

Perfil hematológico de la sepsis en recién nacidos: antígeno CD64 expresado en neutrófilos como marcador diagnóstico

Vineet Bhandari, MD, DM^a, Chao Wang, BS^b, Christine Rinder, MD^b, y Henry Rinder, MD^b

OBJETIVO: Determinar la utilidad del antígeno CD64 expresado en los neutrófilos como marcador diagnóstico de la sepsis en recién nacidos.

DISEÑO: Estudio prospectivo (mayo de 2005 a julio de 2006) en el que se reclutaron a lactantes consecutivos con una sospecha de sepsis. En ese momento, se obtuvo una muestra de sangre para un hemograma, hemocultivo e índice CD64. En lactantes con cultivos positivos se estableció el diagnóstico de sepsis confirmada. Entre lactantes con cultivos negativos, aquellos con una puntuación positiva de sepsis usando parámetros hematológicos predefinidos se clasificaron como sospecha de sepsis, y el resto, como ausencia de sepsis. Los índices de CD64 expresado en los neutrófilos se correlacionaron con el diagnóstico de sepsis confirmada y sospechada.

RESULTADOS: Hubo 293 episodios de evaluaciones de sepsis en 163 lactantes. Los lactantes con episodios de sepsis (confirmada o sospechada, $n = 40$) tenían una mayor edad gestacional comparado con aquellos ($n = 123$) sin sepsis (media $\pm$ EEM, $34,7 \pm 0,9$ comparado con $32,6 \pm 0,5$ semanas, $p = 0,03$) pero su peso al nacer (2.325 ± 200 comparado con 1.969 ± 94 g) y sus puntuaciones de Apgar a un y cinco minutos fueron similares. No se identificaron diferencias en la duración de la hospitalización en ambos grupos. Como era de esperar, el perfil hematológico de los episodios de sepsis ($n = 128$) se caracterizó por un mayor recuento de leucocitos, recuento absoluto de neutrófilos, recuento absoluto de bandas y cociente neutrófilos inmaduros:totales pero un menor recuento de plaquetas (todas las $p < 0,001$). En los episodios de sepsis se identificaron mayores índices de CD64 expresado en neutrófilos ($5,61 \pm 0,85$ comparado con $2,63 \pm 0,20$, $p = 0,0002$). Para todos los episodios de sepsis, utilizando un análisis de la curva de eficacia diagnóstica, el antígeno CD64 tuvo una AUC

de 0,74; utilizando un valor de corte de 2,30, el antígeno CD64 en combinación con el recuento absoluto de neutrófilos se caracterizó por el mayor valor predictivo negativo (93%) para descartar la sepsis y una sensibilidad del 95% para diagnosticarla. Para los episodios de sepsis con hemocultivos positivos, el antígeno CD64 se caracterizó por la mayor AUC (0,852) de todas las variables hematológicas con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 79%, utilizando un valor de corte de 4,02.

CONCLUSIONES: El antígeno CD64 expresado en neutrófilos es un marcador muy sensible de sepsis neonatal. Están justificados estudios prospectivos que incorporen este parámetro en un sistema de puntuación de la sepsis.

La sepsis en recién nacidos hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) constituye un problema mundial que contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad¹⁻⁴. La mayor parte de los estudios prestan atención a los lactantes de peso muy bajo al nacer (PMBN) dado su sistema inmunitario inmaduro y la contribución añadida de una diversidad de factores de riesgo^{1,5,6}. Es importante comprender que los lactantes prematuros incluso tardíos presentan un compromiso del sistema inmunitario y son vulnerables a las infecciones en la UCIN^{7,8}.

El reconocimiento y el diagnóstico precoces de la sepsis neonatal son difíciles porque la presentación clínica de este proceso es variable e inespecífica. Es muy importante establecer un diagnóstico precoz de sepsis porque la instauración inmediata de un tratamiento antimicrobiano mejorará el pronóstico. El aislamiento de las bacterias de un líquido corporal central (habitualmente, la sangre) es el método de referencia y más específico para su diagnóstico^{1,9,10}. Se ha revelado que se produce bacteriemia en un 32,3% de infecciones con tasas de mortalidad que fluctúan del 15 al 50%¹¹. En estudios de publicación reciente se ha documentado que en la mayoría de las circunstancias, si los hemocultivos no son positivos a las 48 h, puede interrumpirse el tratamiento empírico con antibióticos^{10,12-14}.

