriles de los pacientes. Se procesaron simultáneamente dos muestras de sangre, una para HC y la otra para el ensayo LC-SF de cada episodio, con un volumen recomendado de 1 mL para cada técnica, y un volumen final que osciló entre 350 y 1.000 µL según las posibilidades de extracción dadas las características de estos pacientes.

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción, previa desinfección de la piel con alcohol de 70°. La primera muestra se inoculó en frasco pediátrico para HC BACTEC Peds Plus™/F mediante el sistema automático BACTEC-9240® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A continuación, una segunda muestra (con igual volumen que la tomada para HC) se inoculó en tubos con K-EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para el ensayo LC-SF.

3.2.2. Otras muestras

Paralelamente a la recogida de sangre, en algunos pacientes y/o episodios se tomaron otras muestras (exudados periféricos de mucosa y piel, líquidos orgánicos, etc), en función de la sospecha clínica y/o foco de infección.

3.3. Diagnóstico microbiológico

3.3.1. Transporte, procesamiento y conservación de las muestras

Las muestras de sangre en frascos de HC y tubos de K-EDTA, se transportaron inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente. Tras su recepción, se registraron las muestras y los frascos de HC se introdujeron en el sistema automatizado para su incubación en condiciones aerobias. LC-SF se llevó a cabo en las 24 h siguientes a la recepción de la muestra.

La sangre para LC-SF se conservó a 4°C hasta la realización del ensayo. El resto de muestras de cada paciente se enviaron y procesaron inmediatamente tras su recepción.

Cuando el envío y/o procesamiento inmediatos no fueron posibles, las muestras se conservaron refrigeradas o a temperatura ambiente según las instrucciones recomendadas en la Guía del Servicio de Microbiología del HUVN (http://www.hvn.es/invest_calid_docencia/bibliotecas/publicaciones/archivos/doc_72.pdf).

3.3.2. Hemocultivo

3.3.2.1. Sistema BACTEC PEDS Plus™/F-BACTEC-9240®

Los frascos BACTEC PEDS Plus™/F (figura 3.1.A) están indicados para la recuperación de microorganismos aerobios (bacterias y levaduras) de pacientes pediátricos, en los que la muestra de sangre generalmente contiene un volumen inferior a 3 mL. La composición del medio se recoge en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición de los frascos BACTEC Peds Plus™/F para hemocultivo automatizado mediante el sistema BACTEC-9240®

Ingredientes	Cantidad
Agua	40 mL
Caldo de extracto de soja-caseína	2,75% w/v
Extracto de levadura	0,25% w/v
Extracto de tejido animal	0,1% w/v
Piruvato sódico	0,1% w/v
Dextrosa	0,06% w/v
Sacarosa	0,08% w/v
Hemina	0,0005% w/v
Menadiona	0,00005% w/v
Polianetol sulfonato sódico (SPS)	0,02% w/v
Piridoxal HCl (vitamina B ₆)	0,001% w/v
Resina de adsorción no iónica	10% w/v
Resina de intercambio catiónico	0,6% w/v
CO ₂ y O ₂	
Sensor de fluorescencia	

Tomado de <http://www.bd.com/ds/productCenter/442194.asp>

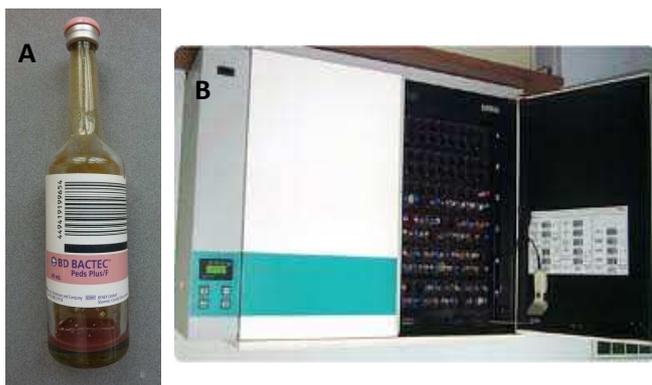


Figura 3.1. A. Frasco BACTEC PEDS Plus™/F. B. Sistema Bactec-9240® para incubación y monitorización automática continua de hemocultivos

Los frascos de HC fueron procesados en el sistema Bactec-9240® (figura 3.1.B, Becton Dickinson). Es un sistema totalmente automático, de agitación y monitorización continua. Se compone de un incubador, un detector y un ordenador. El CO₂ producido por el metabolismo bacteriano reacciona

con un material fluorescente situado en el fondo del frasco del HC, lo que modula la cantidad de luz que es absorbida por un sensor. Los fotosensores miden el nivel de fluorescencia, que se corresponde con la cantidad de CO₂ producida por el microorganismo. Esta medida es interpretada por el sistema de acuerdo con unos parámetros programados. Este sistema realiza una lectura de todos los frascos cada 10 minutos y mediante un sistema luminoso de alarma indica los frascos positivos detectados en cada lectura.

En los casos en los que no se detectaba crecimiento microbiano, se emitía un resultado preliminar negativo a las 48 h de incubación, y el resultado definitivo a los 5 días.

3.3.2.2. Procesamiento e identificación de microorganismos en frascos positivos

Cuando el sistema Bactec-9240® detectaba un frasco positivo, se extraía el frasco del instrumento para identificación microbiana. Para ello, se inocularon unas 3-5 gotas de la muestra en tubos conteniendo 0,5 mL de caldo de cerebro-corazón (BHI), mediante extracción de la misma con el sistema aguja BD BBL Venting Unit (Becton Dickinson), previa desinfección de la boca del frasco con alcohol de 70°. Este subcultivo en caldo BHI se usaba más tarde para realizar el procesamiento específico para la identificación definitiva.

3.3.2.2.1. Identificación presuntiva

Se depositaba una gota del frasco de HC en portaobjetos para tinción de Gram, y otras dos gotas cada una de ellas en placa de agar sangre de caballo y agar chocolate (Becton Dickinson), incubándose a 35°C - 37°C en atmósfera aerobia con 5% de CO₂ durante 18-48 horas.

Según el resultado obtenido en la **tinción de Gram**, se procedía, desde el subcultivo en caldo BHI, de la siguiente forma:

- Observación de cocos G+ en racimo: se realizaba siembra en una estría con escobillón estéril en placa conteniendo ADN, para detección de estafilococos patógenos primarios (DNAsa positiva), y con otro escobillón se realizaba una siembra por toda una placa de Mueller-Hinton (siembra en tapiz o en césped) sobre la que se ponía un disco de cefoxitina de 30 µg para determinar la sensibilidad a meticilina según normas del CLSI (**Wayne, 2008**). A las 18 horas de incubación, se obtenía una identificación presuntiva en base a la morfología de la colonia en agar sangre y agar chocolate, y resultados de la prueba de la DNAsa (**Jeffries y cols, 1957**) en combinación con sensibilidad a meticilina en función del tamaño de halo de inhibición del disco de cefoxitina siguiendo los criterios recogidos en el documento M100-S18 del CLSI (**Wayne, 2008**).
- Observación de cocos G+ en cadena: se realizaba un cribado en agar sangre incubada en aerobiosis con 5% de CO₂, para identificación presuntiva y sensibilidad a antibióticos, con discos de: bacitracina, optoquina, vancomicina, ampicilina, penicilina G, oxacilina, cefotaxima. Además, se inoculaba un escobillón impregnado del HC en caldo BHI en medio Granada semisólido en tubo para detección de *S. agalactiae*.
- Observación de bacilos G-: subcultivo también en agar McConkey y agar cromogénico MPO® (Biomedics, Tres Cantos, Madrid) (**Palacios y cols, 2002**) e inoculación en picadura y en superficie en medio de Kligler.
- Observación de otras morfologías (bacilos G+, levaduras, hifas, etc): subcultivo en agar sangre y agar chocolate, acompañados de otros medios selectivos y/o diferenciales en función del resultado de la tinción de Gram (agar cromogénico para levaduras, agar Saboureaud, agar McConkey, agar cromogénico MPO, etc).

La identificación presuntiva se realizó en base a procedimientos de rutina y protocolos descritos en el *Clinical Microbiology Handbook* (**Isenberg, 2004**).

3.3.2.2.2. Identificación definitiva

Para la identificación definitiva y/o antibiograma se utilizaron uno o varios (en función del microorganismo y/o capacidad del sistema de identificación) de los siguientes procedimientos y sistemas:

- Sistema semiautomatizado Wider (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid), para identificación y antibiograma (microdilución en caldo).
- Galería multitest API® (bioMérieux).
- Antifungigrama mediante el sistema Sensititre YeastOne Panel (Trek Diagnostic Systems, Inc., Westlake, OH).
- Antibiograma disco-placa según documento M100-S10 del CLSI (**Wayne, 2000**).
- Pruebas rutinarias bioquímicas y enzimáticas comerciales o caseras, en función de la disponibilidad en el laboratorio y/o microorganismo a identificar (**Isenberg, 2004**).

3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa: LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}

El sistema LC-SF consta de los siguientes equipos y reactivos para realizar los diferentes pasos del procedimiento:

- SeptiFast Lys Kit M^{GRADE} y equipo MagNA Lyser: lisis mecánica de las muestras
- SeptiFast Prep Kit M^{GRADE}: extracción de ácidos nucleicos
- LightCycler® SeptiFast Kit M^{GRADE}: amplificación y detección mediante PCR en tiempo real
- SeptiFast Identification Software: identificación automática de cepas y controles

3.3.3.1. Normas generales

Para realizar el ensayo LC-SF, durante todo el ensayo se estableció un flujo de trabajo unidireccional para evitar FP por contaminación con ADN. Se establecieron 2 áreas de trabajo: área 1, para preparación de reactivos y tubos con mezcla de reacción, y área 2, en cabina de bioseguridad tipo II (CBS II), para preparación de muestras para extracción de ácidos nucleicos y dispensación del ADN extraído en tubos con mezclas de reacción (previamente preparados en área 1). Se usaron guantes, batas, pipetas y material fungible específico para cada área. Se usó doble guante durante todo el proceso para evitar cualquier exposición de la piel al material y reactivos usados para el proceso. Se usó material de calidad M^{GRADE} (agua, puntas de pipetas, tubos de reacción), libres de contaminación de ADN.

Las muestras fueron manipuladas en condiciones de bioseguridad siguiendo las normas establecidas en el Procedimiento General de Normas de Seguridad, Control de Vertidos y

Accidentes, elaborado por el propio Laboratorio del Servicio de Microbiología del HUVN, 2005 (http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/microbiologia-servicio/ficheros/pend_pgbioseguridad_02.pdf).

3.3.3.2. Procedimiento

El ensayo LC-SF consta de los siguientes pasos:

1. Lisis mecánica de la sangre
2. Extracción manual de ácidos nucleicos
3. Amplificación de ADN bacteriano o fúngico mediante PCR-TR múltiple
4. Análisis de resultados y cálculo de las temperaturas de disociación
5. Exportación de resultados al SIS para identificación automática de microorganismos

3.3.3.2.1. Lisis mecánica

La sangre se dispuso en un tubo del kit SeptiFast Lys M^{GRADE}, que contiene bolas cerámicas. La lisis mecánica se realizó en el equipo MagNA Lyser[®] durante 70 segundos a 7000 rpm (figura 3.2).

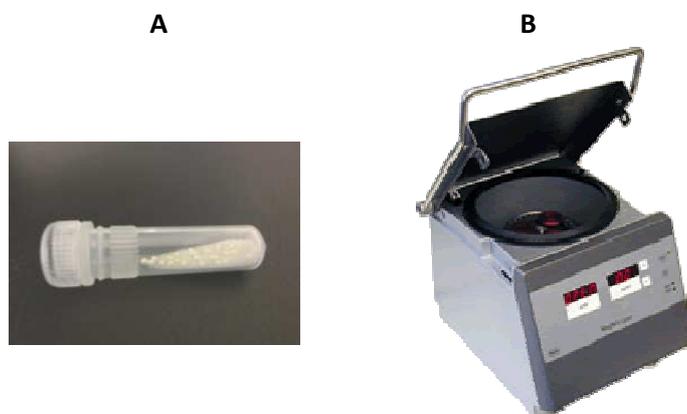


Figura 3.2. A. Vial con bolas cerámicas. B. Equipo MagNA Lyser[®]

En el ensayo se incluyó además otro tubo con un **control negativo** (35% polietilenglicol 10000, tampón Tris-HCl) que fue sometido a los mismos procedimientos que las muestras.

3.3.3.2.2. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo de forma manual mediante el kit SeptiFast Prep Kit M^{GRADE} y siguiendo las instrucciones del fabricante, en CSB II área 2.

A las muestras lisadas, se les añadieron 150 μ L de solución de proteinasa K, 3 mL de tampón de lisis caotrópico (50% tiocianato de guanidina, 20% Triton X-100) y 10 μ L del control interno, suministrados con el kit, y se incubaron a 56°C durante 15 minutos con agitación suave.

Tras la incubación, a cada muestra o control se añadió 1 mL de tampón de unión (50% tiocianato de guanidina, 20% TritonX-100, tampón Tris-HCl) y toda la mezcla de cada determinación fue transferida a una columna de centrifugación con un filtro de fibra de vidrio. El ADN genómico humano y el ADN objetivo, tanto bacteriano como fúngico, se une a la superficie de la fibra de vidrio. Aquellas sustancias no unidas, tales como sales, proteínas y otros fragmentos celulares, fueron eliminadas mediante lavados en dos fases: un primer lavado con tampón Tris-HCl con 50% de tiocianato de guanidina y 40% de etanol y centrifugación a 5000 rpm durante 2 minutos. Tras descartar el tubo colector, se realizó un segundo lavado con tampón Tris-HCl con 0.2% de cloruro sódico y 80% de etanol.

Finalmente, se cambió el tubo colector desechando el líquido conteniendo las sustancias no adsorbidas en la columna para elución de los ácidos nucleicos. Para ello, se añadieron 300 μ L de tampón de elución sobre el filtro de las columnas precalentado a 70°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos (figura 3.3).

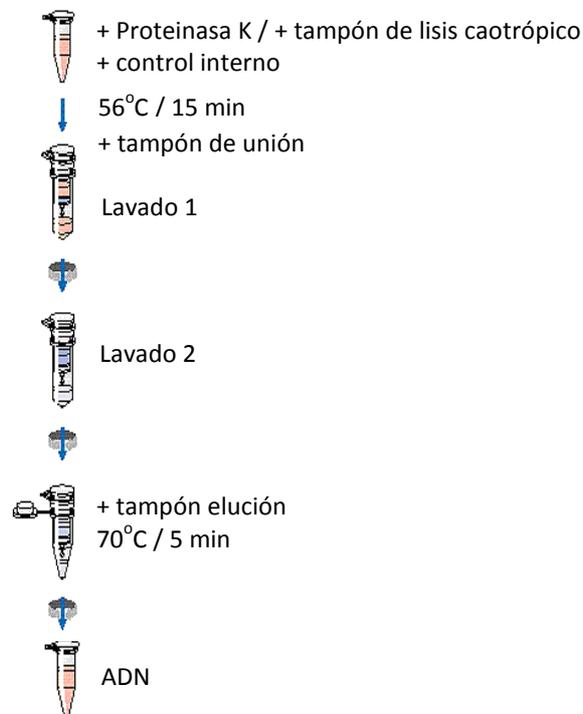


Figura 3.3. Esquema de extracción manual de ácidos nucleicos con el sistema SeptiFast Prep Kit M^{GRADE}

3.3.3.2.3. Amplificación mediante PCR en tiempo real múltiple

Para cada muestra eluída, se llevaron a cabo 3 reacciones de PCR para amplificación de bacterias G+, bacterias G- y hongos, usando el LightCycler® SeptiFast Kit M^{GRADE} siguiendo las normas recomendadas por el fabricante. El procedimiento se dividió en las siguientes fases:

1^º Preparación de la reacción

En área 1

Para la preparación de las 3 mezclas de PCR, se usó el bloque de refrigeración SeptiFast que permite simplificar el proceso de pipeteo y mantener fríos los tubos (figura 3.4). Para cada muestra se prepararon 3 mezclas de PCR en un volumen de 50 µL de mezcla de reactivos y 50 µL de muestra eluída en capilares LightCycler® de 100 µL.

Los reactivos usados para la técnica LC-SF y la distribución de cada uno en el bloque refrigerado para la preparación de las mezclas de PCR se muestran en la tabla 3.2 y figura 3.4.

