

Sensibilidad y especificidad del frotis de «buffy coat» teñido con Gram en el diagnóstico de sepsis neonatal

(Sensitivity and specificity of smears of buffy coat stained with Gram in the diagnosis of neonatal sepsis)

Julio César Ballesteros Del Olmo,* Daniel Tena Reyes,** Guadalupe García Elorriaga,***
Antonio Vega García,**** María del Rocío Ramírez Ortiz,**** Justina Sosa Maldonado,*****
Carlos Tapia Rombo,***** Rosa María Mendoza Zanella*****

RESUMEN

Objetivo. Calcular la sensibilidad y especificidad de la tinción de Gram del frotis de leucocitos (buffy coat [BC]) y de otros exámenes de laboratorio, tomando como «estándar de oro» el resultado del hemocultivo.

Material y métodos. La validación de los resultados de los frotis del BC y de los exámenes de laboratorio se hizo en 38 neonatos en quienes se confirmó que padecían sepsis y en 10 neonatos en los que los resultados de laboratorio fueron negativos para sepsis.

Resultados. Entre los 38 niños con sepsis, la proteína C reactiva se encontró alta en 31 (81.5%) mientras la tinción del BC fue positiva en 29 (76.3%); la neutrofilia estuvo presente en 28 (73.6%) y la vacuolización de los neutrófilos en 22 (52.6%). La mayor sensibilidad correspondió a la proteína C reactiva (82%) seguida de los frotis de BC (76%) y el hemocultivo (73%); en todos estos exámenes la especificidad fue baja.

Conclusiones. La tinción con Gram de frotis de leucocitos del BC es un procedimiento recomendable en el diagnóstico de sepsis neonatal, por ser accesible, económico, sencillo y fácil en manos expertas.

Palabras clave: Sepsis neonatal, tinción de Gram, buffy coat, sensibilidad, especificidad.

SUMMARY

Objective. To calculate the sensibility and specificity of the smears of buffy coat (BC) stained with Gram and an from another laboratory exams for the diagnosis of neonatal sepsis, taking as «gold standard» the haemocultive.

Material and methods. The validation of the results of the BC smears the tint of the BC and of those of the exams of laboratory was done in 38 neonates where the diagnosis of sepsis was you confirmed and those of 10 neonates with negative laboratory exams for the diagnosis of sepsis.

Results. Among the 38 with sepsis, the protein C reactive was high in 31 (81.5%) and the smears of the BC were positives in 29 (76.3%); neutrophilia was found in 28 (73.6%) and the vacuolization of the neutrophiles in 22 (52.6%). The biggest sensibility was for protein C reactive protein (82%) followed by the smear of BC (76%) and the haemocultive (73%); although all of them had a low specificity.

Conclusions. The smear of the BC stained with Gram is an advisable technical procedure in the diagnosis of sepsis neonatal: it is accessible, economic, simple and easy in expert hands.

Key words: Sepsis neonatal, stain of Gram, buffy coat, sensitivity, specificity.

* Jefe del Servicio de Neonatología, Maestro en Ciencias (Epidemiología Clínica).

** Residente en Neonatología.

*** Doctora en Ciencias, Unidad de Investigación en Inmunología.

**** QBP Lab. Análisis Clínicos.

***** Maestra en Ciencias (Epidemiología Clínica).

***** Médico adscrito a Neonatología.

La fracción de células leucocitarias y plaquetas obtenida después de centrifugación de la sangre con anticoagulante en un tubo capilar de sedimentación, se conoce como «buffy coat» (BC) [color parecido a piel de ante]; es utilizado en estudios de DNA, en el diagnóstico de enfermedades como malaria y otras parasitosis, y se emplea en frotis del BC después de tñirlo con Gram, en la identificación de bacterias en enfermedades infecciosas. En cuanto a la sepsis neonatal, es un proceso infeccioso sistémico diseminado a varios órganos, que ocurre en niños menores de 28 días: en los tres primeros días se califica como sepsis temprana y es generalmente debido al contagio del niño poco antes de nacer o durante su paso por el canal del parto; suele ser un episodio rápidamente progresivo y letal que con frecuencia se manifiesta por infección pulmonar; en cambio, la sepsis tardía ocurre entre los tres y 28 días de su vida y es frecuente en los niños de países en desarrollo. En México, la frecuencia estimada es de 15 a 30 neonatos por 1,000 nacidos vivos; su letalidad varía entre 25 y 30%.¹⁻³

Las manifestaciones comúnmente observadas en este síndrome son: temperatura corporal $> 38.5^{\circ}$ ó $< 36^{\circ}$, frecuencia cardiaca en cifras extremas, taquicardia o bradicardia, presencia de taquipnea y la necesidad de apoyo ventilatorio; son éstos los principales signos de alarma que motivan al médico a tratar de confirmar la sepsis con exámenes de laboratorio para indicar tempranamente medicamentos antibacterianos, pues de su manejo depende la corrección de las alteraciones metabólicas y funcionales que ponen en peligro de muerte al neonato.

