

Eficacia de PCR-RFLP contra hemocultivo para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana

López-Altamirano Danaé, Angulo-Castellanos Eusebio, Castellanos-González Carlos Humberto, Torres-Baranda José Rodrigo y García-Morales Elisa

Autor para correspondencia

García-Morales, Coordinadora de la Especialidad en Neonatología, Hospital Civil de Guadalajara "FAA", Calle Hospital No. 278, Colonia Centro Barranquitas, C.P. 44280, Guadalajara Jalisco, México. Tel. 39424400, extensión 48020.

Contacto al correo electrónico: isagamor@yahoo.com.mx

Palabras clave: Hemocultivo, Reacción en cadena de la polimerasa con amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo (RCP-RFLP), Recién nacidos, Sepsis neonatal temprana.

Keywords: blood culture, early neonatal sepsis, newborn, polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism.



Eficacia de PCR-RFLP contra hemocultivo para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana

López-Altamirano D^a; Angulo-Castellanos E^a; Castellanos-González CH^a; Torres-Baranda JR^b; García-Morales E^a

Resumen

Introducción

La sepsis neonatal temprana se define como la respuesta sistémica a una infección en los recién nacidos desde el nacimiento hasta las 72 horas de vida. En México se ha reportado una incidencia de 15-30/1000 RN y una letalidad de 25-30%. La reacción en cadena de la polimerasa con amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo cuenta con una sensibilidad de 100% y especificidad de 95.6% como método diagnóstico para sepsis con tan solo una gota de sangre versus el Hemocultivo (estándar de oro) el cual tiene una sensibilidad de 30-40% cuando se realiza con 1 ml. de sangre. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa podría representar una disminución en costos hospitalarios, detección de co-infecciones virales y requerir menor cantidad de muestra sanguínea para realizarse. Por esto, se realizó el presente estudio con el objetivo de evaluar la eficacia de la PCR-RFLP contra el hemocultivo para diagnóstico de Sepsis Neonatal Temprana en recién nacidos.

Material y Métodos

Se trata de un estudio prospectivo, observacional de prueba diagnóstica realizado en el Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde en el periodo de enero a diciembre de 2015. Se calculó una muestra de 30 recién nacidos para tener un poder estadístico de 80% (n=30). Se incluyeron pacientes de ambos géneros de 0-72hrs de vida con factores de riesgo para sepsis; se excluyeron a aquellos pacientes con antecedente de uso previo de antibióticos y/o transfusión de hemoderivados. Se realizó muestreo aleatorio con análisis utilizando el software SPSS Statistics.

Resultados

De la población estudiada, la mitad fueron femeninos. 15 pacientes fueron prematuros, 14 fueron recién nacidos de término y 1 pos-término. La edad promedio fue de 36 semanas de edad gestacional (28-42.1). Se tuvieron 3 hemocultivos positivos, de estos, 1 paciente presentó concomitantemente elevación de reactantes de fase aguda y los otros 2 sólo presentaron clínica compatible. Con esto, se tuvo una sensibilidad del 100%, especificidad de 93% y valor predictivo negativo de 100%; comparado con sólo 1 caso positivo con la técnica de PCR teniendo una sensibilidad de 33%, especificidad de 100% y VPN de 93%.

Discusión y Conclusiones

En este estudio se encontraron 3 casos de sepsis por hemocultivo y 6 casos diagnosticados por cuadro clínico. La baja sensibilidad para PCR en este estudio pudiera vincularse al uso de antibióticos en 20 madres en el periodo ante parto y al número pequeño de muestra. La PCR-RFLP no es más efectiva que hemocultivo como prueba diagnóstica para sepsis neonatal temprana; pero si útil como prueba de tamizaje.

Palabras clave: Hemocultivo, Reacción en cadena de la polimerasa con amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo (RCP-RFLP), Recién nacidos, Sepsis neonatal temprana.

a. PNPC CONACYT Neonatología Antiguo Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde", Guadalajara Jalisco, México.
b. Biología Molecular, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jalisco, México

Autor para correspondencia:
Elisa García Morales, Coordinadora de la Especialidad en Neonatología, Hospital Civil de Guadalajara "FAA", Calle Hospital No. 278, Colonia Centro Barranquitas, C.P. 44280, Guadalajara Jalisco, México. Tel. 39424400, extensión 48020;
Contacto al correo electrónico isagamor@yahoo.com.mx

Blood cultures against PCR-RFLP for early neonatal sepsis diagnosis

Abstract

Introduction.

Early neonatal sepsis is defined as a systemic response to a documented infection in newborns from birth and up to the first 72 hours of life. In Mexico the reported incidence is of 15-30/ 1000 newborns, with 25-30% lethality. Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism has 100% sensitivity and 95.6% specificity for the diagnosis of sepsis and using only one drop of blood. On the other hand, blood cultures have a sensitivity of 30-40% for 1ml of blood. The routine use of this test could lower hospitalization costs, detect coexisting viral infection and reduce the amount of sample needed. This is enough to compare the efficacy of RCP-RFLP with blood cultures for the diagnosis of early neonatal sepsis. Due to this, the present study was meant to evaluate the efficacy of PCR-RFLP compared to blood culture to diagnose early neonatal sepsis in newborns.