En esta población vulnerable persiste el problema de la exposición innecesaria a los antibióticos, creando un medio para la emergencia de resistencia bacteriana y la posibilidad de un mal pronóstico¹⁵. De modo no sor-

^aDepartment of Pediatrics, Division of Perinatal Medicine, y
^bDepartment of Laboratory Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, Estados Unidos.

Correspondencia: Vineet Bhandari, MD, DM, Department of Pediatrics, Division of Perinatal Medicine, Yale University School of Medicine, LCI 401B, PO Box 208064, New Haven, CT 06520-8064, Estados Unidos.

Correo electrónico: vineet.bhandari@yale.edu

prendente, se han hecho tentativas para usar parámetros fisiológicos¹⁶⁻¹⁸, índices hematológicos^{10,18-20} y los perfiles de las citocinas^{10,11,19,21-23} en el momento del inicio del episodio sospechado de sepsis con el objetivo de identificar con precisión al recién nacido con el proceso. Recientemente, se ha revisado el papel de las citocinas como ayuda diagnóstica en la sepsis neonatal^{24,25}. A pesar del hecho de que la mayoría de las citocinas como marcadores se caracterizan por valores predictivos negativos elevados²⁴ (es decir, son apropiadas para descartar la sepsis), no se han adaptado para un uso médico general. En parte, esto se debe a las mayores cantidades de sangre necesarias, el intervalo prolongado que transcurre hasta obtener los resultados (en particular, si se usan técnicas ELISA) y los costes implicados. Al mismo tiempo, el hemograma con la fórmula leucocitaria, rápidamente disponible, se caracteriza por una baja especificidad para el diagnóstico de sepsis. La asociación del recuento de bandas y la desviación a la izquierda de la inmadurez de la serie mieloide mejora el rendimiento diagnóstico pero su determinación subjetiva es problemática. Por lo tanto, persiste la necesidad de mejorar los indicadores diagnósticos de la sepsis neonatal.

Recientemente, se ha prestado atención a los antígenos de superficie de la célula leucocitaria como marcadores diagnósticos de la sepsis²⁶. El antígeno CD64 de la superficie de neutrófilos, el receptor Fc de alta afinidad, es regulado cuantitativamente al alza durante la infección y la sepsis bajo la influencia de las citocinas inflamatorias. Este aumento de la densidad de superficie se produce de una manera escalonada en función de la intensidad del estímulo de las citocinas y de si la expresión de CD64 es estable durante más de 24 h²⁷. Los progresos tecnológicos en flujocitometría han hecho posible cuantificar rápidamente con precisión el antígeno CD64 expresado en los neutrófilos y, lo que es más importante en el caso de los recién nacidos, con el uso de volúmenes mínimos de sangre²⁶, pero la expresión de CD64 todavía no se ha estudiado de modo difundido en lactantes prematuros, con mal estado general.

Formulamos la hipótesis de que la expresión del antígeno CD64 en la superficie de los neutrófilos sería un índice sensible para la detección de la sepsis neonatal. En el presente estudio prospectivo, nuestro objetivo fue reclutar a lactantes consecutivos que se sometieron a una evaluación de la sepsis en la UCIN y determinar el índice CD64 de neutrófilos en sangre como adyuvante del sistema de puntuación hematológica validado previamente para la detección de la sepsis neonatal^{10,19,28}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación en Seres Humanos de la Yale University School of Medicine. El presente estudio prospectivo se condujo en la unidad de cuidados especiales neonatales del Yale New Haven Children's Hospital. Se reclutaron pacientes consecutivos (desde mayo de 2005 a julio de 2006) que se sometieron a una evaluación de la sepsis (considerada necesaria por el neonatólogo responsable). La duración del tratamiento antibiótico varió en función de la gravedad de la enfermedad y a discreción del neonatólogo responsable.