Tabla 3.2. Reactivos para la amplificación de bacterias y hongos mediante la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} y disposición en el bloque de refrigeración SeptiFast de reactivos y mezclas de PCR

Nombre reactivo (composición)	Posición en bloque SeptiFast
1a (solución de Taq polimerasa)	1a
1b (solución de dNTPs y tampón de reacción)	1b
D1 y D2 (mezcla de cebadores y sondas)	
G+ (para bacterias Gram positivas)	D1/G+, D2/G+
G- (para bacterias Gram negativas)	D1/G-, D2/G-
F (para hongos)	D1/F, D2/F
MM (mezcla de reacción)	Fila 1: G+ / Fila 2: G- / Fila 3: hongos
RC (control positivo de reacción)	Columna RC (Filas: G+, G- y hongos)
NC (eluído de control negativo)	NC (fila inferior, hueco azul)
P1 a P8 (eluídos de muestras 1 a 8)	P1-P8 (filas inferiores, huecos grandes)
Mezclas de PCR en capilares	Fila 1: G+ / Fila 2: G- / Fila 3: hongos
RC (control positivo)	7 ^a columna (amarilla)
NC (control negativo)	8 ^a columna (azul)
Muestras (hasta 8)	9 ^a -16 ^a columna (P1-P8)



Figura 3.4. Bloque de refrigeración SeptiFast

Los viales de reactivos se agitaron unos instantes en vórtex, excepto el vial 1a y se concentraron en el fondo del tubo con un pulso de centrifuga. Se colocaron en sus respectivas posiciones en el bloque de refrigeración (figura 3.4).

Una vez preparadas las mezclas de reactivos, se dispensaron 50 μ L de las mismas en sus correspondientes capilares dispuestos desde la 7ª columna.

En área 2 (CSB II)

Se dispensaron 50 μ L de los eluidos o control positivo en las 3 posiciones de su correspondiente columna, de derecha a izquierda y cerrando cada columna de capilares una vez dispensado cada eluido para evitar contaminaciones. Para el cierre de los capilares se usó el dispositivo “capping tool” disponible con el equipo LightCycler® 2.0 (figura 3.5.A.).

Los capilares se transfirieron al carrusel del LightCycler® 2.0 (figura 3.5.B.) teniendo la precaución de mantener el siguiente orden:

- Control positivo con mezcla de G+, (posición 1) G- (posición 2) y hongos (posición 3)
- Control negativo con mezcla de G+, (posición 4) G- (posición 5) y hongos posición 6)
- Muestra 1 con mezcla de G+, (posición 7) G- (posición 8) y hongos posición 9)
- Muestra 2 con mezcla de G+, (posición 10) G- (posición 11) y hongos posición 12),

Se centrifugó el carrusel para bajar las mezclas en la centrifuga para rotor de LightCycler® 2.0, durante 5 segundos a 3000 rpm (figura 3.5.C).

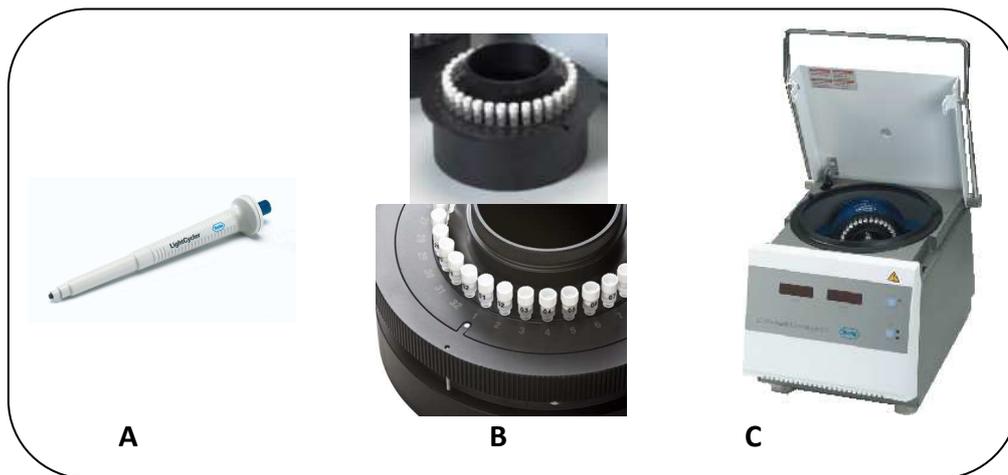


Figura 3.5. A. Dispositivo “capping tool” para cierre de capilares. B. carrusel para LighCycler®. C. Centrífuga para carrusel.

El carrusel con los capilares se colocó en el equipo LightCycler® 2.0 (figura 3.6).



Figura 3.6.-Equipo LightCycler® 2.0

2ª Amplificación-disociación de sondas en equipo LightCycler 2.0

En el ordenador se programó la Macro “SeptiFast” que consiste en el siguiente protocolo:

Descontaminación 40°C 5 minutos

Activación enzimática 95°C 10 minutos

15 ciclos iniciales de amplificación:

 Desnaturalización 95°C 15 segundos

 Hibridación 58°C 50 segundos

 Elongación 72°C 40 segundos

30 ciclos de amplificación:

 Desnaturalización 95°C 15 segundos

 Hibridación 50°C 50 segundos (lectura de fluorescencia)

Elongación	72°C	40 segundos
Disociación de sondas:		
Desnaturalización	95°C	60 segundos
Renaturalización	40°C	60 segundos
Disociación (melting)	Incremento hasta 80°C a 0,1°C/segundos	(lectura continua de fluorescencia)
Enfriamiento	40°C	30 segundos

3.3.3.2.4. Análisis de resultados y cálculo de las temperaturas de disociación

La fluorescencia emitida por cada producto amplificado se midió en cuatro canales de detección, cuyas longitudes de onda fueron: 610 nm, 640 nm, 670 nm y 705 nm. Tras la amplificación y proceso de disociación de sondas, el programa genera automáticamente un informe con unos módulos de análisis denominados “Tm calling” para cada uno de los canales de detección de fluorescencia y para cada una de las mezclas de reacción (G+; G-; y hongos). En cada uno de estos apartados “Tm calling” aparecen las curvas de disociación con sus correspondientes picos para el cálculo manual de la Tm, que se llevó a cabo haciendo coincidir las barras verticales de Tm con cada pico obtenido (figura 3.7).

En cada módulo de análisis, el programa establece un cut-off de señal (“baseline”, figura 3.7), que quedan definidos previamente por el programa de análisis y cuyos valores se recogen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Cut-off de fluorescencia (“baseline”) para cada canal de detección y grupo de microorganismo

Grupo de microorganismos	Canal de fluorescencia			
	610	640	670	705
Bacterias Gram positivas	0,159	0,027	0,061	0,027
Bacterias Gram negativas	0,234	0,001	0,236	0,065
Hongos	0,196	0,033	0,111	0,059

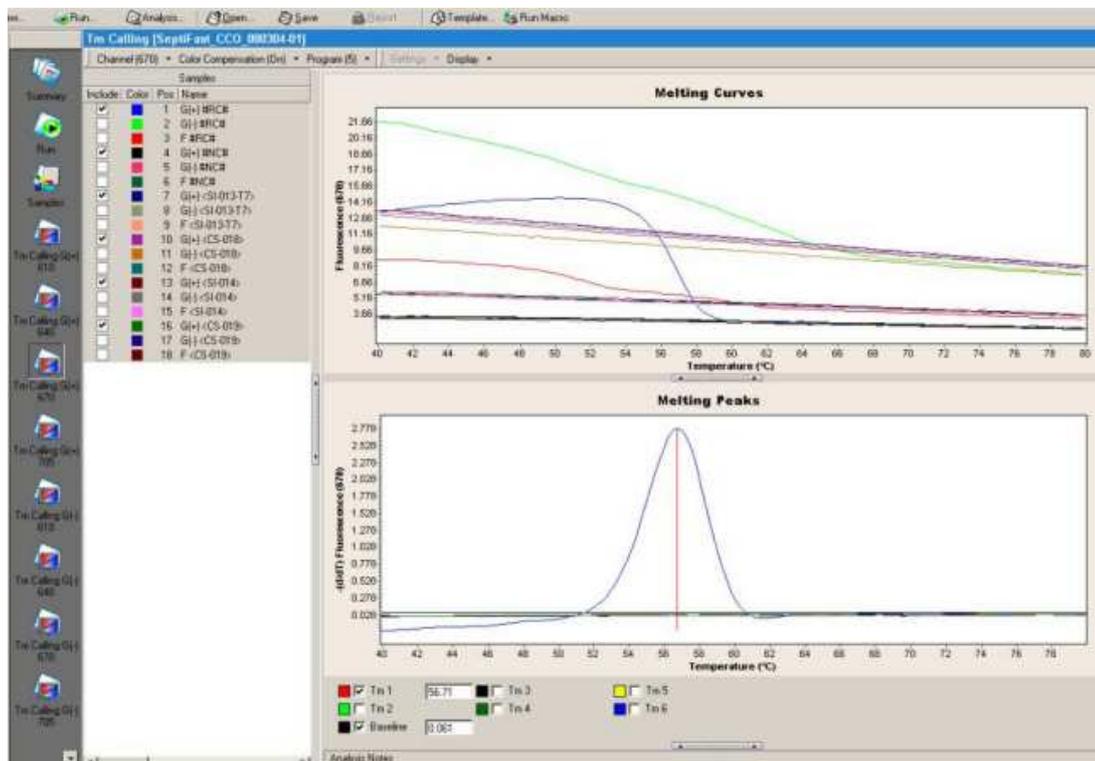


Figura 3.7. Análisis de resultados de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}. Izquierda. Menú de análisis de Tm (“Tm calling”). Gráfico superior: representación de la fluorescencia frente a la temperatura, correspondiente a la reacción de disociación (post-amplificación). Gráfico inferior: representación de la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura con su pico de disociación correspondiente a la Tm (temperatura de disociación del 50% de las sondas). La barra roja vertical ha sido correctamente colocada en su correspondiente pico de disociación.

Los valores del control negativo deben estar por debajo del cut-off y los valores de los controles positivos deben estar por encima del mismo.

Para considerar válida una serie, deben aparecer picos de Tm por encima del cut-off en todos los controles positivos y todos los controles internos, cumpliendo las especificaciones de longitud de onda y Tm correspondientes en cada caso. Para cada grupo de reacción (G+, G- y hongos), el programa tiene establecidos unos valores máximo y mínimo de los picos de disociación generados tras la amplificación (tabla 3.4). La Tm de los picos de disociación de los controles positivos e internos deben estar comprendidos entre esos valores.

Tabla 3.4. Intervalo de Tm válidos de las curvas de disociación

Canal de fluorescencia	Tm (°C)							
	610		640		670		705	
Grupo de microorganismos	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑
Gram positivos	48	53	49	64	49	59	45	65
Gram negativos	52	66	55	69	48	65	57	62
Hongos	56	61	44	58	49	62	51	62

↓, Tm inferior; ↑, Tm superior

3.3.3.2.5. Identificación automática de microorganismos y controles

Cada una de las series realizadas se exportó al programa SIS que interpretaba el informe para dar un resultado (figura 3.8). El resultado era válido si no aparecía ninguna marca (“flag”) o algún otro mensaje de error. El programa SIS incluye un valor cut-off de señal para bacterias G+ con el fin de evitar FP con SCN, potencial contaminante procedente de la microbiota epitelial durante la extracción de la sangre.

SeptiFast Identification Software 1.0.534						
Imported LC-File: BactDNA-09_08_2008 Last modified date: 4/9/2008 11:47:29 Operator: LCUser01 LC Instrument-ID: LC_6276 LCS Version: LCS4 4.0.5.415 Macro: SeptiFast_1.0_04469046001 CCC File Name: SeptiFast_CCO_080304-01		2/5/2011 15:05:20 page 1				
Specimen	Assay	Data	Results	Flags	Comment	
SeptiFast SI-001 14	G(+)	ch705 62.45 h0.40	E. faecalis			
	G(-)					
SeptiFast SI-002 14	F					
	G(+)					
SeptiFast CS-010	G(-)					
	F					
SeptiFast SI-004	G(+)					
	G(-)					
	F					

Run Flags	

Assay Flags	
Assay	Flags
G(+)	
G(-)	
F	

Figura 3.8. Ejemplo de informe emitido por el SeptiFast Identification Software para un ensayo LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}

En la figura 3.9 se recogen las doce curvas de disociación y las Tm correspondientes, para cada uno de los 25 microorganismos detectados por el ensayo LC-SF, así como para los controles internos. Cada microorganismo identificado aparece a una longitud de onda y una Tm específica, al igual que el control interno para cada reacción de G+, G- y hongos.

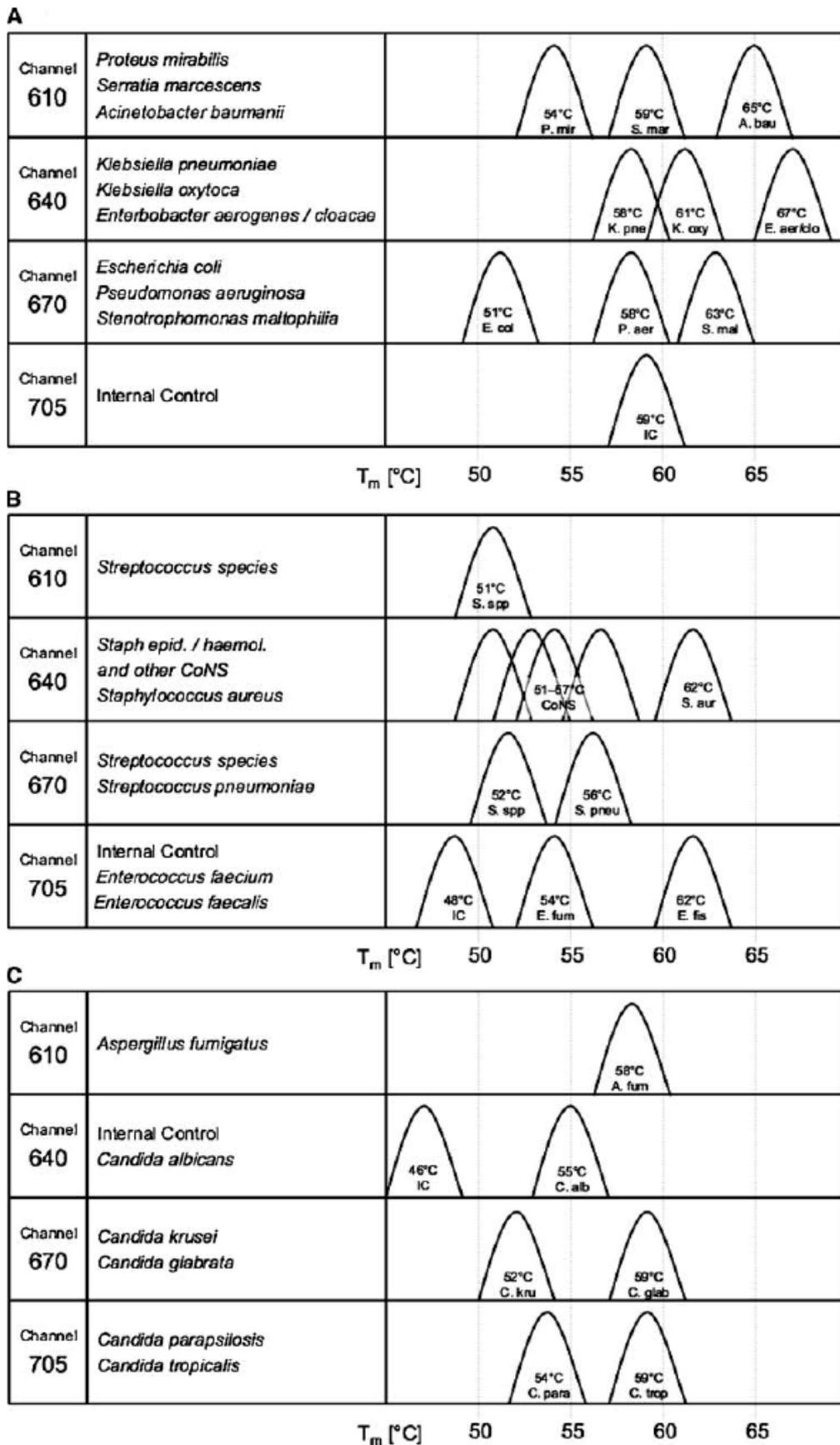


Figura 3.9. T_m para cada microorganismo y control interno en cada canal de fluorescencia

3.4. Comparación de métodos de extracción

El método de extracción de ácidos nucleicos recomendado en las instrucciones del fabricante fue el sistema manual. Se evaluó la utilidad del sistema automático MagNA Pure Compact® (Roche Applied Science) para la extracción de ADN bacteriano y fúngico, comparándolo con el sistema manual.

3.4.1. Cepas

Se utilizaron cepas tituladas de *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231 para el estudio comparativo de métodos de extracción.

Se realizaron suspensiones al 0,5 MacFarland en suero fisiológico de cada una de las cepas. Se realizaron 6 diluciones seriadas decimales y una última dilución 1:2 en el caso de cepas bacterianas y 4 diluciones seriadas decimales y una dilución 1:2 para *C. albicans* (figura 3.10). Se inocularon 100 μ L de cada dilución en agar sangre, para cuantificar las UFC/mL, incubándose durante 18 h en aerobiosis con 5% de CO₂. Se realizó recuento del nº de colonias y se ajustó la cantidad de la suspensión microbiana en solución salina estéril a diluir en 2,2 mL de sangre humana anticoagulada para obtener una concentración final de: 100 UFC/mL y 30 UFC/mL para las cepas bacterianas y de 1000 UFC/mL y 300 UFC/mL para *C. albicans*.