Material and Methods.

This is a prospective study for a diagnostic test at the Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde from January to December 2015. A sample of 30 newborns was calculated to have a statistical power of 80%. Patients of both genders with 0-72 hrs of life with risk factors for sepsis were included; we excluded patients with previous history of antibiotic use and / or transfusion of blood products. We performed an analysis using the SPSS Statistics software.

Results.

Of the population studied, half were female. 15 patients were preterm, 14 were term newborns and 1 post-term. The mean age was 36 weeks of gestational age (28-42.1). There were 3 positive blood cultures, of these, 1 patient presented concomitant elevation of acute phase reactants and the other 2 only presented compatible clinical scenario. With this, blood culture had a sensitivity of 100%, specificity of 93% and a negative predictive value of 100%; compared to only 1 positive case with the PCR technique having a sensitivity of 33%, specificity of 100% and NPV of 93%.

Discussion.

In this study we found three sepsis cases using blood culture with a predominance of female patients, and six more using clinical manifestations. The low sensibility of PCR in this study could be associated to the use of antibiotics in 20 mothers before birth and the size of the sample. PCR-RFLP is no more effective than blood cultures as a diagnostic test for early neonatal sepsis. On the other hand it is helpful as a sieving tool.

Key Words: blood culture, early neonatal sepsis, newborn, polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism.

Introducción

Las enfermedades infecciosas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el período neonatal. En México nacen cada año alrededor de 2 300,000 niños, presentando una incidencia de sepsis neonatal que oscila de 15 a 30/1000 RN la cual tiene una letalidad de 25-30%. La sepsis neonatal temprana es considerada como una de las condiciones que amenazan de este período de la vida. La sospecha de sepsis neonatal se fundamenta en una serie de factores de riesgo y de parámetros clínicos y analíticos inespecíficos, por lo que en muchas ocasiones resulta difícil valorar cuándo es conveniente iniciar un tratamiento antibiótico.¹ Por otro lado, el diagnóstico de confirmación depende de los resultados de los hemocultivos, que en el período neonatal presentan menor rentabilidad debido a que el volumen de extracción es, muchas veces, insuficiente para detectar bacteriemias, ya que en algunos casos estas bacteriemias son intermitentes. De ahí la importancia de disponer de una prueba que nos permita predecir la probabilidad de infección para de esta manera apoyar el diagnóstico de sepsis.² Por lo tanto, la identificación

de herramientas para la detección rápida de sepsis temprana es un objetivo de gran relevancia en la medicina perinatal, ya que un diagnóstico precoz y exacto conduce a un tratamiento adecuado, mejorando así potencialmente el pronóstico final de estos pacientes; razón suficiente para la realización de este proyecto de investigación.

Consideraciones sobre sepsis neonatal

En relación al mecanismo fisiopatogénico de la sepsis neonatal, se pueden diferenciar dos grandes cuadros de sepsis en la época neonatal: La sepsis neonatal temprana y la sepsis neonatal tardía.³

Sepsis neonatal temprana: La sepsis neonatal temprana o de "transmisión vertical" que es la variable central de este estudio, se presenta generalmente como una enfermedad fulminante y multi-sistémica durante las primeras 72 horas de vida por transmisión vertical, ya sea por gérmenes localizados en el canal genital materno que contaminan al feto por vía ascendente, progresando por el canal del parto hasta alcanzar

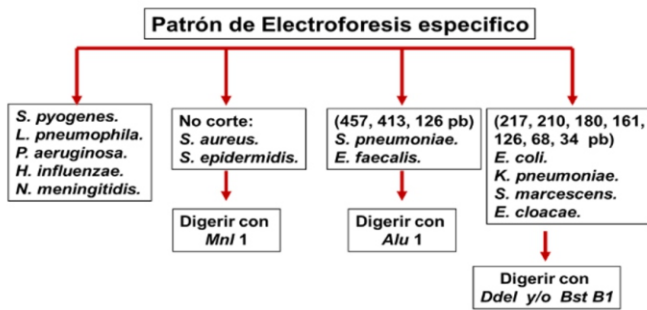


Figura 1. Especies de microorganismos detectados por PCR-RFLP.

el líquido amniótico; o por contacto directo del feto con secreciones contaminadas al pasar por el canal del parto. Por este motivo debe considerarse la posibilidad de sepsis siempre que se obtenga un cultivo positivo por bacterias patógenas en exudado de canal vaginal en el transcurso de las dos semanas anteriores al parto, ya que hay una creciente evidencia de que la infección comienza en el útero en un número significativo de recién nacidos con sepsis temprana.⁴

Diagnóstico de sepsis neonatal temprana: El diagnóstico debe plantearse ante un recién nacido con clínica compatible, siendo de gran ayuda la valoración de la presencia de factores de riesgo materno, teniendo estos neonatos habitualmente uno o más factores de riesgo identificables. Antes de iniciar una terapia antibiótica empírica es necesario realizar un chequeo infeccioso previo dirigido a precisar el diagnóstico etiológico y hacia la orientación de un cuadro séptico.