Para identificar a los pacientes con el objetivo de evaluarlos en busca de sepsis se usaron dos o más de las características clínicas siguientes: 1) compromiso respiratorio (taquipnea [fre-

cuencia respiratoria > 60/min]; aumento de las apneas [interrupción de la respiración ≥ 20 s produciéndose a un ritmo ≥ 2 por hora]; apnea grave [cualquier episodio individual que requirió ventilación con presión positiva]; aumento del tratamiento de soporte ventilatorio [sin otra causa evidente, como un neumotórax] y desaturaciones [lecturas de la pulsioximetría $\leq 85\%$]; 2) compromiso cardiovascular (bradicardia [frecuencia cardíaca < 100 latidos por minuto]; palidez, disminución de la perfusión [llenado capilar ≥ 3 s o extremidades frías]; hipotensión); 3) cambios metabólicos (hipotermia [temperatura rectal < 36 °C], fiebre [temperatura rectal > 37 °C]; intolerancia a la alimentación [aumento de los residuos gástricos > 30% del volumen de la alimentación en, como mínimo, dos alimentaciones en un plazo de 24 h]; inestabilidad de la glucosa [glucemia < 45 o > 125 mg/dl]; acidosis metabólica [pH < 7,25]), y 4) cambios neurológicos (letargo; hipotonía; disminución de la actividad). Estas características clínicas se han validado en un estudio previo como firmemente sugestivas de infección¹⁰.

Como parte de la evaluación, se obtuvo una muestra de sangre para un hemograma, incluida la fórmula leucocitaria, efectuar un hemocultivo y analizar el índice de CD64. Como indicadores de sepsis se usaron, validados previamente^{10,19,28}, los criterios hematológicos siguientes: 1) recuento absoluto de neutrófilos < 7.500 o > 14.500/mm³; 2) recuento absoluto de bandas > 1.500/mm³; 3) cociente de neutrófilos inmaduros:neutrófilos totales > 0,16, y un recuento de plaquetas < 150.000/mm³.

Todos los hemogramas se obtuvieron usando la misma técnica estéril de referencia según lo estipulado por protocolo. Para detectar hemocultivos positivos se utilizó el sistema de detección microbiana BACTEC (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD). Es un sistema automatizado, cerrado, que utiliza un sensor químico para detectar aumentos en la producción de dióxido de carbono generado por el crecimiento de microorganismos. El sensor se monitoriza cada 10 min para un aumento de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de dióxido de carbono presente.

En lactantes cuyos hemocultivos fueron positivos, se estableció el diagnóstico de sepsis *confirmada*; en lactantes con hemocultivos negativos, aquellos con una puntuación positiva de sepsis (dos o más de los criterios hematológicos citados previamente) se clasificaron como *sospecha* de sepsis, mientras que los lactantes restantes se clasificaron como sin sepsis^{10,19,28}.

Índice CD64

La expresión del antígeno CD64 en neutrófilos se determinó como se ha descrito previamente²⁹. En pocas palabras, se incubaron 50 μ l de sangre completa o sangre completa diluida en suero salino neutralizado con fosfato durante 10 min a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-CD64 conjugado con una cantidad saturante de isotiocianato de fluoresceína (ITCF) o un control isotípico (equipo Leuko64, Trillium Diagnostics, Scarborough, ME), seguido de una lisis de hematíes con cloruro de amonio. Las muestras se lavaron una vez y se resuspendieron en 0,5 ml de suero salino neutralizado con fosfato con un 0,1% de albúmina sérica bovina. El análisis flujocitométrico se obtuvo utilizando un aparato FACS de Becton Dickinson (Mountainview, CA) para obtener el logaritmo de la fluorescencia verde (FITC), el logaritmo de la dispersión lateral en ángulo recto y la dispersión frontal de la luz en un mínimo de 50.000 leucocitos. La estandarización interanálisis y la cuantificación de CD64 se efectuaron utilizando microesferas de calibración FITC (Leuko64). El análisis de los datos se efectuó utilizando una ventana electrónica de dispersión de la luz para definir la población de neutrófilos y el índice de CD64 de neutrófilos se cuantificó como unidades de fluorescencia solubles equivalentes a la media usando el programa QuickCal para Winlist (Verity Software House, Topsham, ME) con una corrección para la unión de anticuerpos inespecíficos mediante la sustracción de los valores para el control isotípico.