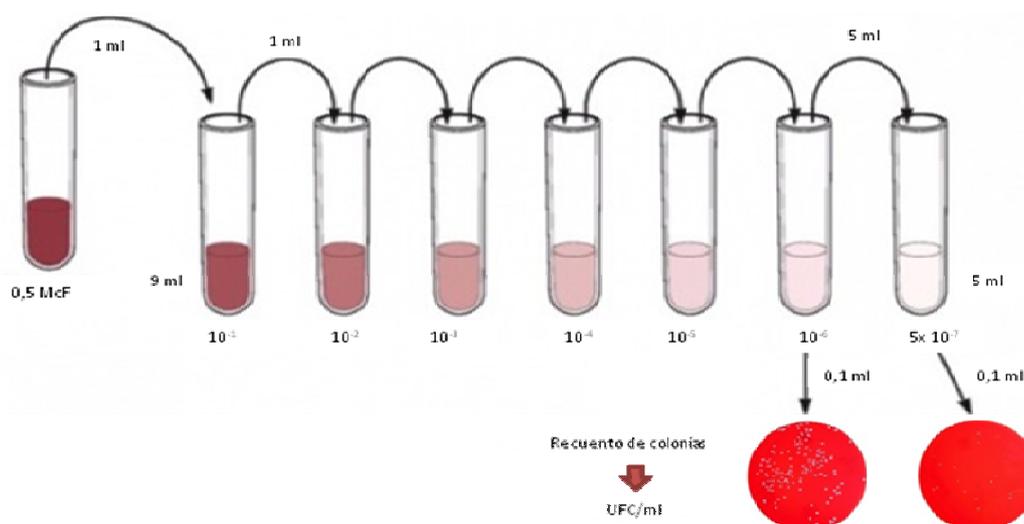


Figura 3.10. Esquema del procedimiento de cuantificación (UFC/mL) de las diluciones seriadas realizadas en las cepas bacterianas

Se realizó un primer paso de lisis mecánica utilizando el mismo kit *SeptiFast Lys M^{GRADE}* con los 2,2 mL de sangre de cada cepa control (ver protocolo en apartado 3.3.3.2.1). Del sobrenadante de cada muestra lisada se tomaron dos alícuotas de 400 µL para cada uno de los sistemas de extracción. Las muestras así obtenidas se sometieron a extracción en paralelo por el sistema *SeptiFast Prep Kit M^{GRADE}* (apartado 3.3.3.2.2) y por el sistema *MagNA Pure Compact[®]* (MPC).

3.4.2. Extracción mediante el sistema *MagNA Pure Compact[®]*

El kit usado para extracción en el equipo *MagNA Pure Compact[®]* (figura 3.11) fue *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit* (Roche Applied Science), que extrae ácidos nucleicos totales.



Figura 3.11. Equipo *MagNA Pure Compact[®]*

Los 400 µL obtenidos tras la lisis mecánica de la sangre se añadieron a tubos “Sample Tube” del MPC, y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Por cada cepa y/o control, se añadieron 4 µL de control interno del kit LC-SF.

Cada uno de los tubos con muestra lisada y control interno se dispuso por orden en la gradilla del equipo en la fila “S”, así como un tubo vacío, “Elution Tube”, en el que se recogen finalmente los ácidos nucleicos eluidos, que se coloca en la fila “E” (figura 3.12).



Figura 3.12. Gradilla de tubos para muestra (S), control interno (IC) y eluidos (E) del equipo MagNA Pure Compact®

Se insertaron en la gradilla correspondiente los cartuchos de reacción individuales suministrados con el kit y el rack de puntas de pipeta (figura 3.13).

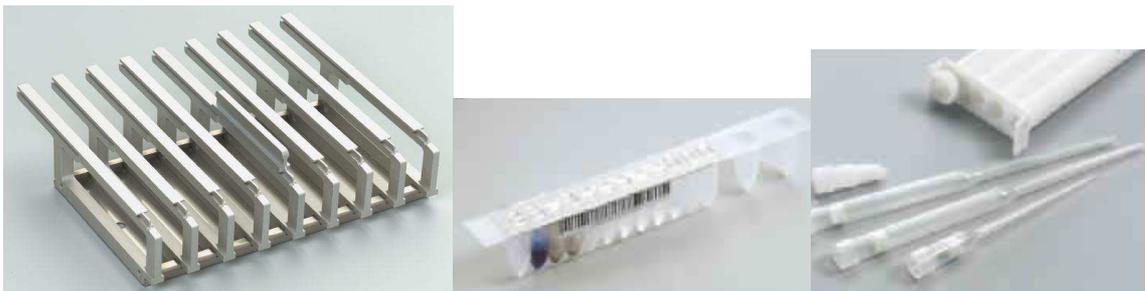


Figura 3.13. Izquierda: gradilla para cartuchos de reactivos del sistema MagNA Pure Compact®. Centro: cartuchos de reactivos. Derecha: rack de puntas de pipeta

Se programó la extracción automática en el equipo MPC para: 400 μ L de volumen de muestra y 200 μ L de volumen de elución.

3.5. Diagnóstico clínico

Tras la revisión de las historias clínicas, se registró el diagnóstico final del pediatra. Se definieron tres categorías diagnósticas:

- *Sepsis clínica*, cuando se cumplieran los criterios clínicos de mala perfusión, mala tolerancia oral, distrés respiratorio e hipotensión y/o los criterios analíticos de leucopenia (< 5.000 leucocitos/ mm^3) o leucocitosis (> 30.000 leucocitos/ mm^3) con desviación a la izquierda y proteína C reactiva elevada (> 1 mg/dL).

- *Sepsis probada*, como la presencia de sepsis clínica junto con el aislamiento del microorganismo en el HC.
- *Sepsis descartada*, cuando solo se cumplía uno de los criterios clínicos y/o analíticos de sepsis clínica debido a otras causas, bien porque el HC se había realizado como control de tratamiento de un episodio previo o porque el paciente estaba afectado por otras patologías no infecciosas, y no se detectó ningún microorganismo potencialmente patógeno en el HC.

3.6. Registro y análisis estadístico de los datos

3.6.1. Registro de datos

Se elaboró una base de datos usando el programa Microsoft® Office Excel 2007 con todos los casos incluidos en el estudio, donde se registraron las variables demográficas y clínicas, mediante la revisión de las historias clínicas, y los resultados microbiológicos.

3.6.1.1. Datos demográficos

En la base de datos se recogieron registros demográficos como nombre, apellidos, edad y número de historia clínica de los niños, así como de sus madres.

3.6.1.2. Datos clínicos

Se recogieron los siguientes datos clínicos de los pacientes: estado general, presencia de fiebre, presencia de apnea, antibioterapia en el momento de la toma y días de antibioterapia y presencia de catéter central y días desde la inserción de catéter hasta el momento de la toma. Así mismo se registró en la base de datos el diagnóstico clínico final de cada episodio realizado por el pediatra.

3.6.1.3. Datos analíticos

Se recogieron los datos analíticos de recuento leucocitario y valor de proteína C reactiva en cada episodio.

3.6.1.4. Datos microbiológicos

Se recogieron los datos de la fecha de toma y resultados obtenidos en el HC, en el ensayo LC-SF, así como en el estudio de otras muestras periféricas de algunos de los casos.

3.6.2. Análisis estadístico

El análisis de resultados se llevó a cabo usando PASW® Statistics version 18.0 (IBM SPSS Inc., Chicago).

3.6.2.1. Estadística descriptiva

Se ha calculado la mediana, la desviación cuartílica y el rango de las variables cuantitativas estudiadas. El resto de variables analizadas fueron cualitativas para las que se calcularon las frecuencias absolutas y relativas.

3.6.2.2. Análisis bivariante

El grado de relación entre los datos clínicos, epidemiológicos y analíticos y los datos microbiológicos se determinó mediante análisis bivariante. Las variables cualitativas se compararon mediante la prueba χ^2 o prueba exacta de Fisher. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

3.6.2.3. Exactitud diagnóstica de la técnica LightCycler SeptiFast

Se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la técnica LC-SF tomando el HC como técnica de referencia. También se calcularon estos índices de exactitud diagnóstica tanto de la técnica LC-SF como del HC tomando como referencia el diagnóstico clínico final de sepsis clínica o sepsis descartada.

3.6.2.4. Estudio de concordancia

Se determinó el acuerdo porcentual (porcentaje de concordancias, negativas y positivas, frente al total) y el índice kappa (**Landis y Koch, 1977**) para calcular el grado de concordancia entre el HC y el LC-SF. El valor del índice kappa categoriza la concordancia desde “muy baja” hasta “excelente” (tabla 3.5).

Tabla 3.5. Clasificación del grado de concordancia según el índice kappa (Landis y Koch, 1977)

Kappa	Concordancia
< 0,2	Muy baja
0,21 – 0,4	Baja
0,41 – 0,6	Moderada
0,61 – 0,8	Buena
0,81 – 1	Excelente

Para todos los parámetros estadísticos evaluados se calculó el intervalo de confianza al 95% (IC₉₅).

4 Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Características clínico-epidemiológicas

Se incluyeron en el estudio un total de 35 RNyL ingresados en la UCIN del HUVN. De estos pacientes se estudiaron 42 episodios febriles. En 4 casos se estudiaron 2 episodios febriles de cada uno y en un niño, se estudiaron 4 episodios. En el **anexo 4.6** se recogen los datos clínico-epidemiológicos y analíticos de los pacientes y/o episodios estudiados. El análisis descriptivo de estos datos se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y/o episodios estudiados

Variables cuantitativas	n	Rango	Mediana	Desviación intercuartílica
Edad (días)	35	0-151	8	6
Peso (gramos)	34	615-3.760	2.400	1.090
Leucocitos (células/mm ³)	40	3.970-78.000	15.670	11.775
Proteína C reactiva (mg/dL)	37	0-23,1	2,5	9,65
Días de antibioterapia	22	1-14	1,5	6
Días de catéter	34	1-103	11	22
Variables cualitativas (analizados/consta dato)	n			%
Sexo (n=35)				
Mujer	13			37,1
Hombre	22			62,9
Prematuridad (n=35)	19			54,3
Muy bajo peso, < 1500 g (n=35)	11			31,4
Presencia de fiebre (n=37)	12			28,6
Presencia de apnea (n=42)	14			33,3
Presencia de catéter central (n=39)	34			87,2
Antibioterapia previa a la toma (n=36)	22			61
Mal estado general (n=42)	26			62
Fiebre materna intraparto (n=31)	5			16,1
Corioamnionitis (n=31)	1			3,2
Ruptura de membrana > 18 h (n=35)	7			20
SGB materno positivo^a (n=21)	7			33,3
Leucocitosis^b (n=36)	4			11
Leucopenia^c (n=36)	3			8
Proteína C reactiva elevada^d (n=37)	21			56,8

a: SGB, *Streptococcus* grupo B en muestra vaginorrectal a las 35-37 semanas de gestación; b: Leucocitosis, > 30.000 leucocitos/mm³; c: Leucopenia, < 5.000 leucocitos/mm³; d: Proteína C reactiva elevada, > 1mg/dL

4.2. Resultados microbiológicos

4.2.1. Datos globales

Se recogieron muestras para HC y LC-SF de 48 episodios, de los cuales 2 fueron excluidos porque no se recibió muestra para HC. Se descartaron del estudio otros 4 episodios ya que el ensayo LC-SF dio resultado inválido por inhibición de la amplificación del control interno (8,3% inhibición). Dos de estos casos dieron HC negativo y en los otros dos se detectó SCN.

El tiempo total de procesamiento del **HC** fue de 5-10 min. El tiempo que consta desde que se registró la muestra y se introdujo en el sistema automatizado de incubación hasta que se emitió un resultado fue de 1-5 días. En el caso de HC positivos, se emitió un resultado de identificación preliminar en menos de 2 días y definitivo en menos de 5 días. Todas las muestras con un resultado definitivo negativo a los 5 días fueron negativas de forma preliminar a las 48 h.

El tiempo total de procesamiento de la muestra para el ensayo **LC-SF** fue de 4,5-5 h y el tiempo de obtención de resultados fue de 7-8 h.

Los datos y resultados microbiológicos así como el diagnóstico clínico final de cada episodio quedan recogidos en el **anexo 4.6**.

4.2.2. Resultados del hemocultivo

De los 42 episodios estudiados, se detectó algún microorganismo en 17 casos (40,5%) y en 25 casos el resultado fue negativo (59,5%). En 36 (86%) episodios sólo fue extraída una única toma por HC.

Los microorganismos detectados fueron cocos G+ en 15 casos (88,2%) de los que 12 eran SCN. En 3 muestras se detectaron enterobacterias. En un HC se detectaron 2 tipos bacterianos (tabla 4.2). No se detectó ningún hongo o levadura en los casos estudiados.

Tabla 4.2. Microorganismos detectados en los hemocultivos positivos (n=17)

Microorganismo	n	%
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	12	70,5
<i>Streptococcus grupo viridans</i>	1	5,9
<i>Escherichia coli</i>	1	5,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	5,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	5,9
<i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	1	5,9

4.2.3. Resultados de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}

El volumen de sangre obtenido varió entre 200 μ L y 1150 μ L, el 50% entre 200 y 525 μ L. Sólo el 14% de las muestras tenían un volumen \geq 1 mL (que es el mínimo recomendado por el fabricante). Tras la lisis mecánica de las muestra de sangre, los volúmenes obtenidos variaron entre 100 y 900 μ L, y en un 62% de los casos se situaron en valores \leq 400 μ L (ver anexo 4.6).

Se detectaron microorganismos mediante LC-SF en 18 episodios (42,9%) y en 24 el resultado fue negativo (57,1%). Se detectaron cocos G+ en 11 casos (61,1%) de los que 7 eran SCN. El segundo microorganismo más frecuentemente detectado fue *P. aeruginosa*. En un episodio, LC-SF detectó 2 tipos bacterianos, que coincidieron con los identificados en el HC (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Microorganismos detectados en las muestras positivas mediante LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} (n=18)

Microorganismo	n	%
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	7	38,89
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	22,22
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	11,11
<i>Escherichia coli</i>	1	5,56
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	5,56
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	5,56
<i>E. cloacae</i> + <i>E. faecalis</i>	1	5,56
<i>Candida parapsilosis</i>	1	5,56

Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la técnica LC-SF teniendo como referencia el HC fueron de 71% (IC₉₅: 47-87%), 76% (IC₉₅: 57-89%), 67% (IC₉₅: 44-84%) y 79% (IC₉₅: 60-91%), respectivamente.

4.2.4. Comparación del hemocultivo con la técnica LightCycler SeptiFast Test M^{grade}

Los resultados obtenidos en paralelo en el HC y con LC-SF se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Resultado del hemocultivo y LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} en las muestras estudiadas

HC ^a	LC-SF ^b	n
Negativo	Negativo	19
SCN ^c	SCN	4
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	1
<i>E. cloacae</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>E. cloacae</i> + <i>E. faecalis</i>	1
SCN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
SCN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
SCN	<i>Candida parapsilosis</i>	1
SCN	Negativo	4
SGV ^d	Negativo	1
Negativo	SCN	3
Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	2
Negativo	<i>S. pneumoniae</i>	1

a: HC, hemocultivo; b: LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}; c: SCN, *Staphylococcus coagulasa* negativa; d: SGV, *Streptococcus* grupo viridans

Al analizar la concordancia entre las dos técnicas diagnósticas, se obtuvieron 5 grupos de resultados: 8 casos positivos por ambas técnicas con identificación concordante (19%), 4 casos positivos por ambas técnicas con identificación diferente (9,5%), 6 casos con HC negativo y LC-SF positivo (14,3%), 5 casos con HC positivo y LC-SF negativo (12%) y 19 casos negativos (45,2%) por ambas técnicas. El estudio de concordancia demostró un índice kappa de 0,369 (IC₉₅: 0,062-0,675), equivalente a una concordancia moderada, y un acuerdo porcentual del 71,1% (IC₉₅: 55,2-83%).