Dificultad en el diagnóstico: Cuando el agente etiológico causante de la sepsis invade en organismo del recién nacido, su sistema inmunológico se activa para defenderse. Pero, en ocasiones, puede ser fisiológicamente inmaduro en el recién nacido prematuro, cuyo déficit más importante en el mecanismo de defensa fagocitario del neonato es el fracaso en la producción y quimiotaxis de neutrófilos al sitio de infección. Los recién nacidos tienen una capacidad muy restringida de acelerar la producción de neutrófilos en reacción a un proceso infeccioso, y el depósito en la médula ósea es muy limitado, por lo que se agota rápidamente. Además, ninguna prueba, ya sea clínica o de laboratorio, tiene suficiente valor predictivo para confirmar o descartar sepsis, por lo cual para mejorar la capacidad diagnóstica se han combinado diferentes pruebas, especialmente las de laboratorio. La sepsis neonatal es una enfermedad de alta severidad, por lo que se requieren exámenes complementarios que no fallen en ningún caso (es decir, con alta sensibilidad) y

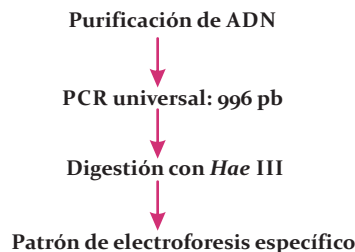


Figura 2. Diagnóstico molecular de bacterias Gram +/- y levaduras. ADN, ácido desoxirribonucleico; PCR, reacción en cadena de polimerasas; pb, pares de bases.

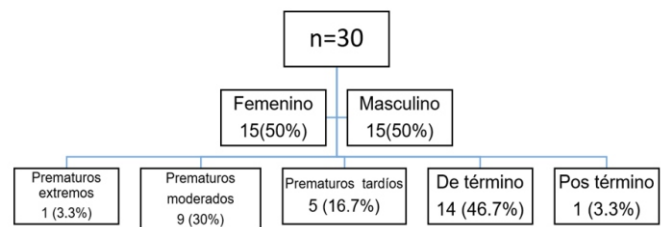


Figura 3. Edad gestacional de los recién nacidos en nuestro estudio.

que detecten la sepsis cuando la enfermedad está presente (esto es, con alto valor predictivo positivo). El objetivo que tiene una prueba de laboratorio es ayudar a decidir al personal médico el inicio o no del tratamiento antibiótico. Por lo tanto, el examen ideal cumpliría las siguientes características: Comparable entre diferentes unidades de terapia neonatales, Utilidad de diagnósticas: sensibilidad (cerca del 100%), especificidad (85%), valor predictivo positivo (VPP) (85%), valor predictivo negativo (VPN) (aproximado al 100%), detectar la infección en una etapa temprana, diferenciar entre los diferentes tipos de patógenos (virales v bacterianos), utilidad como guías de uso de antibióticos (tipo y duración), supervisar el progreso del tratamiento, utilidad pronóstica. En cuanto a las características del laboratorio lo ideal para establecer el diagnóstico de sepsis: Compuesto estable, escala de tiempo adecuada para la toma de muestras (aumento sostenido o disminución del nivel durante al menos 48h después del inicio de las manifestaciones), medición cuantitativa, pequeño volumen de muestra, método fácil de la medida, rápido tiempo de traslado al laboratorio, resultados comparables entre laboratorios y bajo costo. Teniendo en cuenta que los resultados bacteriológicos tardan varios días en ofrecer resultados fiables, es necesario disponer de algún procedimiento de diagnóstico rápido que oriente la instauración o no de tratamiento antibiótico al recién nacido. Para descartar sepsis con un valor predictivo positivo (VPP) del 100% se suele evaluar a los neonatos con riesgo de infección, con una muestra obtenida al menos en las 12-24 horas después del nacimiento, usando la combinación de recuento leucocitario y la determinación de PCR.

Marcadores hematológicos

Respecto a los parámetros hematológicos, tienen una baja especificidad. La medición de los leucocitos en sangre periférica y su estudio diferencial probablemente, es la prueba inespecífica más rápida y útil de obtener. Hace varias décadas se demostró que el recuento leucocitario podía ser normal en la tercera parte de los recién nacidos infectados.⁵

Numerosos estudios demuestran que no se puede considerar un solo hallazgo aislado para el diagnóstico de sepsis, incluso se han dado puntajes a cada una de las variables estudiadas. El conteo de leucocitos y neutrófilos absolutos, la relación de neutrófilos inmaduros/maduros (índice de Schilling), cambios en la morfología o degeneración como la vacuolización, bacterias intracelulares, granulaciones tóxicas, deben ser estudiados y analizados individualmente y en conjunto. En estos análisis la sensibilidad es variable, reportándose datos desde 40-90%, sin que se relacione

Tabla 1. Edad gestacional y su relación con hemocultivo y PCR

Edad gestacional	n=30	Hemocultivo		PCR	
		+	-	+	-
Prematuro extremo	1 (28)	0	1	0	1
Prematuro moderado	9 (28.6-33.5)	1	8	1	8
Prematuro tardío	5 (34.2-36)	0	5	0	5
De término	14 (37-40.4)	2	12	0	14
Pos término	1 (3.3)	0	1	0	1

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

directamente el tipo de germen, lo que, entre otros factores, podría afectar los resultados.⁶

Debido a esta variabilidad en la sensibilidad de los parámetros hematológicos de forma individual, diversos autores han propuesto estrategias en la obtención de ratios o scores que combinan algunos de estos parámetros.

