



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

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

Eva Torres-Martos^{a,*}, Mercedes Pérez-Ruiz^b, Irene Pedrosa-Corral^b, Manuela Peña-Caballero^c, María Manuela Jiménez-Valera^d, María Dolores Pérez-Ramírez^b y José María Navarro-Marí^b

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

^c Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

^d Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 1 de junio de 2012

Aceptado el 17 de septiembre de 2012

On-line el 6 de noviembre de 2012

Palabras clave:

Reacción en cadena de la polimerasa universal

Sepsis neonatal

Septifast

R E S U M E N

Introducción: La sepsis neonatal es una importante causa de morbilidad y mortalidad. Un diagnóstico precoz y el inicio rápido del tratamiento son fundamentales en la evolución del recién nacido. El hemocultivo, considerado técnica de referencia para el diagnóstico de sepsis, presenta una baja sensibilidad en este grupo de pacientes. Se planteó evaluar la utilidad de la PCR múltiple LightCycler® SeptiFast (LC-SF) en el diagnóstico de la sepsis neonatal, comparándola con el hemocultivo tradicional.

Métodos: Se recogieron 42 muestras de sangre correspondientes a 35 recién nacidos con episodios febriles ingresados en la unidad de cuidados intensivos neonatal del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Por cada episodio febril se procesaron 2 muestras de sangre venosa periférica para la realización del ensayo LC-SF y del hemocultivo, respectivamente.

Resultados: La sensibilidad y la especificidad de LC-SF, comparada con el diagnóstico clínico de sepsis, fueron del 79 y del 87%, respectivamente. La tasa de hemocultivos contaminados fue del 16,7%, detectándose *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) y *Streptococcus* grupo *viridans*. En LC-SF la tasa de SCN contaminantes fue del 2,4%. La concordancia entre las 2 técnicas diagnósticas fue moderada (índice kappa: 0,369). La técnica LC-SF demostró una mayor concordancia con el diagnóstico clínico final (índice kappa: 0,729) que el hemocultivo (índice kappa: 0,238).

Conclusión: LC-SF podría ser una herramienta útil, empleada en paralelo con el hemocultivo en recién nacidos, al confirmar o descartar los casos que el hemocultivo no resuelve, además de disminuir el tiempo de obtención de resultado a 7 h.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in newborns and infants with clinical suspicion of sepsis

A B S T R A C T

Keywords:

Universal polymerase chain reaction

Neonatal sepsis

Septifast

Introduction: Neonatal sepsis is a significant cause of morbidity and mortality. Early diagnosis and prompt antimicrobial therapy are crucial for a favorable outcome of the newborn child. Blood culture, the current "gold standard" method for diagnosing bloodstream infections, has a low sensitivity in newborns. We evaluated the multiplex real-time PCR LightCycler® SeptiFast (LC-SF) for detection of bloodstream infections in newborns, compared with conventional blood culture.

Methods: A total of 42 blood samples were obtained from 35 subjects presenting with a febrile episode and hospitalized in neonatal intensive care unit at Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Two samples were collected during each febrile episode in order to carry out LC-SF assay and blood culture, respectively.

Results: Sensitivity and specificity of 79% and 87%, respectively, compared with clinical diagnosis, were obtained for LC-SF. Contamination rate of blood cultures was 16.7%, mainly due to coagulase-negative staphylococci (CoNS) and *viridans* groups of streptococci. Contamination rate of LC-SF by CoNS was 2.4%.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: etorresev@gmail.com (E. Torres-Martos).

Concordance between LC-SF and blood culture was moderate (kappa index: 0.369). LC-SF demonstrated a higher concordance (kappa index: 0.729) with the final clinical diagnosis than blood culture (kappa index: 0.238).