En estos niños con manifestaciones clínicas que hacen pensar en que la infección afecta dos o más órganos, la identificación de bacterias circulando en la sangre prueba el diagnóstico de sepsis, pero infortunadamente el resultado del hemocultivo se obtiene 40 a 72 horas después. Como alternativa a esta tardanza, el médico sustenta su juicio clínico en datos de laboratorio que permiten apoyar la posibilidad de la sepsis neonatal, particularmente aquellos que indican la respuesta inflamatoria sistémica del paciente como la cuenta leucocitaria y presencia significativa de neutrófilos inmaduros, la cuenta de plaquetas, el aumento en la velocidad de sedimentación globular, la cuantificación de la proteína C reactiva y la determinación de la interleucina 6 y procalcitonina.

En este sentido, en un reporte anterior⁴ se valoró la fuerza predictiva de 11 exámenes de laboratorio para el diagnóstico de sepsis; en esa ocasión, el examen que mostró tener mayor sensibilidad y especificidad fue la proteína C reactiva: con 71 y 36%, respectivamente, por arriba de la sensibilidad de la haptoglobina (64%) y de los otros indicadores. En esta ocasión, el objetivo del trabajo fue conocer la sensibilidad y especificidad

de varios de estos exámenes y contrastar los hallazgos con la tinción del frotis con BC tñido con Gram, que ha sido propuesto para el diagnóstico temprano de sepsis neonatal.¹⁹

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 48 neonatos con manifestaciones clínicas de sepsis; de éstos, en 38 los exámenes de laboratorio permitieron reafirmar el diagnóstico clínico de sepsis y en los otros 10 los resultados no permitieron sustentar este diagnóstico. Todos ingresaron al Servicio de Neonatología-UCIN entre mayo de 2005 y febrero de 2006, unos nacidos en el hospital y otros transferidos para su atención especializada de otras unidades del IMSS.

Para el diagnóstico de sepsis, además de las manifestaciones clínicas (*Figura 1*) se consideró como criterio de inclusión, que los niños no hubiesen recibido ningún antibiótico o de haberlo recibido, éste hubiese sido por menos de 48 horas, o si después de tres días de tratamiento con el antibiótico el niño no mostrase una respuesta favorable.

De los expedientes clínicos se obtuvo la siguiente información: sexo, estado nutricional, peso corporal, edad de ingreso a sala, lugar de procedencia, antibióticos empleados en el tratamiento, edad postnatal al diagnóstico de la septicemia y otras variables relacionadas con el embarazo de la madre y posibles infecciones en la etapa perinatal. A todos los niños se les sometió a las pruebas rutinarias de laboratorio para confirmar la sospecha de sepsis: biometría hemática, sedimentación globular, examen de orina, proteína C reactiva y como criterio de verdad para el diagnóstico los resultados de estudios bacteriológicos de sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR).

Además de los exámenes de laboratorio ya mencionados, se incluyó la tinción del BC con Gram. El procedimiento consiste en obtener el BC de una muestra de sangre con anticoagulante sometida a centrifugación a 3,000 revoluciones (por minuto) por cinco minutos, empleando un tubo de hematocrito (capilar) o de sedimentación globular. Con el BC se hicieron frotis tñidos con colorante azul de metileno (o naranja acridina) para identificar al microscopio la presencia de bacterias Gram positivas o negativas. El proceso, manejado por manos expertas, tiene una duración, desde la muestra de sangre a la lectura en el microscopio, de no más de una hora.