Estos datos sugieren que recuentos hematológicos tempranos aportan poca información diagnóstica en la evaluación de cualquier neonato con o sin sintomatología con una posible infección bacteriana. La presencia de neutropenia se asocia a un mal pronóstico, ya que generalmente indica disminución de la reserva de neutrófilos en médula ósea, disturbios en la liberación de éstos a la periferia e ineficacia de las células madre para responder a las demandas.⁷

Además, se pueden utilizar otros parámetros para valorar el tipo de infección bacteriana como: El índice de granulocitos inmaduros considerándose normal un valor mayor a 0,2 (o superior a 0,3 en las primeras 24 horas de vida del neonato); la Proteína C Reactiva, los niveles normales de esta proteína se incrementan en 6 horas y llegan al máximo en 48 horas.⁸ Su vida media es constante y, por lo tanto, su nivel está determinado principalmente por la tasa de producción y, por tanto, por la gravedad de la causa. En la actualidad, es una de las pruebas más utilizadas tanto para establecer el diagnóstico

Tabla 2. Características de factores de riesgo maternos

Variable	n=30	Hemocultivo		PCR	
		+	-	+	-
Taquicardia materna (>100 lpm)	2	0	2	0	2
Taquicardia fetal (>160 lpm)	1	0	1	0	1
Leucocitosis materna (>15x10 ⁹ /L)	1	0	1	0	1
Hipersensibilidad uterina	1	0	1	0	1
Leucorrea vaginal	2	1	1	0	2
Ruptura de membranas >15 hrs.	7	1	6	1	6

Variables cualitativas están expresadas en frecuencias.

para monitorizar la respuesta al tratamiento. Es una prueba de laboratorio que presenta gran sensibilidad, pero baja especificidad.⁹ La Procalcitonina (PCT) es una pro-hormona que se produce en las células C de la glándula tiroides. Es la precursora de la Calcitonina y, en situaciones normales en el hombre, los niveles sistémicos son indetectables o menores a 0,1 ng/mL. Tiene una vida media en suero de 25 a 30 horas, y es importante tener en cuenta la elevación fisiológica de este marcador en las primeras 48 horas de vida, por lo que puede complicarse la interpretación de los resultados durante este período.

Durante la inflamación de causa infecciosa, la PCT se eleva más rápidamente que la PCR, lo que la convierte en un predictor precoz de gravedad y mortalidad, sin embargo, esto no se puede aplicar a neonatos ya que tienen un pico fisiológico en las primeras 48 horas, motivo por el cual la especificidad no supera el 65%, teniendo además un pobre valor predictivo positivo.¹⁰ Es importante mencionar que la elevación de PCT se presenta en infecciones de origen bacteriano, micótico o parasitario, mientras que los procesos provocados por virus no presentan elevación de la PCT.¹¹ En diferentes estudios se ha visto que los niveles séricos de PCT se correlacionan con la severidad de la invasión microbiana y disminuyen rápidamente después del tratamiento antibiótico adecuado. En uno de éstos, los autores concluyen que las concentraciones de PCT y PCR en neonatos con sepsis neonatal precoz se encuentran aumentadas, siendo este incremento mayor en los niveles de PCT;¹² Interleucinas: En la última década se ha publicado un gran número de trabajos que han estudiado distintas citoquinas. Las más estudiadas han sido las interleucinas: 1, 6, 8 y el factor de necrosis tumoral (TNF α). También se han utilizado como marcadores de infección los receptores solubles de las citoquinas, que se elevan en sangre en procesos infecciosos; siendo el más estudiado el receptor soluble de la IL-2 (IL-2Rs).¹³

Hemocultivos

Las bacterias causantes de la infección en la sepsis neonatal se identifican mediante el hemocultivo, considerado como estándar de oro, que permite además determinar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos. El cultivo bacteriológico es el método más utilizado y valioso en la clínica, sin embargo, como prueba de diagnóstico en muestras de sangre neonatal tiene baja sensibilidad y especificidad para la detección de los agentes causales de la infección. Este hecho se relaciona con el poco volumen (inferior a 1 mL) de sangre que se puede o debe extraer al recién nacido. Además, una limitante adicional del hemocultivo es que tarda como mínimo 48 horas para obtener un resultado, y no logra analizar el contenido total de las bacterias que pudieran ser de interés para identificar la etiología de la enfermedad.