4.3. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el resultado microbiológico

De todos los datos analizados, el que mayor relación mostró con un HC positivo fue la elevación de la proteína C reactiva, aunque sin llegar a ser de forma estadísticamente significativa. Por el contrario, la presencia de antibioterapia en el momento de la toma demostró ser inversamente proporcional a la positividad del HC. El HC fue positivo en sólo 6 de los 22 pacientes (27,3%) con antibioterapia en el momento de la toma frente a 10 (71,4%) de los 14 casos sin antibioterapia previa ($p < 0,01$) (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el resultado del hemocultivo de 42 episodios

Dato clínico / analítico		n	HC ^a positivo [n (%)]	p
Fiebre	sí	12	6 (50)	0,488
	no	25	9 (36)	
Apnea	sí	14	7 (50)	0,508
	no	28	10 (35,7)	
Mal estado general	sí	26	11 (42,3)	0,758
	no	16	6 (37,5)	
Leucocitosis ^b	sí	4	1 (25)	0,626
	no	32	14 (43,8)	
Leucopenia ^c	sí	3	2 (66,7)	0,559
	no	33	13(39,4)	
Proteína C reactiva elevada ^d	sí	21	10 (47,6)	0,315
	no	16	5 (31,3)	
Antibióterapia previa a la toma	sí	22	6 (27,3)	0,009
	no	14	10 (71,4)	
Catéter	sí	34	14 (41,2)	1,000
	no	5	2 (40)	

a: HC, hemocultivo; b: Leucocitosis, > 30.000 leucocitos/mm³; c: Leucopenia, < 5.000 leucocitos/mm³; d: Proteína C reactiva elevada, > 1mg/dL

No se observaron diferencias significativas al comparar los datos clínicos y analíticos con el resultado de la **técnica LC-SF**, aunque más del 50% de los pacientes con LC-SF positivo tenían proteína C reactiva elevada. A diferencia con el HC, la presencia de antibióterapia en el momento de la toma no demostró una relación inversa con la positividad del LC-SF. La presencia de catéter se relacionó con LC-SF positivo en la mitad de los casos, frente a ningún positivo en ausencia de éste (tabla 4.6).

Tabla 4.6. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el resultado de LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} de 42 episodios

Dato clínico / analítico		n	LC-SF ^a positivo [n (%)]	p
Fiebre	sí	12	6 (50)	0,488
	no	25	9 (36)	
Apnea	sí	14	6 (43)	1,000
	no	28	12 (43)	
Mal estado general	sí	26	13 (50)	0,233
	no	16	5 (31,3)	
Leucocitosis ^b	sí	4	1 (25)	1,000
	no	32	13 (40,6)	
Leucopenia ^c	sí	3	1 (33,3)	1,000
	no	33	13(39,4)	
Proteína C reactiva elevada ^d	sí	21	11 (52,4)	0,093
	no	16	4 (25)	
Antibióterapia previa a la toma	sí	22	7 (31,8)	0,054
	no	14	9 (64,3)	
Catéter	sí	34	17 (50)	0,056
	no	5	0 (0)	

a: LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}; b: Leucocitosis, > 30.000 leucocitos/mm³; c: Leucopenia, < 5.000 leucocitos/mm³; d: Proteína C reactiva elevada, > 1mg/dL;

El porcentaje de resultado microbiológico positivo junto con presencia de dato clínico o analítico patológico, relacionado con sepsis, fue similar al comparar ambas técnicas. (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Relación de los resultados positivos obtenidos en hemocultivo y LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} en función de los datos clínicos y analíticos

Datos clínicos y analíticos	LC-SF ^a + [n (%)]	HC ^b + [n (%)]	p
Fiebre	6 (50)	6 (50)	1,000
Apnea	6 (43)	7 (50)	0,897
Mal estado general	13 (50)	11 (42,3)	0,909
Leucocitosis ^c	1 (25)	1 (25)	1,000
Leucopenia ^d	1 (33,3)	2 (66,7)	1,000
Proteína C reactiva elevada ^e	11 (52,4)	10 (47,6)	1,000
Antibióterapia previa a la toma	7 (31,8)	6 (27,3)	0,719
Catéter	17 (50)	14 (41,2)	0,439

a: LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}; b: HC, hemocultivo; c: Leucocitosis, > 30.000 leucocitos/mm³; d: Leucopenia, < 5.000 leucocitos/mm³; e: Proteína C reactiva elevada, > 1mg/dL;

4.4. Diagnóstico clínico final

El diagnóstico clínico final fue de sepsis clínica, sepsis probada y sepsis descartada, siguiendo los criterios definidos en el apartado 3.5 de *Material y Métodos*. Se consideró sepsis

descartada en 23 episodios (54,8%) y sepsis clínica en los otros 19 episodios (45,2%), de los cuales 10 se confirmaron por el HC (sepsis probada). Todos los casos de sepsis confirmada fueron considerados sepsis tardía (rango: 10-73 días) excepto en uno, en que se detectó *E. cloacae* en el HC en que el cuadro de sepsis aparece a las 24 h del nacimiento.

Entre los 19 RN pretérmino, en 10 de ellos (52,6%) hubo sepsis clínica, de los cuales 5 (26,3%) fueron sepsis probada. De los 11 RNMBP, 6 (54,5%) fueron sepsis clínica, de los cuales 3 (27,3%) fueron sepsis probada (anexo 4.6).

4.4.1. Relación entre el diagnóstico clínico final y los datos clínicos y analíticos

Aunque más de la mitad de los casos de sepsis clínica tenían fiebre y apnea, no se demostraron diferencias significativas con respecto al grupo de pacientes con sepsis descartada. El mal estado general sí se relacionó con sepsis clínica ($p < 0,05$), al igual que la elevación de la proteína C reactiva ($p = 0,001$). Este fue el único biomarcador que de forma estadísticamente significativa se relacionó con la presencia de sepsis.

Tabla 4.8. Relación entre la presencia de sepsis (sepsis clínica o probada) y sepsis descartada en función de los datos clínicos y analíticos

Dato clínico / analítico		n	Sepsis clínica o probada [n (%)]	Sepsis descartada [n (%)]	p
Fiebre	sí	12	7 (58,3)	5 (41,7)	0,146
	no	25	7 (28)	18 (72)	
Apnea	sí	14	9 (64,3)	5 (35,7)	0,079
	no	28	10 (35,7)	18 (64,3)	
Mal estado general	sí	26	15 (57,7)	11 (42,3)	0,039
	no	16	4 (25)	12 (75)	
Leucocitosis ^a	sí	4	2 (50)	2 (50)	0,609
	no	32	11 (34,4)	21 (65,6)	
Leucopenia ^b	sí	3	1 (33,3)	2 (66,7)	1,000
	no	33	12 (36,4)	21 (63,6)	
Proteína C reactiva elevada ^c	sí	21	13 (61,9)	8 (38,1)	0,001
	no	16	1 (6,3)	15 (93,8)	
Antibióterapia previa a la toma	sí	22	8 (36,4)	14 (63,6)	0,418
	no	14	7 (50)	7 (50)	
Catéter	sí	34	17 (50)	17 (50)	0,056
	no	5	0 (0)	5 (100)	

a: Leucocitosis, > 30.000 leucocitos/ mm^3 ; b: Leucopenia, < 5.000 leucocitos/ mm^3 ; c: Proteína C reactiva elevada, $> 1\text{mg/dL}$.

4.4.2. Relación entre el diagnóstico clínico final y el resultado microbiológico

La relación entre el diagnóstico clínico final y los resultados del HC y de la técnica LC-SF, así como el tipo de concordancia o discordancia que se obtiene entre los criterios clínicos y microbiológicos se muestran en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Resultados del hemocultivo y de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} en relación con el diagnóstico clínico final

Diagnóstico clínico	n	HC ⁽¹⁾	LC-SF ⁽²⁾	Concordancia*
Sepsis probada (n= 10)	1	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	a
	1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	a
	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	a
	1	<i>E. cloacae / E. faecalis</i>	<i>E. cloacae / E. faecalis</i>	a
	4	SCN ⁽³⁾	SCN	a
	1	SCN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	b
	1	SCN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	b
Sepsis clínica (n=9)	4	Negativo	Negativo	e
	2	Negativo	SCN	c
	2	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	c
	1	Negativo	<i>S. pneumoniae</i>	c
Sepsis descartada (n=23)	15	Negativo	Negativo	e
	1	SCN	<i>P. aeruginosa</i>	b
	1	SCN	<i>Candida parapsilosis</i>	b
	4	SCN	Negativo	d
	1	SGV ⁽⁴⁾	Negativo	d
	1	Negativo	SCN	c
Total	42			8 (a), 4 (b), 6 (c), 5 (d), 19 (e)

(1): HC, hemocultivo; (2): LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}; (3): SCN, *Staphylococcus coagulasa* negativa; (4): SGV, *Streptococcus* grupo viridans; *a= positivos ambas técnicas con identificación concordante, b= positivos ambas técnicas con identificación discordante, c= HC negativo / LC-SF positivo; d= HC positivo / LC-SF negativo; e= negativos ambas técnicas

Tomando como referencia el diagnóstico clínico final, se obtuvieron valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la técnica LC-SF del 79%, 87%, 83% y 83%, frente al 52,6%, 69,5%, 76% y 71,8% del HC, respectivamente.

Además se determinó el índice kappa y el acuerdo porcentual de cada técnica con el diagnóstico clínico final. Se demostró una mayor concordancia del diagnóstico clínico final con los resultados del LC-SF (buena concordancia) que con los del HC (baja concordancia) (tabla 4.10).

Tabla 4.10. Concordancia entre el diagnóstico de sepsis clínica y los resultados del LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} y del hemocultivo

		Sepsis descartada	Sepsis clínica	Kappa (IC ₉₅) ^c	Acuerdo porcentual, % (IC ₉₅)
LC-SF^a	Negativo	20	4	0,729 (0,511 - 0,947)	86,84 (72,67-94,25)
	Positivo	1	13		
HC^b	Negativo	16	9	0,238 (-0,067 - 0,543)	63,16 (47,28-76,62)
	Positivo	5	8		

a: LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}; b: HC, hemocultivo; c: IC₉₅: Intervalo de confianza al 95%

De los 17 positivos del HC, en 10 (58,5%) de ellos el diagnóstico clínico final fue de **sepsis probada**. De los 18 positivos por LC-SF, 15 (83,3%) correspondieron a sepsis clínica, 8 (44,4%) de los cuales fueron sepsis probada y coincidieron en resultado y microorganismo con el HC.

De los 23 casos de **sepsis descartada**, 16 (69,6%) dieron resultado de HC negativo. Se detectaron en este grupo 7 HCs positivos que se consideraron contaminantes, ya que correspondían a 6 SCN y 1 SGV. En el caso de LC-SF, 20 (87%) de las 23 sepsis descartadas dieron negativo el resultado microbiológico. Se detectaron 3 resultados positivos de LC-SF en el grupo de sepsis descartada, uno de los cuales era SCN. Por tanto, la **tasa de contaminación global** del HC y de LC-SF fue del 16,7% y 7,1%, y **por SCN** del 14,3% y del 2,4%, respectivamente (tabla 4.9).

Todos los casos positivos concordantes en el HC y LC-SF (**categoría a**, tabla 4.9) estaban incluidos dentro del grupo de sepsis probada. No hubo resultados positivos concordantes entre ambas técnicas en el grupo donde el diagnóstico clínico final fuera sepsis descartada.

Los 4 positivos discordantes entre HC y LC-SF (**categoría b**, tabla 4.9) correspondieron a 4 RNyL diferentes (anexo 4.6):

- P7. El ensayo LC-SF detectó *S. pneumoniae* y el HC aisló SCN. El pediatra consideró sepsis probada por SCN a consecuencia de un cuadro febril con elevación de la proteína C reactiva.
- P18 y P22. En ambos casos el pediatra descartó la presencia de sepsis, siendo detectados *C. parapsilosis* y *P. aeruginosa* por LC-SF, respectivamente. En los dos casos el HC aisló SCN.

- P25. El ensayo LC-SF detectó *P. aeruginosa* mientras que el HC identificó SCN. Debido a la presencia de parámetros bioquímicos alterados y a la propia clínica del paciente, el diagnóstico realizado por el pediatra fue de sepsis. A este paciente se le tomaron 3 muestras más de sangre, en las que se el HC fue negativo y se detectó de nuevo *P. aeruginosa* mediante LC-SF en una de ellas. De 3 aspirados endotraqueales y un líquido peritoneal tomados en paralelo junto con las muestras de sangre, se aisló *P. aeruginosa* en uno de los aspirados traqueales y en el líquido peritoneal.

En 5 de 6 episodios con HC- / LC-SF + (**tipo de concordancia c**, tabla 4.9), el pediatra diagnosticó sepsis clínica y en el episodio restante sepsis descartada, donde LC-SF detectó SCN.

En los 5 episodios con LC-SF- / HC+ (**tipo de concordancia d**, tabla 4.9), el diagnóstico final del pediatra fue de sepsis descartada. Las bacterias identificadas fueron 4 SCN y un SGV. Por ello, estos casos se consideraron contaminación del HC.

En 15 de los 19 episodios con HC- /LC-SF - (tipo de **concordancia e**, tabla 4.9), el diagnóstico final fue de sepsis descartada, y en los 4 restantes, de sepsis clínica.

4.5. Extracción automatizada de ácidos nucleicos con el sistema MagNA Pure Compact®

Se llevaron a cabo los dos procedimientos de extracción sobre cuatro cepas patrón, *S. epidermidis*, *S. pneumonie*, *E. coli* y *C. albicans*, a concentraciones de 100 UFC/mL y 30 UFC/mL.

El tiempo de realización de la extracción automatizada de ácidos nucleicos fue de aproximadamente 45 minutos. La comparación de la extracción manual con automática se llevó a cabo con datos de una misma serie de LC-SF para cada cepa.

Se obtuvieron los valores del eje de ordenadas $[-(d/dT)F$, derivada negativa de la fluorescencia (F) respecto a la temperatura (T)] obtenidos en la gráfica de las curvas de disociación, y de los C_p obtenidos en la curva de fluorescencia (figura 4.1, tabla 4.11).

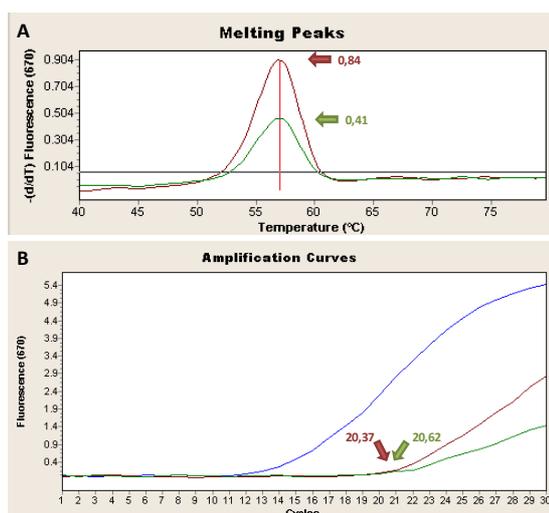


Figura 4.1. A. Curva de disociación con valor de Tm para la muestra extraída con MagNA Pure Compact®, conteniendo 100 UFC/mL (rojo) y 30 UFC/mL (verde) de *S. pneumoniae*. B. Curva de fluorescencia con sus correspondientes valores de Cp

Tabla 4.11. Valores de $-(d/dT)F$ de la curva de fluorescencia y Cp obtenidos en las muestras de sangre con cepas patrón obtenidos en LightCycler-SeptiFast Test M^{GRADE} tras extracción manual y automatizada con MagNA Pure Compact®

Microorganismo	Canal de detección		Extracción Manual		Extracción MPC ^a	
			$-(d/dT)F^b$	Cp ^c	$-(d/dT)F$	Cp
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100 UFC/ml	640 (G+)	0,17	22,39	0,42	20,71
	30 UFC/ml		0,11	>25	0,28	21,78
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100 UFC/ml	670 (G+)	0,39	21,92	0,84	20,37
	30 UFC/ml		NA ^d	NA	0,41	20,62
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/ml	670 (G-)	NA	NA	0,1	21,3
	30 UFC/ml		NA	NA	0,04	>25
<i>Candida albicans</i>	100 UFC/ml	640 (F)	0,51	16,92	0,43	16,72
	30 UFC/ml		0,56	18,11	0,25	17,98

a: MPC, MagnaPure Compact®; b: $-(d/dT)F$, derivada negativa de la fluorescencia (F) respecto a la temperatura (T); c:Cp, "crossing point"; d: NA, no amplifica

En el caso de *S. epidermidis*, *S. pneumoniae* y *E. coli* se observa que el sistema MPC presentó unas alturas de pico más elevadas. En cambio, para *C. albicans* la Tm presentó un valor de $-(d/dT)F$ discretamente inferior cuando se realizó extracción automática. En todos los casos positivos por ambos sistemas, los valores de Cp fueron inferiores cuando se realizó

extracción MPC. Con MPC se detectaron el 100% de cepas y/o diluciones, mientras que un 37,5% de las extraídas por el sistema manual fueron negativas.