Con los datos, procesados en Excel, se calculó la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos (positivos o negativos) y la razón de probabilidad (RP) o verosimilitud, para conocer la validez de cada uno de los exámenes de laboratorio usados para el diagnóstico. Antes de

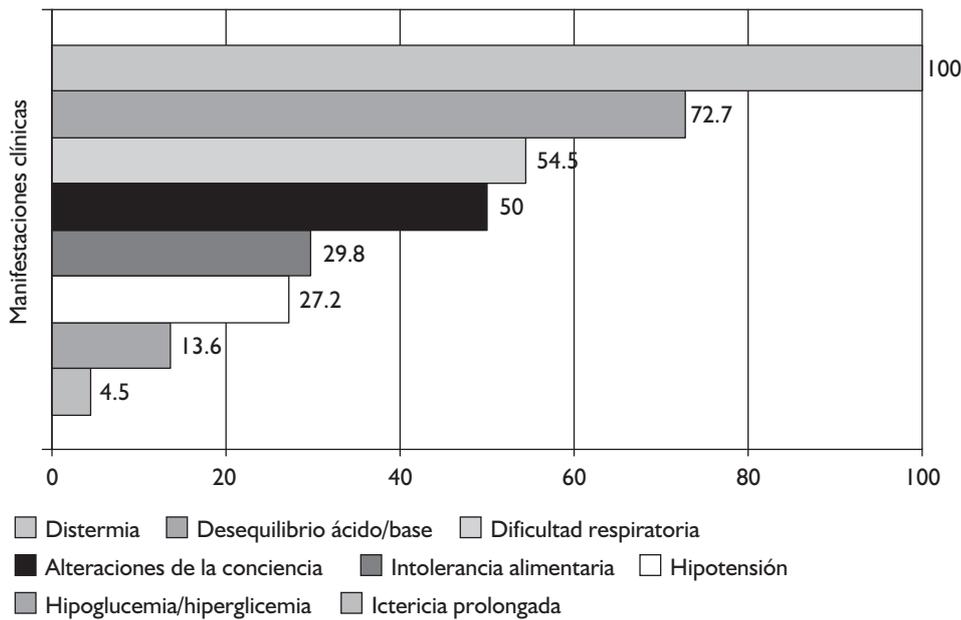


Figura 1. Manifestaciones clínicas de los neonatos con sepsis.

iniciar el proyecto fue sometido para dictamen al Comité Local de Investigación del Hospital General del Centro Médico Nacional «La Raza».

RESULTADOS

Al momento de nacer 23 (60.5%) de los niños del grupo con sepsis confirmada tuvieron una calificación de APGAR normal, 19 (52.6%) precisaron de ventilación mecánica, a 3 (7.8%) se les aplicó surfactante y 18 (47.3%) requirieron las maniobras habituales al nacer. En los 10 niños del otro grupo sin datos de laboratorio que permitieran confirmar la sepsis el APGAR fue normal en ocho; cinco de los 10 requirieron ventilación mecánica, y a cinco se les administró surfactante; sólo tres recibieron las maniobras rutinarias postparto.

En el cuadro 1 aparece la información acerca de la edad de gestación de los niños en estudio, con y sin el diagnóstico de sepsis confirmado por el laboratorio; se puede ver el promedio de peso al nacer en cada grupo y el tiempo transcurrido entre el rompimiento de las membranas y el parto. Como se aprecia, por el promedio de peso y edad de gestación, en ambos grupos predominó la prematuridad. Los niños con sepsis confirmada pesaron 2,133 g, mientras que el otro grupo pesó 2,015 g. También el lapso entre la ruptura de las membranas fue notablemente mayor en los niños con sepsis confirmada por el laboratorio: 17.6 h vs 5.1 h.

En cuanto a los resultados de los estudios de laboratorio, en el cuadro 2 se puede ver la frecuencia de niños en los que se encontraron datos anormales. En el grupo

Cuadro 1. Características de las madres y los 38 neonatos con datos clínicos de sepsis y resultados de exámenes de laboratorio positivos a sepsis (**Con sepsis**) y de 10 neonatos con signos clínicos de sepsis y estudio de laboratorio con datos no concluyentes (**Sin sepsis**).