Las técnicas de cultivo automatizadas o semi-automatizadas que se basan en la detección de CO₂ producido por el metabolismo bacteriano, permiten informar la positividad de los hemocultivos en menos de 24 horas. A pesar de esto, la positividad de los hemocultivos en sepsis neonatal no supera el 80-85% en los mejores centros, por lo que un resultado negativo en presencia de factores de riesgo y

clínica compatible no descarta la infección. Por estas razones se requieren metodologías que permitan análisis rápidos, precisos y de alta sensibilidad que ayuden al cuerpo médico responsable, lograr una evaluación oportuna y un mejor tratamiento de casos clínicos y subclínicos de sepsis neonatal.

Biología molecular (Reacción en cadena de la polimerasa PCR)

La amplificación de segmentos definidos del ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comenzó en la investigación básica, pero su aplicación se ha incorporado en los laboratorios de microbiología clínica y de la salud, en los que se han logrado importantes avances para identificar la etiología de los procesos infecciosos. A diferencia del cultivo bacteriológico, la PCR requiere mínimas concentraciones del DNA (pg/mL).

Recientemente se han sintetizado iniciadores bacterianos para la amplificación de la región pequeña del gen 16S ribosomal (16S rDNA). El 16S rDNA está presente en todas las bacterias, es altamente conservado y tiene secuencias infinitas, lo que permite diferenciarlas entre cada especie de bacteria. El uso del 16S rDNA permite explorar en un solo paso a todas las bacterias contenidas en diversas muestras biológicas, lo que la convierte en un buen marcador respecto a otros genes bacterianos.¹⁴

Aunque la PCR ofrece ventajas sobre el cultivo bacteriológico, tiene una serie de limitaciones. Primero, se requiere que el DNA blanco sea de buena calidad sin fragmentaciones y las muestras biológicas contienen enzimas como endonucleasas y DNAsas, las cuales degradan el DNA. En segundo lugar, las muestras de sangre contienen diferentes componentes estructurales como anillos de porfirinas que interfieren con la actividad de la TaqDNApolimerasa, lo que reduce la eficiencia de la amplificación y puede dar falsos negativos. Y, en tercer lugar, en la obtención de la muestra y en la extracción del DNA, puede haber contaminación con otras bacterias que no necesariamente corresponden a las de la muestra de origen.

En los últimos años, se han realizado estudios que evalúan una nueva técnica de detección de microorganismos mediante PCR a tiempo real como una herramienta más en el diagnóstico microbiológico de sepsis (reacción en cadena de la polimerasa con amplificación de fragmentos de amplio polimorfismo -PCR-RFLP) es una técnica por PCR a tiempo real capaz de detectar 25 microorganismos, siendo éstos los más frecuentemente encontrados en las infecciones sanguíneas.

Mientras que los métodos microbiológicos detectan sólo microorganismos viables, esta prueba detecta tanto los viables como los no viables además del ADN no microbiano. Las cepas objeto de detección se indican en la Figura 1.

Algunos de estos estudios, como el realizado por Lehmann y cols.¹⁵ en un estudio retrospectivo observacional de 436 pacientes con sepsis, muestran una coincidencia entre los microorganismos aislados mediante el hemocultivo y esta técnica de un 38% en el caso de microorganismos grampositivos, un 26% para gramnegativos y un 6% para hongos. Aunque también se dieron casos en los que sólo daba positivo el hemocultivo, o casos en los que sólo fueron

Tabla 3. Marcadores hematológicos para sepsis

Variable	x (rango)	n=30	Hemocultivo		PCR	
			+	-	+	-
Neutrófilos	9030 (430-22840)	3	0	3	0	3
Leucocitos	13666 (4800-28900)	1	0	1	0	1
Índice de Schilling	0.03 (0.03-0.25)	3	2	1	0	3
Proteína C reactiva	6.81 (0-47)	7	0	7	0	7

Variables cualitativas están expresadas en frecuencias.

identificados microorganismos mediante la técnica de PCR. Jordan y cols. realizaron un estudio que incluyó 548 recién nacidos comparando PCR con hemocultivos, encontrando alto valor predictivo negativo y positivo, así como una alta sensibilidad y especificidad. Los resultados de PCR antes de 18 horas del nacimiento podrían ayudar a descartar la sepsis neonatal temprana, lo que provocaría menor uso de antibióticos y disminuiría la estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN). Actualmente, su positividad se ha incorporado en la definición de sepsis probada. Su inconveniente es el alto coste para la aplicación de la prueba y la disponibilidad limitada en los laboratorios convencionales.¹⁶

Las enfermedades infecciosas son una importante causa de morbilidad y mortalidad en el período neonatal. El diagnóstico precoz y adecuado, que conduzca a un tratamiento apropiado podría disminuir e incluso evitar la mortalidad de estos pacientes. Por ello, cualquier herramienta que identifique de forma rápida una sepsis neonatal precoz es objeto de gran relevancia en la medicina perinatal. Existe una creciente evidencia de que la infección comienza en el útero en un gran número de neonatos con sepsis neonatal temprana. Muchos de ellos son asintomáticos en las primeras horas de vida, y se ha visto que las madres con colonización bacteriana y/u otros factores de riesgo infeccioso tienen mayor probabilidad de dar a luz niños con bacteriemia ya presente en el nacimiento.¹⁷