Conclusion: LC-SF assay could be a useful diagnostic tool, along with a conventional blood culture, in newborn, for confirming or ruling out those cases that blood culture could not determine, shortening the time to result to 7 hours.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Las infecciones son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el periodo neonatal, y en la mayoría de los casos prolongan la estancia hospitalaria en las unidades de cuidados intensivos neonatal (UCIN). Según los estudios del Grupo Castrillo, la incidencia en España de sepsis de transmisión vertical es de 2,5 por 1.000 recién nacidos (RN) vivos, y la de sepsis nosocomial del 2,1% de los ingresos en unidades neonatales, con una mortalidad del 8,7 y del 11,8%, respectivamente^{1,2}.

Un diagnóstico precoz y el inicio rápido del tratamiento son fundamentales en la evolución del RN. La obtención de este diagnóstico precoz sigue siendo un desafío, ya que la mayoría de síntomas y signos de infección neonatal son inespecíficos^{3,4}. Los marcadores biológicos como la proteína C reactiva, la procalcitonina o algunas interleucinas se pueden elevar durante las primeras horas de vida en neonatos no infectados⁵. El hemocultivo está considerado como la técnica de referencia para el diagnóstico de sepsis. Sin embargo, la necesidad de instaurar de forma precoz un tratamiento antibiótico, generalmente de amplio espectro, hace que el hemocultivo tenga un elevado porcentaje de falsos negativos, dado que en muchos casos la toma de muestra se realiza tras la instauración de la antibioterapia⁶⁻⁸. Otro factor importante es el volumen de sangre extraído en los RN, que suele ser significativamente inferior al obtenido en adultos (<1 ml frente a 10–30 ml). Todo esto, junto con el hecho de que las bacteriemias en RN son a menudo transitorias o intermitentes, limita mucho el valor del hemocultivo en el diagnóstico de sepsis en este grupo de pacientes⁹.

En la última década se han descrito distintas técnicas moleculares para la detección de ADN bacteriano y fúngico directamente de sangre¹⁰⁻¹³. El ensayo LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} (LC-SF; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple en tiempo real, para la detección de ADN bacteriano y fúngico (región ITS [*internal transcript spacer*], situada entre las secuencias ADN_r 16S–23S y ADN_r 18S–5,8S, respectivamente). Permite la identificación de 25 microorganismos en sangre humana, representando aproximadamente el 90% de los patógenos implicados en bacteriemia en la población adulta. El objetivo principal de este estudio es evaluar la utilidad de la técnica LC-SF en el diagnóstico de la sepsis neonatal, en comparación con el hemocultivo tradicional.

Métodos

Se recogieron un total de 42 muestras de sangre de otros tantos episodios febriles de 35 RN y lactantes ingresados en la UCIN del Hospital Universitario Virgen de las Nieves entre abril de 2007 y abril de 2009.

Se procesaron 2 muestras de sangre venosa periférica 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. Una muestra se inoculó en un tubo de hemograma con K-EDTA, para realización del ensayo LC-SF, y la otra, en frasco pediátrico para hemocultivo por el sistema automático Bactec-9240® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). LC-SF se llevó a cabo en

las 24 h siguientes a la recepción de la muestra. La sangre se conservó a 4 °C hasta la realización del ensayo. La extracción del ADN, la realización del ensayo LC-SF y la interpretación de los resultados de la PCR se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El tiempo mínimo necesario para la obtención de resultados tras el hemocultivo fue de 48 h. El método de extracción de ácido nucleico en el ensayo LC-SF recomendado por el fabricante fue la extracción manual, llevándose a cabo en aproximadamente 4 h. Esto hace un tiempo total de procesamiento de muestras hasta la obtención de resultados con la técnica LC-SF de 7 h.

El registro de datos y análisis de resultados se llevó a cabo usando PASW Statistics version 18.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). Se realizó análisis retrospectivo de los datos clínicos y de laboratorio junto con los resultados obtenidos por ambas técnicas microbiológicas.