Análisis estadísticos

Las comparaciones entre el grupo con sepsis y el grupo sin ella se efectuaron utilizando la prueba de la t o un análisis de la

χ^2 , según fue apropiado. Todos los análisis se efectuaron utilizando el programa GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Inc.). Se generaron curvas de eficacia diagnóstica, analizadas para el área bajo la curva (AUC) y una comparación *pairwise* efectuada usando el programa MedCalc para Windows, versión 9.2.0.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En 163 lactantes hubo 293 episodios de evaluaciones de sepsis. Los lactantes con episodios de sepsis (confirmada o sospechada, $n = 40$) tuvieron una mayor edad gestacional que aquellos sin sepsis ($n = 123$) (media $\pm$ EEM, $34,7 \pm 0,9$ comparado con $32,6 \pm 0,5$ semanas, $p = 0,03$) pero su peso al nacer ($2,325 \pm 200$ comparado con $1,969 \pm 94$ g) y puntuaciones de Apgar a uno y cinco minutos fueron similares (tabla 1). No se identificaron diferencias en el número de días tratados mediante ventilación con presión positiva, presión positiva continua nasal de las vías respiratorias, oxigenoterapia suple-

mentaria o duración de la hospitalización entre grupos (tabla 1).

Partiendo del sistema de puntuación de la sepsis utilizando las variables hematológicas, los episodios de sepsis ($n = 128$) se caracterizaron por recuentos de leucocitos, recuentos absolutos de neutrófilos, recuentos absolutos de bandas y cocientes I/T significativamente mayores que los episodios no sépticos ($n = 165$), al igual que recuentos más bajos de plaquetas ($p < 0,001$ para todas las comparaciones; tabla 2). En los episodios de sepsis también se demostraron valores significativamente mayores del índice CD64 que en aquellos sin sepsis ($5,61 \pm 0,85$ comparado con $2,63 \pm 0,20$, $p = 0,0002$; tabla 2). Para todos los episodios de sepsis, el índice CD64 tuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,739; la utilización de un punto de corte del índice CD64 de 2,30 deparó por sí misma una sensibilidad del 70% y una especificidad del 62%, con un valor predictivo negativo (VPN) del 73%.

En la tabla 3 se muestran la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y VPN de todos los

TABLA 1. Características de la población neonatal

Variables	Sin sepsis (n = 123)	Presencia de sepsis (n = 40)	Valor de p
Edad gestacional, media $\pm$ EEM (semanas)	32,55 $\pm$ 0,47	34,72 $\pm$ 0,95	0,031
Peso al nacer, media $\pm$ EEM (g)	1.969 $\pm$ 94	2.325 $\pm$ 200	0,078
Sexo masculino, n (%)	68 (55)	24/39 (62)	0,492
Parto vaginal, n/N (%)	33/120 (28)	13/38 (34)	0,428
Puntuación de Apgar a 1 min, mediana (límites)	7 (1-9)	6 (1-9)	0,876
Puntuación de Apgar a los 5 min, mediana (límites)	8 (1-9)	9 (3-9)	0,419
Días conectado a un respirador, media $\pm$ EEM (días)	14,0 $\pm$ 2,3	12,0 $\pm$ 4,8	0,674
Días sometido a CPAPn, media $\pm$ EEM (días)	3,6 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 1,0	0,292
Días tratado con oxígeno, media $\pm$ EEM (días)	19,1 $\pm$ 2,8	18,0 $\pm$ 6,3	0,863
Duración de la estancia, media $\pm$ EEM (días)	38,7 $\pm$ 3,6	26,8 $\pm$ 7,1	0,116

CPAPn: presión positiva continua nasal de las vías respiratorias.