Como se ha mencionado, se han evaluado muchos parámetros biológicos o marcadores de sepsis en las últimas décadas, entre ellos distintos parámetros hematológicos, o proteínas como la PCR o la PCT, y algunas citoquinas. Sin embargo, a pesar de los numerosos tests disponibles en la actualidad, ninguno de ellos es absolutamente fiable, por lo que muchos Neonatólogos a menudo comienzan el tratamiento antibiótico en neonatos con factores de riesgo infeccioso, exponiendo a muchos de estos pacientes a un tratamiento innecesario. Por todo esto, resulta de suma importancia la herramienta diagnóstica, ya que un diagnóstico precoz y preciso conduciría a un tratamiento adecuado, y evitaría tratamientos innecesarios a recién nacidos.

Tabla 4. Comparación entre características clínicas y de laboratorio con el HC

Variable	Negativos n=27	Positivos n=23	p
PCR	0 (0)	1 (33.3)	0.933
Neutrófilos	2 (7.4)	1 (33.3)	0.807
Índice de Schilling	3 (11.1)	0 (0)	0.807
Proteína C reactiva >10 mg/dl	7 (25)	0 (0)	0.582
Infección materna concomitante	3 (11.1)	1 (33.3)	0.253
Fiebre en el recién nacido	2 (7.4)	0 (0)	0.869
Hipomotilidad	0 (0)	1 (33.3)	0.067
Anuria	2 (7.4)	0 (0)	0.869
Acidosis	2 (7.4)	1 (33.3)	0.193
Apnea	3 (11.1)	1 (33.3)	0.253
Cianosis	3 (10.7)	1 (33.3)	0.253

Variables cualitativas están expresadas en frecuencias.

Material y Métodos

Se realizó un estudio prospectivo, observacional de prueba diagnóstica cuyo objetivo general fue evaluar la eficacia de la prueba PCR-RFLP contra el estándar de oro que es el Hemocultivo para diagnóstico de Sepsis Neonatal Temprana en recién nacidos. Algunos objetivos secundarios fueron: características epidemiológicas de los neonatos incluidos, frecuencia de sepsis neonatal temprana, determinación de agentes microbiológicos involucrados, descripción de parámetros fisiológicos y de laboratorio de los recién nacidos con riesgo de sepsis temprana neonatal. El tamaño de la muestra se calculó mediante StatCalc del programa estadístico Epi Info 7 año 2013 proporcionado por Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA. Método de Fleiss para estudios de cohorte con un Intervalo de Confianza (IC) de 95%, poder 80%: n= 30 pacientes. El muestreo fue aleatorio por números aleatorizados de acuerdo al programa Microsoft Excel 2010 para Windows 7. Se cubrieron ciertas especificaciones para la toma de la muestra como: cantidad 200-500 mL de sangre periférica arterial o venosa en tubos con anticoagulante, preservados 2-4 0C, transportados en un lapso no mayor a 6 horas. La técnica utilizada se observa en la figura 2. Los hemocultivos fueron obtenidos en base a recomendaciones especificadas a nivel internacional. Se incluyeron recién nacidos de ambos géneros, con edades de 0-72 horas de vida extrauterina, con factores de riesgo para sepsis (fiebre, criterios paraclínicos, madre con diagnósticos de corioamnionitis, cervicovaginitis y otra infección activa, madre con fiebre en el trabajo de parto) ingresados a las unidades de cuidados intensivos y/o intermedios del Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde de Enero a Diciembre del 2015. Se excluyeron recién nacidos mayores de 72 horas de vida extrauterina, tratados con antibióticos y/o

con antecedente de hemotransfusiones.

Resultados

Se estudiaron 30 recién nacidos de los cuales la edad gestacional promedio fue de 36 semanas de gestación; con 15 prematuros, 14 de término y 1 pos término. Las características generales se observan en la figura 3 y en la Tabla 1.

En relación a las características clínicas y sociodemográficas de las madres de estos recién nacidos la media para la edad fue de 24.1 años (Rango de 16-41 años) donde el grupo más prevalente de edades fue el de 19 a 35 años con una frecuencia de 76.7%. La mayoría de las madres se encontraban viviendo en unión libre con una frecuencia de 73.3%. La escolaridad de las madres más frecuente fue nivel secundaria en 46% de ellas. En relación a frecuencia del uso de drogas solo el 6.7% ingería alcohol, mientras que ninguna de ellas consumió drogas ni tabaco; todas ellas con cultivos y PCR negativos. El promedio de asistencias a consulta de control prenatal fue de 4.6 consultas y consideraron su servicio como regular en el 63%.

La prevalencia de los factores de riesgo maternos fue la siguiente: Ruptura de membranas >18 horas 7 casos (23.3%) con un promedio de 30.7 horas (Tabla 4), taquicardia materna 2 casos (6.7%), leucorrea vaginal 2 casos (23.3%), taquicardia fetal 1 caso (3.3%), leucocitosis materna 1 caso (3.3%), hipersensibilidad uterina 1 caso (3.3%) (Tabla 2).