El diagnóstico clínico final fue de sepsis clínica, sepsis probada o sepsis descartada. Se definió como sepsis clínica cuando se cumplían los criterios clínicos de mala perfusión, mala tolerancia oral, distrés respiratorio e hipotensión y/o los criterios analíticos de leucopenia o leucocitosis con desviación a la izquierda y proteína C reactiva elevada (> 1 mg/dl). La sepsis probada se definió como la presencia de sepsis clínica junto con el aislamiento del microorganismo en el hemocultivo. Se definió como sepsis descartada cuando solo se cumplía uno de los criterios clínicos y/o analíticos de sepsis clínica debido a otras causas, bien porque el hemocultivo se había realizado como control de tratamiento de un episodio previo o porque el paciente estaba afectado por otras patologías no infecciosas.

Se realizó estadística descriptiva de los datos clínicos y de laboratorio. Así mismo se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica LC-SF tomando como referencia el diagnóstico clínico final. Se determinó el índice kappa¹⁴ y el acuerdo porcentual para calcular el grado de concordancia entre las técnicas diagnósticas, así como el grado de concordancia entre cada técnica y el diagnóstico clínico final. Para cada parámetro estadístico analizado se calcularon los intervalos de confianza al 95% (IC95%).

Resultados

La población estaba constituida por pacientes con edades comprendidas entre 0 y 151 días, con una mediana de 8 días (desviación cuartílica: 6 días), de los cuales 13 eran mujeres (37,1%) y 22 varones (62,9%). La mediana del peso al nacer de los RN fue de 2.400 g (rango: 615–3.760 g; desviación cuartílica: 1.090 g), siendo el 54,3% (19/35) RN pretérmino y el 31,4% (11/35) RN de muy bajo peso (RNMBP) (< 1.500 g).

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 hemocultivo (sepsis probada).

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.

Tabla 1Resultados de las técnicas de hemocultivo y LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} en relación con el diagnóstico clínico final

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

Concordancia. 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.

HC: hemocultivo; LC-SF: LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}; SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativa; SGV: *Streptococcus* grupo *viridans*.

Tabla 2Concordancia entre el diagnóstico clínico y los resultados del ensayo LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} y del hemocultivo

	Sepsis descartada	Sepsis clínica/probada	Kappa (IC95%)	Acuerdo porcentual, % (IC95%)
<i>LC-SF</i>				
Negativo	20	4	0,729 (0,511-0,947)	86,84 (72,67-94,25)
Positivo	3	15		
<i>Hemocultivo</i>				
Negativo	16	9	0,238 (-0,067-0,543)	63,16 (47,28-76,62)
Positivo	7	10		

IC95%: intervalo de confianza al 95%; LC-SF: LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}.

El número de episodios positivos por el hemocultivo y el LC-SF fue de 17 y 18, respectivamente. Se obtuvieron 25 episodios negativos por hemocultivo y 24 por LC-SF.

En la **tabla 1** se muestran los resultados del hemocultivo y el LC-SF en relación con el diagnóstico clínico final, así como la concordancia y discordancia entre ambas técnicas.

Entre los 10 casos de sepsis probada, 8 fueron resultados positivos con identificación concordante entre ambas técnicas. En los 2 casos discordantes, se aisló *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCN) en el hemocultivo. En uno de estos casos, LC-SF detectó *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Se trataba de un paciente que también dio positivo a *P. aeruginosa* en otra muestra de sangre mediante LC-SF, con resultado negativo de hemocultivo y diagnóstico de sepsis clínica. A este paciente se le habían tomado otras tantas muestras coincidiendo con las 2 muestras de sangre, 3 aspirados endotraqueales y un líquido peritoneal, aislándose *P. aeruginosa* en un aspirado traqueal y en el líquido peritoneal. En el otro caso discordante, LC-SF detectó *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*); en este caso, el pediatra consideró sepsis tardía por SCN, a consecuencia de un cuadro febril con elevación de PCR.