Características	Con sepsis promedio (rango)	Sin sepsis promedio (rango)
Madres:		
Edad materna	25.2 (16-40)	24.9 (19-31)
Edad de gestación (semanas)	35.1 (27-41)	34 (27-40)
Número de gestaciones	2.2 (1-8)	2 (1-4)
Ruptura de membranas-parto (h)	17.6 (0-408)	5.1 (0-4)
Neonatos:		
Edad al ser hospitalizados*	7.3 (1-26)	11 (2-49)
Días de vida al diagnóstico	16.9 (1-57)	14 (3-62)
Peso al nacer (g)	2,249 (915-3,540)	2,075 (750-3,970)
Peso al ingreso (UCIN) (g)	2,133 (730-3,995)	2,015 (835-3,830)

* Neonatos referidos de otros hospitales para su atención en la UCIN.

con el diagnóstico definitivo de sepsis la proteína C reactiva se encontró anormalmente alta en 31 (81.5%), seguida del BC teñido con Gram positiva en 29

Cuadro 2. Anormalidades observadas en los exámenes de laboratorio de los 48 neonatos con y sin el diagnóstico de sepsis.

Exámenes de laboratorio	Con sepsis (N = 38) n (%)	Sin sepsis (N = 10) n (p*)
• Proteína C reactiva alta	31 (81.0)	1 (0.1)
• BC Gram positivo	29 (76.3)	1 (0.1)
• Neutrofilia	28 (73.6)	7 (0.7)
• Vacuolización de neutrófilos	22 (57.8)	--
• Trombocitopenia	20 (52.6)	1 (0.1)
• Hemocultivo positivo	20 (52.6)	--
• Sedimentación globular alta	15 (39.4)	10 (0.1)
• Neutrófilos en banda altos	14 (36.8)	--
• Razón: neutrófilos banda/total	14 (36.8)	1 (0.1)
• Líquido cefalorraquídeo anormal	21 (55.2)	2 (0.2)

* Proporción

(76.3%); la neutrofilia se observó en 28 (73.6%) y la vacuolización de los neutrófilos en 22 (52.6%). De los otros datos de laboratorio para apoyar el diagnóstico que se encontraron con menor frecuencia, 21 (55.2%) niños del grupo con sepsis tuvieron resultados anormales en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Se puede apreciar también, en el mismo cuadro, que únicamente dos de los 10 niños en que no se confirmó la sepsis, y en otros sólo por excepción, mostraron algún dato anormal en los exámenes de laboratorio.

En nueve de los 38 neonatos con manifestaciones clínicas de sepsis y tinción de Gram negativa para bacterias, la proteína C fue anormal en ocho y tuvieron neutrofilia, VSG alterada y bandemia; en tres se reportaron alteraciones morfológicas de los neutrófilos, cuatro mostraron plaquetopenia y el hemocultivo fue positivo en cinco: en tres el estudio bacteriológico identificó *Staphylococcus coagulasa* negativo, hubo uno con *Staphylococcus epidermidis* y otro con *Enterobacter cloacae*.

Al microscopio se observaron gérmenes en 29 de los 38 niños; en 19 de ellos se encontraron cocos Gram positivos: en 15 extracelulares y en 4 intracelulares. Los bacilos Gram positivos se observaron en tres y los Gram negativos en seis; en un niño se identificaron cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Es pertinente subrayar que tres de los pacientes con bacterias intracelulares

Cuadro 3. Bacterias identificadas con la tinción de Gram de frotis del «buffy coat» en los 38 neonatos con sepsis.

Tipo de bacterias	n = 38
Cocos Gram positivos	19
• Extracelulares	15
• Intracelulares	4
Bacilos Gram positivos	3
Bacilos Gram negativos	6
Cocos Gram + y Bacilos Gram -	1

tuvieron manifestaciones clínicas de extrema gravedad que los llevó a la muerte.

En el cuadro 3 aparecen los valores obtenidos al calcular la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos: positivos y negativos y la razón de verosimilitud, positiva y negativa; de los estudios de laboratorio que fueron usados para confirmar el diagnóstico de sepsis y la validación de la tinción del BC con Gram. Como se puede ver, la proteína C reactiva tuvo una sensibilidad de 82%, en tanto que la tinción con Gram del BC fue de 76% y del hemocultivo 73%; fueron estos los exámenes con mayor sensibilidad, aunque cabe mencionar que tanto éstos como los otros incluidos en el cuadro, tuvieron una especificidad baja.

DISCUSIÓN

Conforme el objetivo principal de la investigación de conocer la sensibilidad y especificidad de la tinción del BC en el diagnóstico de la sepsis neonatal, los hallazgos permiten afirmar que es un procedimiento de laboratorio accesible, sencillo, rápido y económico, que permite al clínico aceptar o rechazar la sospecha del diagnóstico de sepsis en los neonatos: dentro de un margen razonable de certeza, e iniciar el tratamiento precoz en espera de los resultados del hemocultivo.