TABLA 2. Características de los episodios de sepsis

Variables	Sin sepsis (n = 165)	Presencia de sepsis (n = 128)	Valor de p
Edad en el momento de la evaluación para la sepsis, media $\pm$ EEM (días)	12,3 $\pm$ 1,5	22,1 $\pm$ 3,1	0,002
Hematócrito, media $\pm$ EEM (%)	42,7 $\pm$ 0,8	41,7 $\pm$ 0,9	0,371
Recuento de leucocitos, media $\pm$ EEM (células/mm ³)	14,0 $\pm$ 0,5	19,2 $\pm$ 1,2	< 0,0001
Neutrófilos segmentados, media $\pm$ EEM (%)	41,9 $\pm$ 1,3	40,9 $\pm$ 1,5	0,596
Bandas, media $\pm$ EEM (%)	4,5 $\pm$ 0,3	14,0 $\pm$ 0,9	< 0,0001
Recuento de plaquetas, media $\pm$ EEM (1.000 células/mm ³)	285,3 $\pm$ 8,5	176,0 $\pm$ 8,5	< 0,0001
Recuento absoluto de neutrófilos, media $\pm$ EEM (células/mm ³)	6.324 $\pm$ 326	8.929 $\pm$ 704	0,0004
Recuento absoluto de bandas, media $\pm$ EEM (células/mm ³)	698 $\pm$ 60	2.716 $\pm$ 242	< 0,0001
Cociente neutrófilos inmaduros/tales, media $\pm$ EEM	0,05 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,01	< 0,0001
Índice CD64, media $\pm$ EEM	2,63 $\pm$ 0,20	5,61 $\pm$ 0,85	0,0002

TABLA 3. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (expresados en porcentaje) de todos los datos hematológicos solos y combinados con el índice CD64

Índice hematológico	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Recuento absoluto de neutrófilos	84	34	50	74
Recuento absoluto de bandas	61	87	78	74
Cociente de neutrófilos (I/T)	33	1,00	1,00	66
Recuento de plaquetas	48	96	91	71
Índice CD64	70	62	59	73
Recuento absoluto de neutrófilos e índice CD64	95	57	63	93
Recuento absoluto de bandas e índice CD64	88	56	61	86
Cociente I/T e índice CD64	75	62	61	76
Plaquetas e índice CD64	85	60	62	84

I/T: inmaduros/tales; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

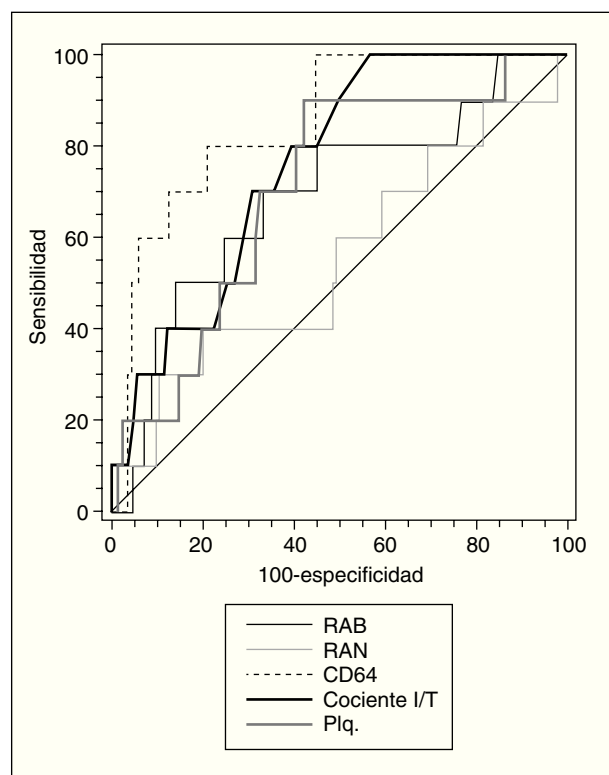


Fig. 1. Análisis de la curva de eficacia diagnóstica de los parámetros hematológicos en los episodios de sepsis confirmada ($n = 10$). El valor del antígeno CD64 se caracterizó por la mayor área bajo la curva (AUC: 0,852). I: inmaduros; Plq.: recuento de plaquetas; RAB: recuento absoluto de bandas; RAN: recuento absoluto de neutrófilos; T: totales.