LC-SF fue capaz de detectar un microorganismo en 5 de los 9 casos de sepsis clínica con hemocultivo negativo, 2 *P. aeruginosa* (una corresponde al caso descrito anteriormente), un *S. pneumoniae* y 2 SCN.

Entre los 23 episodios en los que la sepsis se consideró descartada, 16 dieron negativo el hemocultivo y 20 el ensayo LC-SF, lo que supone el 69,5 y el 87% de las sepsis descartadas, siendo concordante el resultado negativo en 15 casos. Los 7 casos de sepsis descartada con hemocultivo positivo correspondían a 6 SCN y un *Streptococcus* grupo *viridans*, por lo que se consideraron contaminaciones de la toma. SCN solo se detectó por LC-SF en uno de los casos de sepsis descartada. Por tanto, la tasa de contaminación por

SCN del hemocultivo y del LC-SF fue del 14,3 y del 2,4%, respectivamente. Además, LC-SF detectó *P. aeruginosa* en un caso y *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) en otro caso de sepsis descartada.

Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de la técnica LC-SF fueron de 79% (IC95%: 57-91%), 87% (IC95%: 68-95%), 83% (IC95%: 64-93%) y 83% (IC95%: 61-94%), respectivamente.

Al analizar la concordancia entre las 2 técnicas diagnósticas se obtuvieron 5 grupos de resultados: 8 casos positivos por ambas técnicas con identificación concordante, 4 casos positivos por ambas técnicas con identificación diferente, 6 casos con hemocultivo negativo y LC-SF positivo, 5 casos con hemocultivo positivo y LC-SF negativo y 19 casos negativos por ambas técnicas.

El estudio de concordancia entre las 2 técnicas diagnósticas 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%).

Asimismo, se determinó el grado de concordancia de cada técnica con el diagnóstico realizado por el pediatra. Se demostró una mayor concordancia del diagnóstico clínico con los resultados del LC-SF que con los del hemocultivo (**tabla 2**).

Discusión

La sepsis neonatal es una causa importante de morbilidad y mortalidad, fundamentalmente en RN pretérmino¹⁵. De todos los casos de sepsis en el RN, más del 25% afecta a RNMBP¹⁶. En nuestro estudio, teniendo en consideración los 35 RN, de 14 casos de sepsis clínica, 10 afectaron a RN pretérmino (71,4%) y 6 a RNMBP (42,8%).

La detección e identificación de microorganismos en sangre por técnicas moleculares se consiguió en un tiempo medio de 7 h, tiempo muy inferior a los del hemocultivo, de 48-72 h. No

obstante, el tiempo requerido para el procesamiento y realización de la técnica es superior para LC-SF. Recientemente se han publicado trabajos¹⁷ que han optimizado esta técnica con extracción automatizada, que reducen 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 automáticos de extracción reducen el tiempo total para obtener un resultado en 4 h, y minimizan el riesgo de contaminación.

En los episodios donde la sospecha clínica de sepsis fue confirmada con el aislamiento del microorganismo en el hemocultivo, LC-SF detectó 8 de los 10 casos. Estos microorganismos fueron *E. coli*, *E. cloacae*, *E. faecalis* y SCN. Esto muestra el valor de la técnica LC-SF en la identificación de enterobacterias y de *E. faecalis*, además de confirmar el papel patógeno de SCN en ciertos casos, dado que la interpretación del aislamiento a partir del hemocultivo con una sola toma (generalmente el tipo de muestra disponible en RN) suele generar controversia.