4.6. Anexo

ANEXO 4.6. Datos demográficos, analíticos, clínicos y microbiológicos de los pacientes y/o episodios estudiados

		Datos demográficos		Datos analíticos		Datos clínicos						Datos microbiológicos			
Episodio	Paciente	Edad (días)	Peso (g)	Leucocitos (células/mm ³)	Proteína C reactiva (mg/dL)	Fiebre	Mal estado general	Apnea	Días de antibioterapia*	Días de catéter*	DCF ^a	V _o ^b (μL)	V _{lisis} ^c (μL)	HC ^d	LC-SF ^e
1	P1	2	1.230	56.220	7,40	No	Sí	No	4	8	2	600	500	Negativo	Negativo
2	P2	0	2.780	15.710	0,50	No	Sí	Sí	NC	0	3	350	150	Negativo	Negativo
3	P3	7	NC ^f	12.840	0,80	No	Sí	No	2	2	3	700	400	Negativo	Negativo
4	P4	12	3.760	10.270	13,20	Sí	No	Sí	0	11	1	700	400	EFAE ^g	EFAE
5	P5	2	3.570	16.690	7,10	No	Sí	Sí	1	1	3	900	500	SCN ^h	Negativo
6	P6	0	3.560	31.590	0,50	No	Sí	Sí	NC	5	3	500	300	Negativo	Negativo
7	P7	30	3.530	26.140	0,00	Sí	No	Sí	5	15	1	500	300	SCN	SPNEU ⁱ
8	P8	13	2.850	18.000	0,90	No	No	Sí	0	6	3	1000	600	Negativo	Negativo
9	P9	14	3.500	18.000	1,00	No	No	No	0	0	3	400	250	Negativo	Negativo
10	P10	0	1.390	9.240	0,10	No	Sí	No	1	9	3	900	500	Negativo	Negativo
11	P11	0	1.060	9.500	0,00	No	Sí	No	1	4	3	1000	700	Negativo	SCN
12	P12	0	1.080	26.080	2,50	No	No	No	1	8	3	900	700	Negativo	Negativo
13	P13	12	680	38.960	10,00	Sí	Sí	No	0	12	1	1000	900	SCN	SCN
14	P14	57	680	7.300	4,60	Sí	No	No	10	29	3	300	150	Negativo	Negativo
15	P15	2	3.620	9.930	0,90	Sí	Sí	Sí	0	2	3	900	700	Negativo	Negativo
16	P16	1	2.700	19.740	13,50	Sí	No	Sí	0	16	1	900	500	ECLOA ^j	ECLOA
17	P17	8	2.730	18.810	23,10	No	No	No	7	15	1	500	300	SCN	SCN
18	P18	2	2.310	15.630	0,10	No	Sí	No	0	7	3	750	400	SCN	CPAR ^k
19	P19	0	3.250	17.110	0,10	No	Sí	No	2	2	3	500	300	Negativo	Negativo
20	P20	0	615	68.000	0,00	No	Sí	No	3	3	3	200	100	Negativo	Negativo
21	P21	33	3.270	17.530	0,00	No	No	Sí	0	0	3	300	150	SCN	Negativo
22	P22	10	1.749	13.310	0,10	No	No	Sí	0	8	3	700	400	SCN	<i>Pseudomonas</i>
23	P22	14	1.749	6.540	1,00	No	Sí	No	0	12	3	700	400	SCN	Negativo
24	P23	18	1.025	NC	NC	NC	Sí	No	0	NC	1	500	250	EFAE+ECLOA	EFAE+ECLOA
25	P13	69	680	17.720	11,40	Sí	Sí	No	0	40	1	200	100	ECO ^l	ECO
26	P24	5	2.640	3.970	8,30	Sí	Sí	No	4	0	3	400	300	Negativo	Negativo
27	P24	6	2.640	3.970	8,30	Sí	No	No	5	0	3	450	400	SGV ^m	Negativo
28	P25	49	890	8800	NC	NC	Sí	Sí	NC	49	2	500	400	Negativo	Negativo
29	P25	53	890	8800	NC	NC	No	No	NC	53	1	700	500	SCN	PAER ⁿ
30	P25	61	890	8800	NC	NC	Sí	Sí	NC	61	2	450	350	Negativo	PAER
31	P25	82	890	8800	NC	NC	Sí	Sí	NC	82	2	700	700	Negativo	Negativo
32	P26	8	2.490	25.080	0,30	Sí	Sí	Sí	8	NC	3	450	250	Negativo	Negativo
33	P26	6	2.490	23.560	5,60	Sí	Sí	Sí	6	NC	2	450	350	Negativo	Negativo
34	P27	5	2.140	12.040	23,00	No	Sí	Sí	5	28	2	350	300	Negativo	PAER
35	P28	7	1.600	20.700	10,50	No	Sí	No	7	41	1	800	800	SCN	SCN
36	P29	9	950	4.520	4,60	No	No	No	0	20	1	1000	600	SCN	SCN
37	P30	57	750	21.190	7,90	No	No	No	0	22	2	1000	600	Negativo	SPNEU
38	P31	3	1.720	5.650	14,60	No	No	No	3	8	2	425	350	Negativo	SCN
39	P32	14	2.690	7.240	9,70	No	Sí	No	14	9	3	525	475	Negativo	Negativo
40	P33	8	1.960	20.200	1,80	No	No	No	8	25	3	650	450	SCN	Negativo
41	P34	18	3.400	7.150	1,20	No	Sí	Sí	14	18	3	500	350	Negativo	Negativo
42	P35	151	2.850	NC	21,00	Sí	Sí	Sí	7	88	2	1150	400	Negativo	SCN

a: DCF, diagnóstico clínico final: 1, sepsis probada, 2, sepsis clínica, 3, sepsis descartada; b: V_o, volumen de sangre inicial; c: V_{lisis}, volumen tras la lisis mecánica; d: HC, hemocultivo; e: LC-SF, LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}; f: NC: no consta dato; g: EFAE, *Enterococcus faecalis*; h: SCN, *Staphylococcus coagulasa negativa*; i: SPNEU, *Streptococcus pneumoniae*; j: ECLOA, *Enterobacter cloacae*; k: CPAR, *Candida parapsilosis*; l: ECO, *Escherichia coli*; m: SGV, *Streptococcus* grupo viridans; n: PAER, *Pseudomonas aeruginosa*; * un valor igual a 0 corresponde a pacientes sin antibioterapia previa y/o sin catéter.

5 *Discusión*

5. DISCUSIÓN

La **sepsis neonatal** es una causa importante de morbilidad y mortalidad, fundamentalmente en RN pretérmino (**Pazzi y cols, 2006**). De los 35 neonatos incluidos en el estudio, 19 eran RN pretérmino. De 14 sepsis clínicas diagnosticadas, 10 afectaron a RN pretérmino (71,4%), y de 4 fallecimientos, 3 (75%) fueron RN pretérmino (15,8% de mortalidad en este grupo).

De todos los casos de sepsis en el neonato más de un 25% afecta a RNMBP (**Kaufman y Fairchild, 2004**). Nosotros obtenemos datos similares. De las 10 sepsis confirmadas, 3 corresponden a RNMBP, lo que representa el 30% de los casos.

5.1. Etiología de la sepsis neonatal

En nuestro estudio se ha considerado sepsis probada, cuando se cumplían una serie de criterios clínicos y analíticos junto con el aislamiento del microorganismo en el HC. Al disponer solamente de 10 casos de sepsis probada, los porcentajes hallados probablemente no son representativos del “peso” que cada microorganismo aporta al perfil etiológico de la sepsis neonatal en nuestro medio.

Recientemente, en la sepsis de transmisión vertical se demuestra una disminución significativa de los casos por SGB, debida fundamentalmente a los programas de prevención seguidos desde el cribado microbiológico en el periodo de gestación de la madre, hasta la evaluación de factores de riesgo, y la aplicación de profilaxis intraparto en madres colonizadas y/o con factores de riesgo (**Verani y cols, 2010**). A pesar de ello, al contrario de lo esperado teóricamente, datos previos demuestran que el porcentaje de sepsis neonatal vertical por *E. coli* no ha aumentado, contrarrestando a la disminución del porcentaje de detección de SGB (**López Sastre y cols, 2008**). En nuestra serie, no se obtuvo ningún aislamiento de SGB, y *E. coli* sólo se aisló en un caso. Esto supone un 10%, inferior al 26% publicado en 2006 (**López Sastre y cols, 2008**). Es de destacar que *E. cloacae* se aisló en dos casos (20%), dato muy superior al 3,1% de aislamientos de *Enterobacter* spp. en el año 2006 (**López Sastre y cols, 2008**).

Según varios trabajos (**Stoll y cols, 2002; Bizzarro y cols, 2005**), la causa más común de sepsis nosocomial en el RN es por SCN. En España (**Coto Cotallo, 2006**), SCN es responsable de casi la mitad de las sepsis de origen nosocomial. En nuestra serie, SCN se aísla en el 60% de las sepsis probadas. *Enterococcus* spp., como agente etiológico de sepsis tanto de origen vertical (11,3%, **López Sastre y cols, 2008**) como nosocomial (7,8%, **Coto Cotallo, 2006**), en nuestro

estudio se aísla en dos episodios, lo que representaría un 20% de las sepsis probadas, porcentaje superior a los datos publicados en España.

Los RNMBP presentan una mayor predisposición a desarrollar infección, debido a un sistema inmunitario inmaduro y a medidas de soporte invasivas (Kauffmann y Fairchild, 2004). Los BGN son una causa importante de infección nosocomial neonatal (Benjamin y Stoll 2006). Las más frecuentes suelen ser *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas*. El aislamiento de especies de *Candida* y de algunos hongos en sangre de RNMBP con sepsis nosocomial, va aumentando recientemente debido a la mayor supervivencia de los niños y a la presión antibiótica (Coto Cotallo, 2006). *C. albicans* y *C. parapsilosis* son las especies más frecuentemente aisladas. En nuestro estudio, había 3 RNMBP entre los 10 episodios de sepsis probada, en los que se detectó SCN en dos casos y *E. faecalis* y *E. cloacae* en el otro, pero no hubo ninguna sepsis por *Candida*.

5.2. Utilidad de la técnica LightCycler SeptiFast Test M^{grade} en el diagnóstico de sepsis neonatal

El ensayo LC-SF es una prueba diagnóstica con un elevado potencial para el diagnóstico precoz de sepsis. Este diagnóstico precoz repercute en un beneficio directo al paciente, al ajustar la terapia antimicrobiana, reducir estancias hospitalarias, etc. Son muchos los estudios que han evaluado la utilidad de LC-SF en distintos contextos clínicos: UCI (Lehmann y cols, 2010; Wallet y cols, 2010; Yanagihara y cols, 2010; Lodes y cols, 2012), medicina interna (Josefson y cols, 2011; Pasqualini y cols, 2012), servicio de urgencias (Louie y cols, 2008; Tsalik y cols, 2010); y en determinadas patologías como endocarditis (Casalta y cols, 2009; Fernández y cols, 2010; Lefort y cols, 2012), infecciones fúngicas invasivas (Dierkes y cols, 2009; Steinmann y cols, 2009; von Lilienfeld-Toal y cols, 2009), trasplantes (Rath y cols, 2012) y pacientes con neutropenia febril (von Lilienfeld-Toal y cols, 2009; Lamoth y cols, 2010), entre otros. Sin embargo, son pocos los estudios que se centran en el uso de LC-SF en el ámbito de la sepsis neonatal. Por ello, nuestro trabajo evalúa la utilidad de esta herramienta en este grupo de pacientes.

Asimismo, algunos trabajos han evaluado el impacto económico de la implantación como herramienta diagnóstica de la técnica LC-SF. Se ha demostrado que el empleo de esta técnica, por su elevado VPN, que permiten el desescalado del tratamiento antimicrobiano y reducir la estancia hospitalaria (Jordan y Durso, 2000), supone un ahorro significativo en el manejo del paciente con sepsis (Lehmann y cols, 2009; Álvarez y cols, 2012). El ensayo LC-SF

permite obtener un resultado negativo en 6 horas, frente al mínimo de 5 días que tarda el HC en dar resultados negativos definitivos (**Mancini y cols, 2008**). En la serie de este trabajo, todas las muestras con un resultado definitivo negativo a los 5 días fueron negativas de forma preliminar a las 48 h. El resultado del LC-SF estuvo disponible en 8 h.

La ventaja que puede presentar el ensayo LC-SF sería la de mejorar o minimizar aquellos parámetros que influyen negativamente en el diagnóstico de sepsis mediante HC. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad del ensayo LC-SF se determina en comparación con los resultados del HC, que se considera la técnica de referencia. Como técnica de referencia, el HC presenta una serie de inconvenientes que analizaremos si afectan también al resultado del ensayo LC-SF.

Las principales causas de FN del HC en el diagnóstico de sepsis neonatal son: el volumen de sangre obtenido, número de tomas y tratamiento antimicrobiano previo.

El **volumen de sangre** obtenido para HC en este grupo poblacional es habitualmente inferior al recomendado. Algunos estudios demuestran que más de la mitad de los HCs procesados en rutina en un laboratorio clínico, contienen un volumen de sangre inadecuado para descartar bacteriemia (**Connell y cols, 2007**). En nuestra serie, aunque no pudimos determinar el volumen de sangre en cada frasco de HC, según constan en los datos de la toma, se utilizó la misma cantidad de sangre para el HC y para la técnica LC-SF. El rango de volumen de sangre obtenido en nuestros pacientes varió desde 200 μL a 1150 μL , siendo inferior a 1000 μL en el 86% de los episodios estudiados.

En 8 de los 10 casos de sepsis probada, LC-SF detectó los mismos microorganismos que el HC. En los dos casos restantes, hubo discordancia en el microorganismo detectado por ambas técnicas. En el HC se aisló SCN en ambos casos y LC-SF detectó *S. pneumoniae* en uno de los casos. Se realizó determinación de antígeno de neumococo a partir del HC y salió positivo. Para comprobar la especificidad de la técnica de detección de antígeno, se aplicó ésta también a un HC con *E. coli* y a un HC negativo, y en ambos casos fue negativa (datos no mostrados). Por tanto, aunque es un hallazgo puntual, y el HC es considerada técnica de referencia, dado que neumococo crece más lentamente que SCN, se podría especular que el HC fue contaminado por SCN lo cual impidió el crecimiento de *S. pneumoniae*, que fue detectado sólo mediante la técnica molecular. En el otro caso, LC-SF detectó *P.aeruginosa* frente al aislamiento de SCN en el HC. Aunque *P.aeruginosa* es contaminante de técnicas moleculares (**Millar y cols, 2002**), se trató de un episodio de sepsis en el que también se aisló *P. aeruginosa* en muestras periféricas simultáneas.

Para una correcta interpretación del HC, el mínimo **número de tomas** recomendado es dos. En RNyL esto es difícil de conseguir, en estos casos algunos autores han demostrado que no se pierde precisión en el diagnóstico con una única toma de HC cuando el volumen de sangre es ≥ 1 ml (**Sarkar y cols, 2006**). La mayoría de episodios estudiados en nuestro estudio tenían una única toma (86%).

La sensibilidad del HC disminuye dramáticamente cuando la toma de sangre se realiza después de comenzado el **tratamiento antimicrobiano** (**Peters y cols, 2004**). Estudios previos han demostrado que el HC de pacientes neutropénicos con sospecha de sepsis, reciben habitualmente profilaxis antibiótica, y el diagnóstico de sepsis es un desafío porque es negativo en la mayoría de los casos (**Serody y cols, 2000**), así como en casos de neumonía adquirida en la comunidad en pacientes en tratamiento antibiótico en el momento de la toma (**Glerant y cols, 1999**).

En nuestra serie fueron 22 los RNyL con tratamiento antimicrobiano previo. El HC fue positivo sólo en 6 de estos casos (27,3%), 3 de los cuales tenían diagnóstico de sepsis clínica y/o probada y los otros 3 se consideraron contaminantes ya que se descartó la sepsis. En el caso de la técnica LC-SF, se obtuvieron 7 positivos (31%), pero a diferencia de los resultados del HC, en 6 de estos 7 casos positivos mediante LC-SF el diagnóstico fue de sepsis clínica y/o probada. Por tanto, aunque no existen diferencias significativas comparando los porcentajes de detección con el HC y con LC-SF, esta última podría ofrecer una ventaja con respecto al HC para el diagnóstico de sepsis en pacientes con tratamiento antimicrobiano en el momento de la toma de muestra, ya que al ser una técnica molecular puede detectar microorganismos viables y no viables.

Los FP, debidos principalmente a las contaminaciones del HC también representan un gran problema. SCN es uno de los principales microorganismos contaminantes, que forma parte de la microbiota epitelial. En neonatos las tasas de contaminación por SCN son las más altas, de hasta un 43% (**Phillips y Bradley, 1990**). En nuestra serie la tasa de contaminación del HC por SCN fue del 14,3% frente a sólo el 2,4% para LC-SF.

Los primeros trabajos que determinan **sensibilidad y especificidad** de una técnica de PCR frente al HC en RN con bacteriemia, utilizaron **PCR de ARNr 16S**, realizando un enriquecimiento previo de las muestras, encontrándose una elevada correlación entre ambas técnicas, y unos valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 96%, 99,4%, 88,9%, y 99,8% respectivamente (**Jordan y Durso , 2000**). Posteriores estudios llevaron a cabo un trabajo similar, pero no realizaron enriquecimiento previo de las muestras de sangre y éstas

pertenecían a RN ingresados en UCIN. Los índices de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN obtenidos fueron 66,7%, 87,5%, 95,4% y 75%, respectivamente (**Reier-Nilsen y cols, 2009**). Estos valores son inferiores a los obtenidos en el trabajo anterior, debido posiblemente a que en éste sometieron las muestras a enriquecimiento previo.