De los 30 recién nacidos en este estudio no hubo predominio de género, de los cuales 10 tuvieron marcadores hematológicos positivos para sepsis (5 hombres y 5 mujeres) y 6 tuvieron datos clínicos de sepsis (5 hombres y 1 mujer); 3 tuvieron índice de Schilling (formas inmaduras/neutrófilos) positivo, 7 tuvieron proteína C reactiva positiva; solo uno de los recién nacidos tuvo alteración en la cifra de leucocitos. (Tabla 3)

La tabla 4 muestra la comparación entre los pacientes que fueron positivos versus negativos a reacción en cadena de la polimerasa, no observándose ninguna diferencia significativa. Sin embargo se observa una mayor frecuencia de manifestaciones clínicas en el grupo de los pacientes negativos esto puede deberse al tamaño de muestra y a la poca prevalencia de la enfermedad.

El hemocultivo resultó positivo en 3 de los casos (10%) y tuvo una sensibilidad de 100%, especificidad de 93%, valor predictivo positivo de 33%, valor predictivo negativo 100%

La PCR resultó positiva en solo uno de los casos (3.3%) para *Staphylococcus lugdunensis*; el cribado para sepsis solo reportó neutropenia y además tuvo un hemocultivo positivo posterior a una semana. Esta prueba probó tener una sensibilidad del 33%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 93% (Tabla 5).

Discusión

Las infecciones en los recién nacidos son la causa más importante de hospitalización e incluso de mortalidad en la práctica neonatal. El reconocimiento y diagnóstico temprano de sepsis en los neonatos es difícil por lo que el inicio temprano del tratamiento para dichas infecciones es esencial. Por obvias razones hay una tendencia por sobre tratar a los

Tabla 4. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana

Sensibilidad	33%
Especificidad	100%
Valor predictivo positivo	100%
Valor predictivo negativo	93%

recién nacidos potencialmente infectados. Los marcadores hematológicos y el hemocultivo han sido el pilar diagnóstico hasta la fecha, este último considerado como el estándar de oro pero con las inconvenientes de que mejoran su sensibilidad, especificidad, VPP, VPN hasta después de las 24 horas de vida extrauterina como lo reporta Greenberg.¹⁸

En este estudio, la frecuencia de sepsis temprana demostrada por hemocultivo positivo fue de 3 casos (10%) de los 30 recién nacidos analizados; la cual es alta comparada con la incidencia reportada por Mondal y cols; refiriendo en su estudio un 6.1% para países en vías de desarrollo (59); por lo contrario tuvimos una mortalidad del 0%, muy inferior a la reportada por Manthur y cols para países desarrollados y subdesarrollados.¹⁹

Los marcadores hematológicos resultaron ser una herramienta útil para la evaluación de sepsis, con una sensibilidad del 61% y especificidad del 97% y VPN 82%; 10 recién nacidos tuvieron marcadores hematológicos positivos (5 hombres y 5 mujeres); 3 índice de Schilling (formas inmaduras/neutrófilos) positivo, 7 proteína C reactiva positiva y solo uno de los recién nacidos tuvo alteración en la cifra de leucocitos muy diferente a lo reportado por Pourcyrus.¹¹

La prevalencia de los factores de riesgo maternos fue muy similar a lo reportado por otros autores, en nuestro estudio la edad gestacional no fue un factor neonatal significativo para el desarrollo de sepsis temprana. Dentro de la clínica se encontró que la que tuvo más relación como manifestación de sepsis neonatal temprana fue la hipomotilidad muy similar a lo reportado por Mondal.²⁰

El Cultivo sanguíneo presentó una sensibilidad del 100% y especificidad del 93%. Se esperaba una baja sensibilidad en este estudio en comparación a la reportada por Visser y colaboradores del 85%, en este estudio posiblemente

explicada por el uso de antibióticos en 20 madres en el periodo ante parto y debido al pequeño número de muestra.²¹

La PCR mostró una sensibilidad de 33% y especificidad de 100% por lo que definitivamente es una herramienta útil sobre todo si se considera el corto tiempo requerido para alcanzar la confirmación de 12 horas aproximadamente pero no para el diagnóstico definitivo como lo plantearía Vineet.²²

Además la PCR ha mostrado 100% correlación con métodos microbiológicos en todos los casos infectados.

En un estudio similar Laforgia y colaboradores estudiaron a 33 recién nacidos en riesgo para sepsis temprana y encontraron 29 cultivos negativos y 4 positivos, de los cuales solo 2 PCRs se encontraban positivas.²³ Con base a los resultados anteriores, es posible que se utilizó en forma innecesaria antibióticos en 27 casos de recién nacidos con hemocultivos negativos y PCR negativa.

Conclusiones

En nuestra serie, la frecuencia de sepsis neonatal temprana fue mayor a la reportada en la literatura. La incidencia de mortalidad nula en nuestro estudio fue muy inferior a la de países desarrollados y subdesarrollados. El grupo de madres con un control prenatal regular fue el grupo en donde se encontraron todos los casos de sepsis corroborada por hemocultivo y PCR.