De los 2 episodios restantes con sepsis clínica, en uno de ellos LC-SF detectó *P. aeruginosa*, microorganismo que se aisló en otras muestras del mismo paciente. Por el contrario, en el hemocultivo se aisló SCN. *P. aeruginosa* es uno de los principales probables contaminantes generados en el flujo de trabajo en la realización de PCR universal¹⁸, y SCN forma parte de la microbiota epitelial y por tanto puede contaminar la sangre extraída. El hecho de que *P. aeruginosa* se detectara en otras muestras del paciente puede hacer suponer que una posible contaminación del hemocultivo con SCN impidiera la detección del otro patógeno en la sangre. Realmente es difícil determinar cuál es el microorganismo causante de sepsis en estos casos, ya que se dispone solo de una toma. Lo mismo pudo ocurrir en el caso discordante en que LC-SF detectó *S. pneumoniae* y el hemocultivo detectó SCN.

La determinación de la sensibilidad y especificidad del hemocultivo es difícil, ya que no existe una regla de oro independiente para compararla¹⁹. Por ello, aunque sigue considerándose la técnica de referencia para el diagnóstico de sepsis neonatal, tiene un valor muy limitado, debido al elevado número de falsos negativos y falsos positivos. En los RN es frecuente obtener hemocultivos negativos en presencia de fuertes indicios de sepsis clínica¹⁶. El factor más importante causante de esto es el volumen de sangre²⁰, que en este grupo de pacientes suele ser inferior a 0,5 ml²¹. Otras causas que pueden influir en estos falsos negativos son las bacteriemiás de bajo nivel (aquellas con una concentración de patógenos ≤ 10 UFC/ml en sangre), que se pueden presentar en el 68% de los casos de sepsis²², y el uso de antibióticos intraparto, que pueden estar presentes en la sangre del RN, lo que da lugar a falsos negativos del hemocultivo pero que no impiden el desarrollo de sepsis²³. En nuestro estudio, 5 de los 9 casos de sepsis clínica con hemocultivo negativo fueron positivos mediante LC-SF. Son varios los estudios realizados donde queda patente la mayor sensibilidad del LC-SF sobre el hemocultivo en distintos ámbitos clínicos, como son en las unidades de cuidados intensivos^{12,24–26}, en urgencias²⁷, pacientes con neutropenia febril²⁸, y especialmente pacientes en tratamiento antimicrobiano^{12,13,26}.

Por ello, la exactitud diagnóstica de la prueba LC-SF se determinó basándose en el diagnóstico clínico final del pediatra teniendo en cuenta datos clínicos, de laboratorio y microbiológicos, debido a la inferior sensibilidad del hemocultivo con respecto al LC-SF, tal y como queda reflejado en varios estudios^{11–13}.

Se consideraron contaminaciones por SCN los episodios en los que se aisló o detectó el microorganismo que fueron clasificados finalmente como sepsis descartada. Según esto, se demostró una tasa de contaminación del hemocultivo con SCN del 14,3% frente al 2,4% con LC-SF. Teniendo en cuenta que habitualmente solo vamos a disponer de una sola toma en RN, LC-SF probablemente es de mayor utilidad que el hemocultivo para descartar sepsis por SCN. Además, los patógenos importantes son detectados en las primeras

24 h de incubación del hemocultivo^{29,30}. Por tanto, se podría pensar que un tiempo de detección corto en el hemocultivo, junto con un LC-SF positivo a SCN u otro microorganismo potencial contaminante (como SGV), podría confirmar una sepsis por los mismos. La detección de *P. aeruginosa* mediante LC-SF en un caso de sepsis descartada con aislamiento de SCN en el hemocultivo podría deberse a contaminación asociada a la técnica molecular. Sin embargo, la detección de *C. parapsilosis* por LC-SF en el otro caso es difícil de interpretar. La revisión de la historia del paciente en donde se dio esta circunstancia no reflejó ningún dato adicional que permitiera interpretar el resultado del estudio microbiológico.

Un inconveniente de LC-SF para el manejo de la sepsis neonatal es que está diseñada para sepsis en adultos, y por tanto el espectro de microorganismos detectados no es el óptimo para RN. LC-SF no detecta de forma específica microorganismos comúnmente implicados en sepsis neonatal como *Streptococcus agalactiae* (aunque está incluido en *Streptococcus* spp. junto con *Streptococcus pyogenes*) y *Listeria monocytogenes*.