Los primeros trabajos del ensayo **LC-SF** se realizaron sobre **población adulta**, la mayoría de los pacientes ingresados en UCI. Los valores de sensibilidad y VPP obtenidos fueron muy heterogéneos, en rangos desde un 40% y 27% (**Wallet y cols, 2010**) hasta un 91% y 71%, respectivamente (**Avolio y cols, 2010**). Una limitación importante pudo ser el hecho del escaso volumen de sangre obtenido para la realización del ensayo LC-SF, respecto al mayor volumen de sangre en el HC que se realizaron con 3 tomas (**Wallet y cols, 2010**). Los valores de especificidad en distintos estudios fueron siempre superiores al 75%. El VPN también fue elevado, con valores de 83-97% % (**Avolio y cols, 2010; Rath y cols., 2012**).

En población **pediátrica**, son pocos los trabajos publicados con **LC-SF**. De estos, el único que aporta datos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, es el estudio de **Lucignano y cols, del 2011**, si bien este fue realizado en niños de edades comprendidas entre 0 y 18 años. Los porcentajes que obtuvieron fueron 85%, 93,5%, 60,2% y 98,2%, respectivamente.

Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la técnica LC-SF en nuestro estudio teniendo como referencia el HC fueron de 71%, 76%, 67%, y 79%, respectivamente. Estos resultados son peores a los obtenidos en población adulta e incluso en otros estudios sobre población pediátrica aunque con un rango de edad más amplio. Es posible que el volumen de la muestra influya en este resultado. Sin embargo, sí se obtienen valores de sensibilidad superiores a los obtenidos con la PCR ARNr 16S sin enriquecimiento previo (**Reier-Nilsen y cols, 2009**).

La concordancia obtenida entre LC-SF y el HC en este trabajo es moderada, con un acuerdo porcentual del 71,1% y un índice kappa de 0,369. Se han obtenido resultados algo mejores en numerosos trabajos realizados en población adulta ingresada en UCI y otros servicios, en los que la concordancia es del 75-82% (**Dierkes y cols, 2009; Bravo y cols, 2011; Pasqualini y cols, 2012; Leitner y cols, 2013**) y el índice kappa de 0,5. Nuestros resultados se asemejan más a los obtenidos en otros grupos de adultos con neutropenia febril o inmunodeprimidos, en los que se obtienen unos porcentajes algo menores, entre el 55% y el 83% (**Mancini y cols, 2008; Bravo y cols, 2011; Guido y cols, 2012; Mauro y cols, 2012**) y un índice kappa de 0,37. La mayoría de los pacientes con neutropenia febril son sometidos a

profilaxis antibiótica que puede repercutir en los valores de concordancia baja (**Paolucci y cols, 2013**). En nuestro trabajo, los factores que pueden haber influido en esta menor concordancia con respecto a otros grupos de población estudiados pueden ser no sólo el tratamiento antimicrobiano previo, que se dio en 22 de los 42 casos, sino también a otros parámetros como el volumen de muestra obtenido y al escaso número de episodios en los que el HC se realizó con varias tomas.

5.2.1. Utilidad de la extracción automatizada mediante el sistema MagnaPure

La extracción manual de ácidos nucleicos está cada vez más en desuso, por la laboriosidad del proceso junto con el mayor riesgo de contaminaciones cruzadas (**Queipo-Ortuño y cols, 2008**). Por ello, son muchas las casas comerciales que han desarrollado sistemas de extracción automatizados de ácidos nucleicos, y que han sido aplicados para detección de microorganismos en sangre mediante PCR. Los primeros trabajos compararon métodos manuales con el sistema automatizado MPC donde determinaron el límite de detección PCR ARNr 18S en tiempo real para *A. fumigatus*. El límite de detección para ambas extracciones fue de 10 UFC/mL, aunque en algunos casos sólo MPC detectó 1 UFC/mL (**Loeffler y cols, 2002**). En otros estudios se compararon diferentes kits de extracción automatizada en distintas especies de *Candida* para la realización de PCR ARNr 18S a tiempo real, donde los límites de detección obtenidos fueron 18 UFC/ml (**Metwally y cols, 2008**), 10 UFC/ml (**Maaroufi y cols, 2004**) y 5 UFC/ml (**White y cols, 2003**).

Cuando se inició este trabajo en 2007, el método de extracción recomendado por el fabricante era la extracción manual. En todos los episodios estudiados, la extracción de ácidos nucleicos para la técnica LC-SF fue la manual. Por ello, comparamos la técnica manual con la extracción automatizada por MPC con 4 cepas diferentes que se añadieron a diferentes concentraciones en 1 mL de sangre. Los límites de detección del ensayo LC-SF determinados previamente por el fabricante mediante extracción manual (**Lehmann y cols, 2008**) son de 100 UFC/mL para SCN, *C. glabrata* y *Streptococcus* spp. y de 30 UFC/mL para el resto de microorganismos. En nuestro trabajo, el rendimiento de la extracción en MPC fue superior a la extracción manual para la detección de 3 de las 4 cepas estudiadas. En el caso de *E. coli* no se consiguió detectar la dilución con 30 UFC/mL, que se supone es el límite de detección de LC-SF para este microorganismo (**Lehmann y cols, 2008**), sin embargo, sólo la extracción automatizada permitió detectar la dilución de *E. coli* con 100 UFC/mL. En el caso de

S.epidermidis, ambas diluciones se detectaron utilizando ambos métodos de extracción; aunque con la dilución de 30 UFC/mL el Cp obtenido cuando se realizó la extracción manual fue superior a 25, por lo que el software de análisis SIS lo habría dado como negativo ya que está por encima del punto de corte máximo. Para *S. pneumoniae*, también se obtuvieron menores valores de Cp cuando la extracción fue automatizada y sólo con ésta LC-SF fue positiva para la dilución con 30 UFC/mL.

Estos datos están en consonancia con lo publicado por **Regueiro y cols, en 2010**, donde quedan patentes los buenos resultados obtenidos con la extracción automatizada de ácidos nucleicos en el sistema MPC. Aunque en este estudio el VPP es algo inferior con la extracción en MPC frente a la manual (88,88% vs 93,33%), la sensibilidad y el VPN son superiores (88,88% vs 51,85% y 96,2% vs 85,71%, respectivamente), al igual que obtienen una concordancia muy elevada entre LC-SF con extracción MPC y el HC (acuerdo porcentual: 94%, índice kappa: 0,85). Además se reduce el tiempo de manipulación durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos, que era, por otra parte, el más laborioso de todo el procedimiento de LC-SF. Estos sistemas automatizados reducen el tiempo total para obtener un resultado en 4 h y minimizan el riesgo de contaminación.

Tanto en HC positivos como negativos, el resultado preliminar estuvo disponible en nuestro trabajo en 48 h. La extracción manual supuso un tiempo total de procesamiento de 8 h. Esto hace que se requieran dos jornadas lectivas para dar un resultado de PCR, lo cual no supone una gran ventaja con respecto al resultado preliminar del HC; que en el caso de los negativos, se confirmaron a los 5 días. Por tanto, el empleo de un sistema automatizado habría permitido acortar el tiempo y dar un resultado en la misma jornada con un máximo de 24 h.

5.3. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el diagnóstico clínico final

El diagnóstico precoz de sepsis sigue siendo un desafío para los clínicos, por la dificultad que se plantea a la hora de establecer valores de normalidad en los **marcadores biológicos de sepsis** y el hecho de que la mayoría de síntomas clínicos que se pueden presentar como signos de infección neonatal son inespecíficos. Además de elevarse en la infección, también lo hacen en otros procesos no infecciosos. De hecho, marcadores como PCT y la proteína C reactiva, aumentan su concentración de forma fisiológica en los RN. La proteína C reactiva aumenta en los primeros días y la PCT a los pocos días del parto. Además, algunos estudios han observado que la proteína C reactiva es menor en los RN prematuros posiblemente a causa de la

inmadurez de la función hepática (Chiesa y cols, 2011). Sin embargo, en estudios que comparan grupos de pacientes sintomáticos con pacientes sanos, se observan valores mayores de proteína C reactiva en los primeros (Chiesa y cols, 2003). Por ello, se han establecido unos puntos de corte de este marcador biológico como predictor de sepsis neonatal.

En la UCIN del HUVN, se establecen como puntos de corte en la sepsis neonatal: proteína C reactiva >1 mg/dL. De los datos clínicos recogidos en nuestro estudio, sólo los RNyL con mal estado general, se relacionó con la presencia de sepsis. De los parámetros analíticos, sólo la elevación de la proteína C reactiva se asoció de forma estadísticamente significativa con la presencia de sepsis, dejando constancia del importante papel como biomarcador de infección en RNyL.

5.4. Relación entre la clínica y los datos microbiológicos

5.4.1. Relación entre los datos clínicos y analíticos con los resultados microbiológicos

Debido a la controversia que existe sobre la utilidad de los principales **marcadores biológicos de infección** en el manejo de la fiebre en niños: leucocitos y proteína C reactiva, se analizó la relación de éstos con los resultados microbiológicos. Una de las conclusiones de la revisión de Hsiao y Baker (Hsiao y Baker, 2005) es la inferior sensibilidad del recuento de leucocitos, con respecto a la proteína C reactiva. Según los datos de nuestro estudio, solo 7 episodios con sospecha de sepsis presentaron recuento leucocitario patológico, en los cuales, el HC y el ensayo LC-SF dieron resultado negativo, en 4 y 5 casos, respectivamente. Por el contrario, la proteína C reactiva se elevó en 21 de los 37 episodios donde constaba el dato de proteína C reactiva, y en aproximadamente la mitad de estos episodios con niveles elevados ambas técnicas detectaron microorganismos en sangre, 41,6% el HC y 52,4% el ensayo LC-SF. Sin embargo, no se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre los datos analíticos y los resultados microbiológicos.

Muchos trabajos analizan la influencia de los resultados del ensayo LC-SF cuando los pacientes han recibido **tratamiento antimicrobiano previo** en el momento de la toma de sangre. Vince y cols. obtienen un porcentaje de positividad en el ensayo LC-SF mayor que el HC (33,3% vs 23,1%, respectivamente) (Vince y cols, 2008). En nuestro estudio, aunque no se observaron diferencias significativas al comparar los porcentajes de positividad del HC (27%) con los de LC-SF (32%) en pacientes con tratamiento antimicrobiano en el momento de la toma, la mitad de los resultados positivos por HC correspondieron a contaminaciones (3/6 SCN

correspondientes a casos de sepsis descartada). Es bien sabido que el uso de antibióticos puede ser causa de resultados FN del HC del RN con sepsis (**López Sastre y cols, 2008**).

5.4.2. Relación entre el diagnóstico clínico final y los resultados microbiológicos

Al igual que los trabajos que comparan los resultados del ensayo LC-SF con los de HC, son muchos también los que comparan el ensayo LC-SF con el diagnóstico clínico final, hecho por el pediatra, teniendo en cuenta datos clínicos, analíticos y microbiológicos, procedentes del cultivo de otras muestras, además del HC.

Los estudios que comparan los valores de exactitud diagnóstica del LC-SF y del HC, tomando el diagnóstico clínico final como referencia, obtienen valores superiores del primero en la mayoría de los casos. Como muestra de ello, son los valores de sensibilidad del ensayo LC-SF con respecto al HC obtenidos por Maubon y cols. y Pasqualini y cols., donde LC-SF demuestra una sensibilidad del 51% y 71% frente al 47% y 67% del HC (**Maubon y cols, 2010; Pasqualini y cols, 2012**), respectivamente. Sin embargo, hay estudios que demuestran una especificidad inferior del LC-SF respecto al HC, con valores del 83% y 95%, respectivamente (**Maubon y cols, 2010**). En nuestro trabajo, LC-SF supera en sensibilidad, especificidad, VPP y VPN al HC, cuando se toma como referencia el diagnóstico clínico final. Esto da lugar a una concordancia mayor del LC-SF con el diagnóstico clínico final que entre éste y el HC.

El mayor VPN de LC-SF (83%) frente al del HC (72%) podría suponer una ventaja del primero frente al segundo en el adecuado desescalado del tratamiento antimicrobiano o bien en el reajuste de la antibioterapia (**Maubon y cols, 2010; Wallet y cols 2010; Grif y cols, 2012; Lodes y cols, 2012**).

Los resultados positivos coincidentes por ambas técnicas HC y LC-SF correspondieron a *E. coli*, *E. cloacae* y *E. faecalis*, y SCN. Las enterobacterias y *E. faecalis* se aislaron en 4 episodios y SCN en otros 4, con diagnóstico final de **sepsis probada**. Esto muestra el valor de la técnica LC-SF en la identificación de enterobacterias y de *E. faecalis*, y en la confirmación de sepsis por SCN en RNyL. SCN y entre ellas *S. epidermidis*, la bacteria G+ más frecuentemente aislada en sepsis nosocomial, forman parte de la microbiota epitelial, por lo que pueden ser contaminaciones y ser confundidos con verdaderas bacteriemias por SCN (**Huang y cols, 2006**). En estos casos el ensayo LC-SF constituiría una herramienta adicional al HC, en la confirmación del papel patógeno de SCN (**Bravo y cols, 2011**). Otras técnicas de PCR como es la PCR ARNr

16S también son útiles empleada junto con el HC, en el diagnóstico rápido de sepsis neonatal estafilocócica (**Makhoul y cols, 2005**).

Los 2 restantes episodios de sepsis probada correspondieron a resultados positivos discordantes por HC y LC-SF. Uno de estos casos fue el neonato P7, donde LC-SF identificó *S. pneumoniae* y el HC SCN. Este RNyL presentó fiebre, mal malestar general y tratamiento antimicrobiano durante 5 días previo a la toma de muestra. Como se ha comentado previamente, se detectó antígeno de neumococo en sangre, aunque no es una técnica validada para este tipo de muestra. Por ello, es difícil determinar si una posible contaminación del HC con SCN pudiera estar enmascarando el verdadero patógeno causante de la sepsis en este niño.

El otro caso fue el neonato P25, donde LC-SF identificó *P. aeruginosa* y el HC SCN. Además de este episodio, el paciente tuvo tres episodios más, donde el HC fue negativo en los tres casos y el ensayo LC-SF fue negativo en dos y en uno identificó *P. aeruginosa* de nuevo. Además, *P. aeruginosa* se detectó en el cultivo de otras muestras para estudio microbiológico (un aspirado traqueal y un líquido peritoneal). Aunque *P. aeruginosa* es considerado uno de los principales contaminantes de las técnicas de PCR universal (**Millar y cols, 2002**), el aislamiento de este microorganismo en otras muestras periféricas de este paciente en el momento del cuadro séptico, podría apoyar una posible papel etiológico de este microorganismo en la sepsis de este caso.

En los nueve episodios con **sepsis clínica** (con HC negativo) el ensayo LC-SF fue positivo en cinco. En los episodios donde LC-SF identificó algún microorganismo, no existen resultados microbiológicos de otras muestras que puedan ayudar a confirmar el papel patógeno de los microorganismos detectados, salvo en un episodio que corresponde al paciente P25. Cinco casos de sepsis clínica estaban sometidos a terapia antimicrobiana en el momento de la extracción de sangre. En tres de ellos el ensayo LC-SF detectó e identificó microorganismos. Esto podría reflejar el papel diagnóstico de la técnica LC-SF en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo, debido al gran número de FN que ocasiona la antibioterapia en el momento de la toma en el HC, fundamentalmente en el ámbito de la sepsis neonatal (**Jordan y Durso, 2005**). **Willet y cols, en 2010** realizaron un estudio prospectivo de pacientes ingresados en UCI, donde la información obtenida a partir del ensayo LC-SF se incluyó en el manejo de estos pacientes. De ocho pacientes con antibioterapia previa y HC negativo, el resultado del LC-SF hizo que en cuatro se ajustara el tratamiento antimicrobiano. En otros estudios similares, los resultados del LC-SF permitieron el ajuste de la terapia antimicrobiana en un 11,3% (**Grif y**

cols, 2012) y 16,9% (**Lodes y cols, 2012)** de los casos. En un estudio realizado con pacientes oncológicos, los resultados del LC-SF mejoraron el tratamiento antimicrobiano en el 10% de los pacientes (**Maubon y cols, 2010**).

En nuestra serie, de los 22 episodios que habían recibido tratamiento antimicrobiano previo, en 14 se descartó la sepsis, lo que supone un 63,6% de antibioterapia inadecuada. De igual forma, si se hubiese empleado LC-SF como herramienta diagnóstica adicional, de los 5 casos de sepsis clínica con antibioterapia previa y HC negativo, LC-SF hubiese identificado 3 microorganismos potencialmente causantes de infección (*P. aeruginosa* y 2 SCN).

Hubo 8 episodios donde el HC, el LC-SF o bien ambas técnicas detectaron algún microorganismo, cuando el diagnóstico final fue de **sepsis descartada**. Cuando ambas técnicas fueron positivas, en ningún caso coincidieron en la identificación del microorganismo, reforzando la idea del papel contaminante de estas identificaciones.