El factor de riesgo con mayor prevalencia fue la ruptura prematura de membranas mayor a 18 horas; similar a lo reportado en la literatura. La proteína C reactiva fue el marcador hematológico que se elevó con mayor frecuencia; pero no se relacionó con el resultado del hemocultivo y/o PCR. El síntoma clínico con más valor para la sepsis temprana diagnosticada por hemocultivo en nuestro estudio fue la hipomotilidad.

En este estudio, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no resultó de utilidad en el diagnóstico de sepsis neonatal temprana y los datos clínicos y el hemocultivo, fueron los más determinantes en su diagnóstico. Una posible explicación es el hecho de que una de las debilidades de la PCR es que para su análisis se necesitan fragmentos largos de DNA y la sangre por si sola contiene enzimas y otras sustancias que podrían acortar dichos fragmentos sobre todos si se prolonga el tiempo y/o no se conserva en forma adecuada la muestra, no obstante la PCR resultó con ventaja respecto a la mayor rapidez para descartar la sepsis neonatal temprana por su alta especificidad, por lo que se propone como prueba de tamizaje.

Referencias bibliográficas

- Lam H.S., Ng P.C. Biomarkers in neonatal infection. *Biomark Med* 2007 Jun; 1 (1):133-43.
- Ng P.C., Lam H.S. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2006 Apr; 18 (2):125-31.
- Lopez Sastre J.B., Cotallo G.D., Ramos Aparicio M. Sepsis Neonatal. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría*. 2007; 36:307-16.
- Adair C.E., Kowalsky L., Quon H., Ma D., Stoffman J., McGeer A., et al. Risk factors for early-onset group B streptococcal disease in neonates: a population-based case-control study. *CMAJ* 2003 Aug 5; 169 (3):198-203.
- Manroe B.L., Weinberg A.G., Rosenfeld C.R., Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979 Jul; 95 (1):89-98.
- Weber T.R., West K.W., Grosfeld J.L. Broviac central venous catheterization in infants and children. *Am J Surg* 1983 Feb; 145 (2):202-4.
- Brady M.T. Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 2005 Jun; 33 (5):268-75.
- Hawk M. C-reactive protein in neonatal sepsis. *Neonatal Netw* 2008 Mar; 27 (2):117-20.
- Santana R.C., García-Munoz F., Reyes D., González G., Domínguez C., Domenech E. Role of cytokines (interleukin-1beta, 6, 8, tumour necrosis factor-alpha, and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003; 92 (2):221-7.
- Sheu J.R., Hung W.C., Wu C.H., Ma M.C., Kan Y.C., Lin C.H., et al. Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia. *Circulation* 1999 Jun 15; 99 (23):3056-62.
- Pourcyrus M., Bada HS, Korones B, Barrett F F, Jennings W, Lockey T. Acute phase reactants in neonatal bacterial infections. *J Perinatol* 1991; 11: 319-325.
- Monneret G., Labaune J.M., Isaac C., Bienvenu F., Putet G., Bienvenu J. Procalcitonin and C-reactive protein levels in neonatal infections. *Acta Paediatr* 1997 Feb; 86 (2):209-12.
- Satar M., Turhan E., Yapicioglu H., Narli N.,

- Ozgunen F.T., et al; Cord blood cytokine levels in neonates born to mothers with prolonged premature rupture of membranes and its relationship with morbidity and mortality. *Eur Cytokine Netw* 2008 Mar; 19(1):37-41.
- 14.- Dark P.M., Dean P., Warhurst G. Bench-to bedside review: the promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit Care* 2009; 13(4):217.
- 15.- Lehmann L.E., Alvarez J., Hunfeld K.P., Goglio A., Kost G.J., et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med* 2009 Dec; 37(12):3085-90.
- 16.- Brozanski B.S., Jones J.G., Krohn M.J., et al; Use of polymerase chain reaction as a diagnostic tool for neonatal sepsis can result in a decrease in use of antibiotics and total neonatal intensive care unit length of stay. *J Perinatol* 2006 Nov; 26(11):688-92.
- 17.- Philip A.G., Hewitt J.R. Early diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatrics* 1980 May; 65(5):1036-41.
- 18.- Greenberg D.N., Yoder B.A. Changes in the differential white blood cell count in screening for group B streptococcal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 1990 Dec; 9(12):886-9.
- 19.- Mathur NB. Neonatal Sepsis. *Indian Pediatr* 1996; 33:663-674.
- 20.- .- Mondal GP, Raghavam M, Bhat BV, Srinivas S. Neonatal septicemia among inborn and outborn babies in referral hospital. *Indian Journal Pediatr* 1991; 58: 529-33.
- 21.- Visser VE, Hall RT. Lumbar puncture in the evaluation of neonatal sepsis. *J Pediatrics* 1980; 96: 1063-1067.
- 22.- Vineet Bhandari, MD. Effective biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 2014 Sep; 3(3): 234-45.
- 23.- Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Ped* 1997 86: 1097-1099.