Los actuales métodos automáticos de extracción de ácidos nucleicos simplifican el método molecular, pero a pesar de esto, el tiempo requerido de procesamiento de la muestra es muy superior al necesario para procesar un hemocultivo. Por otra parte, las técnicas moleculares permiten obtener la identificación del microorganismo causal en un tiempo menor. Las técnicas moleculares tendrán realmente mayor difusión como método diagnóstico de sepsis cuando se consiga la automatización total del proceso.

Además, para el empleo de técnicas de PCR en el diagnóstico de sepsis neonatal se deben incluir dianas para detectar específicamente los patógenos más frecuentemente implicados en este grupo poblacional. No obstante, LC-SF podría confirmar o descartar sepsis clínica en determinados casos que el hemocultivo no resuelve.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Lopez Sastre JB, Coto Cotallo GD, Fernandez Colomer B. Neonatal sepsis of vertical transmission: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo". J Perinat Med. 2000;28:309–15.
- Lopez Sastre JB, Coto Cotallo D, Fernandez Colomer B. Neonatal sepsis of nosocomial origin: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo". J Perinat Med. 2002;30:149–57.
- Da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. Pediatr Infect Dis J. 1995;14:362–6.
- Malik A, Hui CP, Pennie RA, Kirpalani H. Beyond the complete blood cell count and C-reactive protein: a systematic review of modern diagnostic tests for neonatal sepsis. Arch Pediatr Adolesc Med. 2003;157:511–6.
- Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. 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;49:60–8.
- Fischer JE, Seifarth FG, Baenziger O, Fanconi S, Nadal D. Hindsight judgement on ambiguous episodes of suspected infection in critically ill child poor consensus amongst experts? Eur J Pediatr. 2003;162:840–3.
- Haque KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. Pediatr Crit Care Med. 2005;6 Suppl 3:S45–9.
- Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. J Pediatr. 1996;129:275–8.
- Polin RA. The "ins and outs" of neonatal sepsis. J Pediatr. 2003;143:3–4.
- 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;7:575–81.
- Westh H, Lisby G, Breyse F, Boddinhaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. Clin Microbiol Infect. 2009;15:544–51.
- Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, et al. 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;16:774–9.

13. Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, et al. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1285–8.
14. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159–74.
15. Pazzi D, Klein J, Baker C. En: Remington JS, editor. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6th ed. Philadelphia: PA: WB Saunders; 2006. p. 248–95.
16. Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:638–80.
17. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martinez-Lamas L, Rodriguez-Calvino J, Aguilera A, Santos A, et al. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PLoS One.* 2010;5:e13387.
18. 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;40:1575–80.
19. Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Intern Med.* 1987;106:246–53.
20. Hall MM, Ilstrup DM, Washington 2nd JA. Effect of volume of blood cultured on detection of bacteremia. *J Clin Microbiol.* 1976;3:643–5.
21. 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:F57–8.
22. 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;16:381–5.
23. López Sastre JB, Fernández Colomer B, Coto Cotallo GD, de la Rosa Fraile M. Sepsis en el período neonatal. *Evid Pediatr.* 2008;4:68–9.
24. Lehmann LE, Hunfeld KP, Steinbrucker M, Brade V, Book M, Seifert H, et al. Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010;36:49–56.
25. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki M, et al. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care.* 2010;14:R159.
26. 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;397:447–55.
27. 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;36:1487–92.
28. Lamothe F, Jaton K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, et al. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3510–6.
29. Jardine L, Davies MW, Faoagali J. Incubation time required for neonatal blood cultures to become positive. *J Paediatr Child Health.* 2006;42:797–802.
30. Janjindamai W, Phetpisal S. Time to positivity of blood culture in newborn infants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006;37:171–6.