La procedencia de los niños, unos nacidos en el hospital y otros referidos a éste para su atención en la UCIN, explica que su edad media sea de 17 días. Es conveniente señalar que poco más de la mitad eran neonatos con desnutrición intrauterina y que al ingresar a la UCIN todos tenían instalados accesos vasculares y la mayoría estaban con cánulas orotraqueales: en condiciones de alto riesgo de infección.

Para descartar la posibilidad de sepsis, ante las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, se solicitaron los exámenes rutinarios de laboratorio para descartar que estuviesen ante la circunstancia de una respuesta inflamatoria sistémica y evidencias de infección en varios órganos, pretendiendo así reforzar el diagnóstico de sepsis,

Cuadro 4. Valores estimados para las pruebas de diagnóstico de laboratorio que permiten identificar neonatos con sepsis.

Estudios de laboratorio	S	E	VPP	VPN	Razón de	
					VP	VN
Proteína C reactiva	82	90	97	56	8.16	0.20
Tinción del Gram (BC)	76	90	97	50	7.63	0.26
Hemocultivo positivo	66	80	93	38	3.29	0.43
Neutrofilia	73	80	80	23	1.04	0.90
Neutrófilos vacuolados*	58	10	10	40	0	0.42
LCR anormal	55	80	91	32	2.75	0.56

(S) Sensibilidad (VPP) Valores predictivos positivos

(E) Especificidad (VPN) Valores predictivos negativos

Razón de verosimilitud positiva (VP) = S/I-E

Razón de verosimilitud negativa (VN) = I-S/E

* Con granulaciones tóxicas

LCR Líquido cefalorraquídeo

mientras se obtenía el resultado del cultivo bacteriológico de la sangre o del LCR de los niños en cuestión: pues el hemocultivo se considera el «estándar de oro» en el diagnóstico.

Es por eso que, teóricamente, la sensibilidad y especificidad óptima es de 100%, ya que se espera que el hemocultivo sea positivo si hay bacterias circulando en la sangre de todos los niños con sepsis (sensibilidad óptima) y sería negativo en el 100% (especificidad óptima) en los que no tuviesen bacterias en la sangre. Sin embargo, en la práctica, a lo más que puede aspirar el clínico es a que la sensibilidad y especificidad de los estudios de diagnóstico se aproximen a 100%: como aconteció en el presente, donde la sensibilidad del hemocultivo fue de 72% y la especificidad de 80%.

Por otro lado, la razón de verosimilitud (RV) positiva fue de 3.9 y el valor predictivo positivo (VPP) fue de 93, datos que además confirman la sepsis. Cuando la prueba es positiva y más específica la prueba (en este caso, del «hemocultivo» [80%]) es mayor la certeza de que la enfermedad esté presente y que el 38% podrán no estar enfermos con la prueba negativa con una razón de verosimilitud de 3.3, como aconteció en este estudio en el cual el cociente del valor de la sensibilidad entre el de los falsos positivos indica que un paciente con sepsis tendrá 3.3 veces más cultivos positivos que un enfermo que no tiene esta enfermedad. En el presente estudio, el hemocultivo dio valores de la sensibilidad, especificidad, VPP y RV del hemocultivo suficientes para estimar una probabilidad de 3 a 1 de tener un hemocultivo positivo si se está enfermo, que no alienta mucho la certeza en el diagnóstico.⁶

Son pocos estudios los que han pretendido explicar la discrepancia entre la sensibilidad óptima esperada por el

clínico en su diagnóstico y la observada en los enfermos; en esta investigación fue de 73%. Uno de estos estudios tuvo como objetivo verificar si el volumen de sangre empleado en el hemocultivo era la razón de las discrepancias, y los investigadores encontraron que la sensibilidad y especificidad no varían significativamente cuando se emplean 3.0 ó 6.6 mL de sangre.⁷ Sin embargo, otros reportes mencionan que con un volumen de sangre de 6 mL aumenta la frecuencia porcentual de hemocultivos positivos, por lo que los autores piensan que una concentración baja de bacterias en la sangre dificulta la obtención de cultivos positivos.⁸ Por otro lado, en 6,911 neonatos atendidos en la UCIN de un hospital a los que se les solicitó hemocultivo, únicamente fue positivo en 1,696 (25%), razón por la cual los autores hacen énfasis en la importancia de que el clínico no deje a un lado las manifestaciones clínicas de los niños y los indicadores hematológicos compatibles con procesos infecciosos, esto aunado a los resultados de los exámenes de laboratorio, para intervenir oportunamente ante la sospecha fundada de sepsis neonatal.^{9,10}