Se consideraron contaminaciones del HC y de la técnica LC-SF aquellos microorganismos detectados e identificados por estas técnicas, procedentes de episodios en los que se descartó la sepsis. En base a este concepto, nuestros datos mostraron una tasa de contaminación de 16,7% del HC, en el que se aislaron 6 SCN y 1 SGV, y de 7,1% para LC-SF, por la detección de 1 SCN, 1 *P. aeruginosa* y 1 *C. parapsilosis*. Otros autores obtienen resultados similares, en los que la tasa de contaminación de HC es superior a la del LC-SF (5.8% vs 1,6%, respectivamente), debida la primera principalmente a SCN (73,8%), y predominando SCN, *K.pneumoniae*/*K. oxytoca* y *P. aeruginosa* como posibles contaminantes en el LC-SF (**Lucignano y cols, 2011**). Resultados similares obtuvieron Westh y cols. con unas tasas de contaminaciones por HC y LC-SF, de 4% y 2,2%, respectivamente; en ambos casos, la mayoría de los microorganismos considerados contaminantes fueron SCN y *Streptococcus* spp. (**Westh y cols, 2009**).

SCN y ***Streptococcus*** spp. forman parte de la microbiota epitelial. La tasa de contaminaciones en el HC y en el ensayo LC-SF, debida a SCN en nuestra serie fue 14,3% y del 2,4%, respectivamente. Josefson y cols. realizaron un estudio con 1093 pacientes adultos donde encontraron un 1% de contaminación por SCN y SGV en LC-SF, con una tasa de contaminación global de 4% (**Josefson y cols, 2011**). Otros estudios encontraron tasas de hasta un 16% de SCN considerados contaminantes en el ensayo LC-SF (**Louie y cols, 2008**). De esta manera se observa como los microorganismos que forman parte de la microbiota epitelial han contribuido de forma diferente al global de contaminaciones en el ensayo LC-SF, aunque predominan los estudios con un porcentaje bajo de contaminaciones por estos microorganismos, y en todos los casos, inferior al obtenido con el HC. Por ello, el ensayo LC-SF

podría ser de gran utilidad para confirmar el papel contaminante de SCN y de SGV en el HC, dado que la interpretación de estos aislamientos a partir del HC con una sola toma (generalmente el tipo de muestra disponible en RN) suele generar controversia. En nuestro estudio hubo 5 episodios de sepsis descartada, donde el HC identificó 4 SCN y 1 SGV y el ensayo LC-SF fue negativo.

El registro de los tiempos de detección de estos microorganismos en el HC, podría descartar o confirmar el papel contaminante de los mismos, ya que los patógenos importantes son detectados en las primeras 24 horas de incubación del HC (**Janjindamai y Phetpaisal, 2006; Jardine y cols, 2006**). Por tanto, se podría pensar que un tiempo de detección corto en el HC junto con un LC-SF positivo a SCN u otro microorganismo potencial contaminante, como SGV, podría confirmar una sepsis por los mismos. En nuestro estudio, el tiempo de detección de SCN en el HC fue registrado sólo en dos episodios, siendo de 18,79 horas y 7,73 horas. El primer caso corresponde al paciente P25, y en concreto al episodio diagnosticado de sepsis probada donde LC-SF identificó *P. aeruginosa* y el HC SCN. En este caso, *P. aeruginosa* podría haber sido el causante de la sepsis, ya que también se aisló de otras muestras periféricas y de otra muestra de sangre del mismo paciente por LC-SF con diagnóstico de sepsis clínica. El segundo caso corresponde al paciente P29, diagnosticado de sepsis probada y en el que tanto el HC como LC-SF detectaron SCN.

Uno de los principales microorganismos causantes de sepsis relacionada con **catéter**, es SCN, debido a la capacidad de adherencia a la superficie de los dispositivos intravasculares y la producción de biofilm (**Kaufman y Fairchild, 2004**). Además mediante venopunción, en estos casos la extracción del HC se realiza también a través del catéter intravascular, lo que aumenta el riesgo de contaminaciones. En 3 de los 5 episodios de sepsis descartada donde el HC identificó 4 SCN y un SGV, con resultados negativos del LC-SF, los RNyL portaban catéteres intravasculares. Por tanto, la información obtenida del ensayo LC-SF podría ser útil en confirmar o descartar SCN como agente causal de la sepsis relacionada con catéter.

Debido a la alta sensibilidad de las técnicas moleculares basadas en la PCR, la detección de patógenos en sangre puede dar lugar a FP (**Radstrom y cols, 2004**), por microorganismos diferentes de la microbiota epitelial. En la realización de las técnicas de PCR universal *P. aeruginosa* es uno de los principales probables contaminantes generados en el flujo de trabajo (**Millar y cols, 2002**). LC-SF es una prueba con una menor sensibilidad que la PCR universal. Por ello, los problemas de contaminaciones se reflejan en menor medida. Además, en el ambiente de laboratorio hay que prestar atención al papel de *Aspergillus spp.* como contaminante (**Maubon y cols, 2010; Wallet y cols, 2010; Josefson y cols, 2011**) y a *Candida spp.*,

fundamentalmente en pacientes altamente colonizados como son los pacientes hematológicos (**Maubon y cols, 2010**). Por tanto, podríamos explicar la presencia de *P. aeruginosa* y *C. parapsilosis* en los casos de sepsis descartada en nuestra serie como contaminaciones del ensayo LC-SF. *C. parapsilosis* se aisló en un RNMBP y que portaba un catéter intravascular. Se ha visto una fuerte asociación de colonización de *C. parapsilosis* en RNMBP con catéter venoso central, ya que es capaz de formar biofilm en la superficie de estos dispositivos (**Kaufman y Fairchild, 2004**).

6 Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Aunque actualmente el tiempo de manipulación requerido con la técnica molecular es superior al procesamiento de la muestra para hemocultivo, el tiempo requerido para la obtención de un resultado disminuye considerablemente. Por tanto, la técnica LightCycler SeptiFast podría ser de utilidad para mejorar el manejo del paciente con sospecha de sepsis.
2. El empleo de sistemas automatizados de extracción de ácidos nucleicos supone una mejora en sensibilidad, reproducibilidad y una disminución considerable en el tiempo de ejecución del procedimiento molecular para el diagnóstico de sepsis.
3. La concordancia entre LightCycler SeptiFast y el diagnóstico clínico final es superior a la obtenida entre éste y el hemocultivo. Por ello, la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de LightCycler SeptiFast son mayores que los del hemocultivo cuando se toma el diagnóstico clínico final como método de referencia.
4. La aparición de falsos resultados negativos debidos al tratamiento antimicrobiano tiene mayor influencia en el hemocultivo que en la técnica LightCycler SeptiFast.
5. La técnica molecular LightCycler SeptiFast ha demostrado una tasa de contaminación por *Staphylococcus* coagulasa negativo muy inferior a la del hemocultivo convencional. Por ello, LightCycler SeptiFast es de utilidad tanto para descartar sepsis por *Staphylococcus* coagulasa negativo como para confirmar una sepsis por este microorganismo en recién nacidos, en los que habitualmente es difícil obtener hemocultivos con más de una toma.
6. Aunque LightCycler SeptiFast es un test más caro que el hemocultivo, su uso podría suponer un ahorro al gasto ocasionado por un tratamiento antimicrobiano inadecuado y una mayor estancia hospitalaria.
7. La técnica molecular LightCycler SeptiFast podría ser una herramienta valiosa, empleada en paralelo al hemocultivo y junto con las características clínicas y parámetros bioquímicos para el diagnóstico precoz de la sepsis neonatal.

7 Índice de tablas y figuras

7. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

7.1. Tablas

Tabla 1.1. Etiología de la sepsis vertical y nosocomial en España.....	8
Tabla 1.2. Manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal.....	10
Tabla 1.3. Relación de microorganismos detectados por LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE}	27
Tabla 1.4. Estudios que reflejan la sensibilidad y especificidad del ensayo LightCycler SeptiFast usando como estándar de referencia el hemocultivo o el global de datos clínicos y de laboratorio.....	31
Tabla 3.1. Composición de los frascos BACTEC Peds Plus™/F para hemocultivo automatizado mediante el sistema BACTEC-9240®	41
Tabla 3.2. Reactivos para la amplificación de bacterias y hongos mediante la técnica LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} y disposición en el bloque de refrigeración SeptiFast de reactivos y mezclas de PCR.....	47
Tabla 3.3. Cut-off de fluorescencia (“baseline”) para cada canal de detección y grupo de microorganismo.....	50
Tabla 3.4. Intervalo de Tm válidos de las curvas de disociación.....	51
Tabla 3.5. Clasificación del grado de concordancia según el índice kappa.....	59
Tabla 4.1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y/o episodios estudiados...	62
Tabla 4.2. Microorganismos detectados en los hemocultivos positivos (n=17).....	63
Tabla 4.3. Microorganismos detectados en las muestras positivas mediante LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} (n=18).....	64
Tabla 4.4. Resultado del hemocultivo y LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} en las muestras estudiadas.....	65
Tabla 4.5. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el resultado del hemocultivo de 42 episodios.....	66
Tabla 4.6. Relación entre los datos clínicos y analíticos y el resultado de LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} de 42 episodios.....	67

Tabla 4.7. Relación de los resultados positivos obtenidos en hemocultivo y LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} en función de los datos clínicos y analíticos.....	67
Tabla 4.8. Relación entre la presencia de sepsis (sepsis clínica o probada) y sepsis descartada en función de los datos clínicos y analíticos.....	68
Tabla 4.9. Resultados del hemocultivo y de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} en relación con el diagnóstico clínico final.....	69
Tabla 4.10. Concordancia entre el diagnóstico de sepsis clínica y los resultados del LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} y del hemocultivo.....	70
Tabla 4.11. Valores de $-d(dT)F$ de la curva de fluorescencia y Cp obtenidos en las muestras de sangre con cepas patrón obtenidos en LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE} tras extracción manual y automatizada con MagNa Pure Compact®	72

7.2. Figuras

Figura 1.1. Algoritmo diagnóstico de la sepsis neonatal.....	20
Figura 1.2. PCR en tiempo real con sondas FRET de detección.....	28
Figura 1.3. Curva de fluorescencia de PCR-TR.....	28
Figura 1.4. Curva de disociación de las sondas FRET tras el proceso de PCR-TR.....	29
Figura 1.5. Esquema de un fragmento de genoma bacteriano conteniendo la región ITS.....	29
Figura 3.1. A. Frasco BACTEC PEDS Plus™/F. B. Sistema Bactec-9240® para incubación y monitorización automática continua de hemocultivos.....	42
Figura 3.2. A. Vial con bolas cerámicas. B. Equipo MagNA Lyser®	45
Figura 3.3. Esquema de extracción manual de ácidos nucleicos con el sistema SeptiFast Prep Kit M ^{GRADE}	46
Figura 3.4. Bloque de refrigeración SeptiFast.....	48
Figura 3.5. A. Dispositivo “capping tool” para cierre de capilares. B. carrusel para LightCycler®. C. Centrífuga para carrusel.....	49

Figura 3.6. Equipo LightCycler® 2.0.....	49
Figura 3.7. Análisis de resultados de la técnica LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE}	51
Figura 3.8. Ejemplo de informe emitido por el SIS para un ensayo LightCycler® SeptiFast Test M ^{GRADE}	52
Figura 3.9. Tm para cada microorganismo y control interno en cada canal de fluorescencia....	53
Figura 3.10. Esquema del procedimiento de cuantificación (UFC/mL) de las diluciones seriadas realizadas en las cepas bacterianas.....	54
Figura 3.11. Equipo MagNA Pure Compact®.....	55
Figura 3.12. Gradilla de tubos para muestra (S), control interno (IC) y eluidos (E) del equipo MagNA Pure Compact®.....	56
Figura 3.13. Izquierda: gradilla para cartuchos de reactivos del sistema MagNA Pure Compact®. Centro: cartuchos de reactivos. Derecha: rack de puntas de pipeta.....	56
Figura 4.1. A. Curva de disociación con valor de Tm para la muestra extraída con MPC, conteniendo 100 UFC/mL (rojo) y 30 UFC/mL (verde) de <i>S. pneumoniae</i> . B. Curva de fluorescencia con sus correspondientes valores de Cp.....	72

8 Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) **ACCP/SCCM**. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20(6):864-874.
- (2) **Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wust J, Trampuz A**. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4):1208-1214.
- (3) **Allen S, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Winn WC**. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto Y Atlas En Color Ed. Médica Panamericana, Madrid. 2008.
- (4) **Álvarez J, Mar J, Varela-Ledo E, Garea M, Martínez-Lamas L, Rodríguez J, Regueiro B**. Cost analysis of real-time polymerase chain reaction microbiological diagnosis in patients with septic shock. *Anaesth Intensive Care* 2012; 40(6):958-963.
- (5) **Andrade SS, Bispo PJ, Gales AC**. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. *Shock* 2008; 30 (Suppl 1):41-46.
- (6) **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR**. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7):1303-1310.
- (7) **Aronson MD, Bor DH**. Blood cultures. *Ann Intern Med* 1987; 106(2):246-253.
- (8) **Avolio M, Diamante P, Zamparo S, Modolo ML, Grosso S, Zigante P, Tosoni N, De Rosa R, Stano P, Camporese A**. Molecular identification of bloodstream pathogens in patients presenting to the emergency department with suspected sepsis. *Shock* 2010; 34(1):27-30.
- (9) **Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P**. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* 1998; 102(4):E41.
- (10) **Benjamin DK Jr, DeLong ER, Steinbach WJ, Cotton CM, Walsh TJ, Clark RH**. Empirical therapy for neonatal candidemia in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003; 112(3 Pt 1):543-547.
- (11) **Benjamin DK Jr, Stoll BJ**. Infection in late preterm infants. *Clin Perinatol* 2006; 33(4):871-882.
- (12) **Bernardo K, Fler S, Pakulat N, Krut O, Hunger F, Kronke M**. Identification of *Staphylococcus aureus* exotoxins by combined sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and

matrix-assisted laser desorption/ ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2002; 2(6):740-746.

(13) **Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG.** Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics* 2005; 116(3):595-602.

(14) **Blot F, Schmidt E, Nitenberg G, Tancrede C, Leclercq B, Laplanche A, Andremont A.** Earlier positivity of central-venous versus peripheral-blood cultures is highly predictive of catheter-related sepsis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1):105-109.

(15) **Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101(6):1644-1655.

(16) **Bone RC, Fisher CJ,Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA.** Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 1989; 17(5):389-393.

(17) **Bravo D, Blanquer J, Tormo M, Aguilar G, Borrás R, Solano C, Clari MA, Costa E, Muñoz-Cobo B, Argueso M, Pineda JR, Navarro D.** Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int J Infect Dis* 2011; 15(5):e326-331.

(18) **Bryan CS.** Clinical implications of positive blood cultures. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2(4):329-353.

(19) **Burnie JP, Naderi-Nasab M, Loudon KW, Matthews RC.** An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital-acquired infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35(7):1746-1750.

(20) **Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D.** Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(6):569-573.

(21) **Chiesa C, Natale F, Pascone R, Osborn JF, Pacifico L, Bonci E, De Curtis M.** C reactive protein and procalcitonin: reference intervals for preterm and term newborns during the early neonatal period. *Clin Chim Acta* 2011; 412(11-12):1053-1059.

(22) **Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, Pacifico L.** C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness

severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. Clin Chem 2003; 49(1):60-68.

(23) **Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N.** How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. Pediatrics 2007; 119(5):891-896.

(24) **Coto Cotallo GD.** Protocolo diagnóstico-terapéutico de la sepsis neonatal. Bol Pediatr 2006;46(supl. 1):125-134.

(25) **de Silva GD, Justice A, Wilkinson AR, Buttery J, Herbert M, Day NP, Peacock SJ.** Genetic population structure of coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants. Clin Infect Dis 2001; 33(9):1520-1528.

(26) **Dierkes C, Ehrenstein B, Siebig S, Linde HJ, Reischl U, Salzberger B.** Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. BMC Infect Dis 2009; 9:126-132.

(27) **Domingo AA, Cacho J, Coira Nieto A, Lepe Jiménez JA.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. 2010; disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14a.pdf>.

(28) **Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB.** Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. J Med Microbiol 2000; 49(3):295-300.

(29) **Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W.** Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43(10):5256-5262.

(30) **Ernst DJ.** Controlling blood-culture contamination rates. MLO Med Lab Obs 2004; 36(3):14-18.

(31) **Evans ME, Schaffner W, Federspiel CF, Cotton RB, T. MK,Jr, Stratton CW.** Sensitivity, specificity, and predictive value of body surface cultures in a neonatal intensive care unit. JAMA 1988; 259(2):248-252.

(32) **Fernández Colomer B, López Sastre J, Coto Cotallo GD, Ramos Aparicio A, Ibañez Fernández A.** Protocolos de Neonatología. Asociación Española de Pediatría. Sepsis del recién

nacido. 2008; disponible en: http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/21_0.pdf, 2008.

(33) **Fernández AL, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González-Juanatey JR, Regueiro B.** Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for detecting pathogens in cardiac valve tissue in patients with endocarditis. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63(10):1205-1208.