La tinción de Gram del BC se ha sugerido como alternativa de diagnóstico rápida,¹¹ aunque algunos señalan divergencias al no haber concordancia entre la tinción de Gram positiva a bacterias y el resultado del hemocultivo.^{12,13} En nuestra experiencia cotidiana en el hospital, en niños con datos clínicos sugestivos de sepsis, hemos encontrado que la tinción del BC positiva para bacterias tiene relación con el incremento de la proteína C y la presencia de neutrofilia. Los resultados de esta investigación permiten reconocer que la sensibilidad de la proteína C reactiva es un dato de laboratorio útil para el diagnóstico por su mayor sensibilidad (82%) seguido de la tinción del «buffy coat» (76%); este último con la ventaja

de que los resultados se obtienen en menos de una hora. A pesar de estos comentarios halagadores, como no parece haber un solo indicador de laboratorio de certeza para el diagnóstico temprano de sepsis, los datos clínicos y la experiencia del pediatra son los que sirven de base para sospechar el diagnóstico y actuar con premura para confirmar el diagnóstico de esta enfermedad altamente letal, iniciando lo más pronto posible el tratamiento más adecuado.

Como conclusión de este trabajo, en los niños con manifestaciones clínicas compatibles con sepsis y un frotis del BC teñido con Gram es un procedimiento de diagnóstico rápido y sencillo, cuyo resultado, aunado al de la proteína C reactiva alta en un neonato, permite con mayor certidumbre sustentar el diagnóstico de sepsis y orientar al clínico hacia el posible germen causal (Gram positivo o negativo) implicado en la infección, para así seleccionar el antibiótico apropiado al paciente. Es además un indicador pronóstico del curso clínico que seguirá el enfermo, pues la presencia de gérmenes intracelulares parece predecir una evolución nada favorable para el paciente.

Referencias

1. Murguía M, Mancilla J. Programa de actualización continua en neonatología. Libro 7. Intersistemas editores. México 2004; 433-439, 467-480.
2. López H, Reynés J, Álvarez E, et al. Primer Consenso de sepsis neonatal (2003). *Acta Pediátrica Mexicana* 2003; 24(Supl. 1) S1-S11.
3. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, et al. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric Critical Care Medicine* 2005; 6(1): 1-8.
4. Ballesteros JC, Rodríguez C, Morales M, et al. Indicadores de infección temprana en septicemia neonatal. *Revista Mexicana de Pediatría* 1996; 63(1): 17-24.
5. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Microbiología médica*. 14^o ed. México: Manual Moderno. México. 1992: 636-637.
6. Fernández P, Pertegas S. Pruebas diagnósticas, sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124. www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp
7. Buttery JP. Blood cultures in newborns and children: optimizing an everyday test. *Arch Dis Child Fetal and Neonatal* edition 2002; 87(1): 25-28.
8. Scheloyka 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.
9. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996; 129(7): 63-71.
10. Sanghvi KP, Tudehope DI. Neonatal bacterial sepsis in a neonatal intensive care unit: a 5 year analysis. *Journal of Paediatrics and Child Health* 1996; 32(4): 333-338.
11. Mathur NB, Saxena LM, Sarkar P, Puri RK. Superiority of acridine orange-stained buffy coat smears for diagnosis of partially treated neonatal septicemia. *Acta Paediatr* 1993; 82(6-7): 533-535.
12. Hechavarría SJC, Armaignac FG, Suárez DR. Infección nosocomial en la Unidad de Cuidados Intensivos. *Medisan* 2001; 5(3): 12-17. http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol5_4_01/san02401.pdf
13. Ristuccia PA, Hoefner RA, Digamon-Beltrán M, Cunha BA. Detection of bacteremia by buffy coat smears. *Scand J Infect Dis* 1987; 19(2): 215-217.

Correspondencia:
Julio César Ballesteros del Olmo
Jefatura del Servicio de Neonatología
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital General Centro
Médico Nacional «La Raza».
Tel. 57821088 Ext. 23506
j_c_ballestdelolmo@hotmail.com
jc56bo@gmail.com
jc56bo@yahoo.com.mx