(34) **Foltzer M, Reese R.** Bacteremia and sepsis. Chapter 3. In: Reese R, Douglas R, editors. *A practical approach to Infectious Diseases*. 2nd ed.: Little, Brown & Co. Michigan; 1986. p. 21-59.

(35) **Fulginiti VA, Ray CG.** Body surface cultures in the newborn infant. An exercise in futility, wastefulness, and inappropriate practice. *Am J Dis Child* 1988; 142(1):19-20.

(36) **García del Río M, Lastra G, Medina A, Sánchez Tamayo T.** *Protocolos de Neonatología*. Asociación Española de Pediatría. Protocolo diagnóstico de infección. 2008; disponible en: <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/23.pdf>, 2008.

(37) **García García MJ, Salas Hernández S, Pena García P, Montes Bueno MT, Arroyo Carrera I, Pérez Rodríguez J, Quero Jiménez J.** *Staphylococcus* coagulase negative infection in neonates caused by intravascular catheters. Prospective study. *An Esp Pediatr* 1990; 32(6):518-521.

(38) **Gasser Laguna I, Vives Coll D, Salcedo Abizanda S, Olona Cabases M, Fernández Pérez F.** Usefulness of body surface cultures in newborns with early infection risk. Study of 735 neonates. *An Esp Pediatr* 1996; 45(4):409-414.

(39) **Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR.** Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol* 2010; 71:149-184.

(40) **Glerant JC, Hellmuth D, Schmit JL, Ducroix JP, Jounieaux V.** Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission. *Respir Med* 1999; 93(3):208-212.

(41) **Goldstein B, Giroir B, Randolph A.** International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(1):2-8.

(42) **Grif K, Fille M, Wurzner R, Weiss G, Lorenz I, Gruber G, Eschertzhuber S, Nachbaur D, Lass-Flörl C, Orth D.** Rapid detection of bloodstream pathogens by real-time PCR in patients with sepsis. *Wien Klin Wochenschr* 2012; 124(7-8):266-270.

- (43) **Guido M, Quattrocchi M, Zizza A, Pasanisi G, Pavone V, Lobreglio G, Gabutti G, De Donno A.** Molecular approaches in the diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignances. *J Prev Med Hyg* 2012; 53(2):104-108.
- (44) **Haimi-Cohen Y, Shafinoori S, Tucci V, Rubin LG.** Use of incubation time to detection in BACTEC 9240 to distinguish coagulase-negative staphylococcal contamination from infection in pediatric blood cultures. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(11):968-74.
- (45) **Hall MM, Ilstrup DM, Washington JA, 2nd.** Effect of volume of blood cultured on detection of bacteremia. *J Clin Microbiol* 1976; 3(6):643-5.
- (46) **Isenberg HD.** *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3 Vol. 2nd ed.: American Society of Clinical Microbiology; Washington. 2004.
- (47) **Horz HP, Scheer S, Huenger F, Vianna ME, Conrads G.** Selective isolation of bacterial DNA from human clinical specimens. *J Microbiol Methods* 2008; 72(1):98-102.
- (48) **Hsiao AL, Baker MD.** Fever in the new millennium: a review of recent studies of markers of serious bacterial infection in febrile children. *Curr Opin Pediatr* 2005; 17(1):56-61.
- (49) **Huang YC, Wang YH, Chou YH, Lien RI.** Significance of coagulase-negative staphylococci isolated from a single blood culture from neonates in intensive care. *Ann Trop Paediatr* 2006; 26(4):311-318.
- (50) **Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, Stewart B, Grief B, Scharnweber G.** CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12):3914-3919.
- (51) **Jacobs RF, Sowell MK, Moss MM, Fiser DH.** Septic shock in children: bacterial etiologies and temporal relationships. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9(3):196-200.
- (52) **Janjindamai W, Phetpaisal S.** Time to positivity of blood culture in newborn infants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37(1):171-176.
- (53) **Jardine L, Davies MW, Faoagali J.** Incubation time required for neonatal blood cultures to become positive. *J Paediatr Child Health* 2006; 42(12):797-802.
- (54) **Jawaheer G, Neal TJ, Shaw NJ.** Blood culture volume and detection of coagulase negative staphylococcal septicaemia in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 76(1):F57-58.
- (55) **Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG.** Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* 1957; 73(4):590-591.

- (56) **Jordan JA, Durso MB.** Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7):2574-2578.
- (57) **Jordan JA, Durso MB.** Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 2005; 7(5):575-581.
- (58) **Josefson P, Stralin K, Ohlin A, Ennefors T, Dragsten B, Andersson L, Fredlund H, Molling P, Olcen P.** Evaluation of a commercial multiplex PCR test (*SeptiFast*) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(9):1127-1134.
- (59) **Kaufman D, Fairchild KD.** Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(3):638-680.
- (60) **Kellogg JA, Ferrentino FL, Goodstein MH, Liss J, Shapiro SL, Bankert DA.** Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(4):381-385.
- (61) **Kellogg JA, Manzella JP, Bankert DA.** Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6):2181-2185.
- (62) **La Scola B, Raoult D.** Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009 ; 4(11):e8041.
- (63) **Labib AZ, Mahmoud AB, Eissa NAA, El Gendy FM, Soliman MA, Aly AA.** Early Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Molecular Approach and Detection of Diagnostic Markers Versus Conventional Blood Culture. *Intl J Microbiol Res* 2013;4(1):77-85.
- (64) **Lamoth F, Jaton K, Prod'hom G, Senn L, Bille J, Calandra T, Marchetti O.** Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10):3510-3516.
- (65) **Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1):159-174.
- (66) **Lefort A, Chartier L, Sendid B, Wolff M, Mainardi JL, Podglajen I, Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, French Mycosis Study Group.** Diagnosis, management and outcome of *Candida* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(4):E99-E109.

- (67) **Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld KP, Goglio A, Kost GJ, Louie RF, Raglio A, Regueiro BJ, Wissing H, Stuber F.** Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(12):3085-3090.
- (68) **Lehmann LE, Hauser S, Malinka T, Klaschik S, Weber SU, Schewe JC, Stuber F, Book M.** Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by *SeptiFast* real-time PCR. *PLoS One* 2011; 6(2):e17146.
- (69) **Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stuber F.** A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197(3):313-324.
- (70) **Lehmann LE, Hunfeld KP, Steinbrucker M, Brade V, Book M, Seifert H, Bingold T, Hoeft A, Stuber F.** Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36(1):49-56.
- (71) **Leitner E, Kessler HH, Spindelboeck W, Hoenigl M, Putz-Bankuti C, Stadlbauer-Kollner V, Krause R, Grisold AJ, Feierl G, Stauber RE.** Comparison of two molecular assays with conventional blood culture for diagnosis of sepsis. *J Microbiol Methods* 2013; 92(3):253-255.
- (72) **Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions Conference.** 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29(4):530-538.
- (73) **Lodes U, Bohmeier B, Lippert H, König B, Meyer F.** PCR-based rapid sepsis diagnosis effectively guides clinical treatment in patients with new onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397(3):447-455.
- (74) **Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H.** Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6):2240-2243.
- (75) **López Sastre JB, Coto Cotallo GD, Fernández Colomer B.** Neonatal sepsis of vertical transmission: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo". *J Perinat Med* 2000;28(4):309-315.
- (76) **López Sastre JB, Coto Cotallo D, Fernández Colomer B.** Neonatal sepsis of nosocomial origin: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo". *J Perinat Med* 2002; 30(2):149-157.

- (77) **López Sastre JB, Fernández Colomer B, Coto Cotallo GD, de la Rosa Fraile, M.** Sepsis en el período neonatal. *Evid Pediatr* 2008; 4:68-73.
- (78) **López Sastre JB, Pérez Solís D.** Definitions of neonatal sepsis: a long way to go. *An Pediatr (Barc)* 2006; 65(6):525-528.
- (79) **Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ.** Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008; 36(5):1487-1492.
- (80) **Loza E, Planes A, Creixems M.R.** Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. Hemocultivos. 2003; disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia3a.pdf>.
- (81) **Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella, D.** Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(6):2252-2258.
- (82) **Ma Y, Vilanova D, Atalar K, Delfour O, Edgeworth J, Ostermann M, Hernández Fuentes M, Razafimahatratra S, Michot B, Persing DH, Ziegler I, Toros B, Molling P, Olcen P, Lord GM.** Genome-Wide Sequencing of Cellular microRNAs Identifies a Combinatorial Expression Signature Diagnostic of Sepsis. *PLoS One* 2013; 8(10):e75918.
- (83) **Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F.** Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3159-3163.
- (84) **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(6):1292-1305.
- (85) **Makhoul IR, Smolkin T, Sujov P, Kassis I, Tamir A, Shalginov R, Sprecher H.** PCR-based diagnosis of neonatal staphylococcal bacteremias. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9):4823-4825.
- (86) **Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M.** The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*; 23(1):235-251.
- (87) **Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, Pizzorno B, Emrich T, Burioni R, Ciceri F, Clementi M.** Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 5):601-604.
- (88) **Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R.** The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979; 95(1):89-98.

- (89) **Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, Vesin A, Maurin M, Pavese P, Bulabois CE, Brion JP, Pelloux H, Timsit JF.** Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis. *J Infect* 2010; 61(4):335-342.
- (90) **Mauro MV, Cavalcanti P, Perugini D, Noto A, Sperli D, Giraldi C.** Diagnostic utility of LightCycler SeptiFast and procalcitonin assays in the diagnosis of bloodstream infection in immunocompromised patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(4):308-311.
- (91) **Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb CH, Elbaz W, McMullan R.** Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 3):296-303.
- (92) **Millar BC, Xu J, Moore JE.** Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1575-1580.
- (93) **Mirrett S, Weinstein MP, Reimer LG, Wilson ML, Reller LB.** Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9):3279-3281.
- (94) **Muhl H, Kochem AJ, Disque C, Sakka SG.** Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(1):41-49.
- (95) **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263-273.
- (96) **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC.** Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society of Clinical Microbiology. Ed. Washington. 2003.
- (97) **Mylotte JM, Tayara A.** Blood cultures: clinical aspects and controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(3):157-163.
- (98) **Nathan C.** Points of control in inflammation. *Nature* 2002 Dec 19-26;420(6917):846-852.
- (99) **Ng PC.** Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89(3):F229-235.

- (100) **Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, Wong RP, Cheung KL.** Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77(3):F221-227.
- (101) **Ng PC, Lam HS.** Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2006; 18(2):125-131.
- (102) **Ng PC, Li K, Wong RP, Chui K, Wong E, Li G, Fok TF.** Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88(3):F209-213.
- (103) **Palacios E, Rodríguez-Granjer J, Sampedro A, Martínez-Brocal A, de la Rosa-Fraile M.** Use of MPO chromogenic culture medium for routine processing of urine cultures. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(8):388-390.
- (104) **Palomares JC, Bernal S, Marín M, Holgado VP, Castro C, Morales WP, Martín E.** Molecular diagnosis of *Aspergillus fumigatus* endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70(4):534-537.
- (105) **Paolucci M, Capretti MG, Dal Monte P, Corvaglia L, Landini MP, Varani S, Pession A, Faldella G, Sambri V.** Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 4):533-534.
- (106) **Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, Montecarlo I, Pirro M, di Filippo F, Cistaro E, Bistoni F, Mannarino E.** Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol* 2012; 50(4):1285-1288.
- (107) **Pazzi D, Klein J, Baker C.** En: Remington JS, editor. 6th ed.: WB Saunders; Philadelphia. 2006. p. 248-95.
- (108) **Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM.** New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(12):751-60.
- (109) **Phillips SE, Bradley JS.** Bacteremia detected by lysis direct plating in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1990; 28(1):1-4.
- (110) **Pierrakos C, Vincent JL.** Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010;14(1):R15.
- (111) **Polin RA.** The "ins and outs" of neonatal sepsis. *J Pediatr* 2003; 143(1):3-4.

- (112) **Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P.** Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(2):109-114.
- (113) **Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA.** Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol* 2001; 125(2):258-265.
- (114) **Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C.** Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26(2):133-146.
- (115) **Rath PM, Saner F, Paul A, Lehmann N, Steinmann E, Buer J, Steinmann J.** Multiplex PCR for rapid and improved diagnosis of bloodstream infections in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2012; 50(6):2069-2071.
- (116) **Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martínez-Lamas L, Rodríguez-Calvino J, Aguilera A, Santos A, Gómez-Tato A, Álvarez-Escudero J.** Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PLoS One* 2010;5(10):e13387.
- (117) **Reier-Nilsen T, Farstad T, Nakstad B, Lauvrak V, Steinbakk M.** Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr* 2009;9:5.
- (118) **Rosa-Fraile M, Andreu A, Cacho J, López Sastre J, Davi E.** Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. Microbiología de la infección perinatal. 2002; disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia13.pdf>.
- (119) **Ruderman JW, Morgan MA, Klein AH.** Quantitative blood cultures in the diagnosis of sepsis in infants with umbilical and Broviac catheters. *J Pediatr* 1988; 112(5):748-751.
- (120) **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-491.
- (121) **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(1):18-22.
- (122) **Schabereiter-Gurtner C, Nehr M, Apfalter P, Makristathis A, Rotter ML, Hirschl AM.** Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. *J Appl Microbiol* 2008; 104(4):1228-1237.

- (123) **Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP.** Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr* 1996; 129(2):275-278.
- (124) **Serody JS, Berrey MM, Albritton K, O'Brien SM, Capel EP, Bigelow SH, Weber, DJ, Gabriel, Wiley JM, Schell MJ, Gilligan PH, Shea TC.** Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(5):533-538.
- (125) **Steinmann J, Buer J, Rath PM, Paul A, Saner F.** Invasive aspergillosis in two liver transplant recipients: diagnosis by SeptiFast. *Transpl Infect Dis* 2009; 11(2):175-178.
- (126) **Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK.** Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110(2 Pt 1):285-291.
- (127) **Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network.** Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics* 2011; 127(5):817-826.
- (128) **Tsalik EL, Jones D, Nicholson B, Waring L, Liesenfeld O, Park LP, Glickman SW, Caram LB, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Cairns CB, Rivers EP, Otero RM, Kingsmore SF, Lalani T, Fowler VG, Woods CW.** Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):26-33.
- (129) **van Vugt MJ, Kleijmeer MJ, Keler T, Zeelenberg I, van Dijk MA, Leusen JH, Geuze HJ, van de Winkel JG.** The FcγRIIIa (CD64) ligand binding chain triggers major histocompatibility complex class II antigen presentation independently of its associated Fcγ chain. *Blood* 1999; 94(2):808-817.
- (130) **Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, Nicoloso MS, Barbarotto E, Popa M, Stanciulea O, Fernández MH, Tulbure D, Bueso-Ramos CE, Negrini M, Calin GA.** MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* 2009; 4(10):e7405.
- (131) **Verani JR, McGee L, Schrag SJ.** Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59(RR-10):1-36.

(132) **Vince A, Lepej SZ, Barsic B, Dusek D, Mitrovic Z, Serventi-Seiwerth R, Labar B.** LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 10):1306-1307.

(133) **von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, Purr I, Cook G, Hoeft A, Glasmacher A, Stuber F.** Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; 47(8):2405-2410.

(134) **Vrioni G, Daniil I, Drogari-Apiranthitou M, Kimouli M, Papadopoulou M, Tsakris A.** Molecular diagnosis of polymicrobial newborn sepsis by multiplex real-time PCR using a small volume of blood sample. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 8):1177-1178.

(135) **Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, Rousset-Delvallez M, Durocher AV, Courcol RJ.** Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(6):774-779.

(136) **Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM.** Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(1):184-188.

(137) **Washington JA, 2nd, Ilstrup DM.** Blood cultures: issues and controversies. *Rev Infect Dis* 1986; 8(5):792-802.

(138) **Wayne PA.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, PA. NCCLS 2000; Document M100-S10.

(139) **Wayne PA.** Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standards M100-S18. CLSI USA, 2008.

(140) **Wellinghausen N, Kochem AJ, Disque C, Muhl H, Gebert S, Winter J, Matten J, Sakka SG.** Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9):2759-2765.

(141)a **Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L.** Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3147-3152.

- (142)b **Wellinghausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U.** Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48(4):229-241.
- (143) **Wenzel RP, Edmond MB.** Managing antibiotic resistance. *N Engl J Med* 2000; 343(26):1961-1963.
- (144) **Westh H, Lisby G, Breyse F, Boddington B, Chomarat M, Gant V, Goglio A, Raglio A, Schuster H, Stuber F, Wissing H, Hoeft A.** Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(6):544-551.
- (145) **White PL, Shetty A, Barnes RA.** Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol* 2003; 52(Pt 3):229-238.
- (146) **Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC.** Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28(9):1942-1946.
- (147) **Wiswell TE, Hachey WE.** Multiple site blood cultures in the initial evaluation for neonatal sepsis during the first week of life. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10(5):365-369.
- (148) **Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki M, Sugimoto H, Shimazu T, Tasaki O, Matsushima A, Ikeda Y, Okamoto S, Aikawa N, Hori S, Obara H, Ishizaka A, Hasegawa N, Takeda J, Kamihira S, Sugahara K, Asari S, Murata M, Kobayashi Y, Ginba H, Sumiyama Y, Kitajima M.** Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care* 2010; 14(4):R159.