datos hematológicos solos y en combinación con el índice CD64 (corte de 2,30). La combinación de este valor de corte del índice CD64 con los criterios predefinidos del recuento absoluto de neutrófilos en Métodos deparó la mayor sensibilidad (95%) y el mayor valor predictivo negativo del 93%. No se efectuó una combinación de los múltiples índices hematológicos para la sensibilidad y los valores predictivos puesto que en el presente estudio la base para definir la sepsis fue ≥ 2 índices hematológicos positivos; esta definición *a priori* produciría un sesgo positivo hacia valores predictivos más altos. Por esta razón, sólo examinamos las variables individuales $\pm$ el índice CD64 experimental.

Hubo 10 episodios de sepsis confirmada con hemocultivos positivos, 4 fueron por especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos, 2 por *E. coli* y uno por *Streptococcus* de grupo B, uno por *Klebsiella oxytoca*, uno por *Klebsiella pneumoniae* y uno por especies de *Enterobacter*. Para estos episodios de sepsis confirmada, entre todos los parámetros de laboratorio, para el índice CD64 se identificó la mayor área bajo la curva (AUC: 0,852) mediante el análisis de eficacia diagnóstica (fig. 1 y tabla 4). Las comparaciones *pairwise* de las curvas de eficacia diagnóstica de los diversos parámetros hematológicos con el índice CD64 no demostraron diferencias significativas con el recuento absoluto de bandas o el cociente I/T, identificándose una

TABLA 4. Comparación de las AUC de las curvas de eficacia diagnóstica

Variable	AUC, media $\pm$ EE (IC del 95%)
Recuento absoluto de neutrófilos	0,551 $\pm$ 0,089 (0,492-0,609)
Recuento absoluto de bandas	0,691 $\pm$ 0,095 (0,634-0,743)
Recuento de plaquetas	0,704 $\pm$ 0,071 (0,648-0,756)
Cociente de neutrófilos (I/T)	0,758 $\pm$ 0,090 (0,705-0,806)
Índice CD64	0,852 $\pm$ 0,077 (0,806-0,890)

AUC: área bajo la curva; EE: error estándar; IC: intervalo de confianza.

tendencia hacia un mayor valor del índice CD64 comparado con los recuentos de plaquetas ($p = 0,086$) y significativamente mayor comparado con los recuentos absolutos de neutrófilos ($p = 0,009$). Un corte del índice CD64 de 2,02 deparó por sí mismo una sensibilidad del 80% y una especificidad del 79% para el diagnóstico de episodios de sepsis con hemocultivo positivo.

DISCUSIÓN

Antes de recibir el resultado del hemocultivo es difícil identificar a recién nacidos con sepsis. Puesto que la sepsis es una posibilidad aun cuando los resultados del hemocultivo sean negativos (p. ej., si el recién nacido se ha expuesto *in utero* a los antibióticos), los médicos pueden optar por continuar los antibióticos partiendo del perfil clínico. En un estudio multicéntrico, Fanaroff et al documentaron la incidencia, características de la presentación y factores de riesgo de sepsis de inicio tardío en lactantes de muy bajo peso al nacer³⁰. Aunque se estudió un total de 2.416 lactantes, sólo 395 con sepsis demostrada mediante hemocultivo desarrollaron septicemia a una edad mediana de 17 días. Las características clínicas de los lactantes con sepsis incluyeron apnea (55%); intolerancia a la alimentación, distensión abdominal y heces positivas a la prueba del guayaco (43%); aumento del tratamiento de soporte respiratorio (29%) y letargo e hipotonía (23%). En otro estudio se han utilizado hallazgos clínicos similares para identificar a recién nacidos con sepsis¹⁰. Sin embargo, con la excepción del aumento de los episodios de apnea y bradicardia, los criterios clínicos no pudieron distinguir a lactantes infectados de los no infectados¹⁰ (utilizando "el patrón oro" del hemocultivo positivo). Al igual que los mencionados previamente, en el presente estudio el microorganismo implicado con mayor frecuencia en la sepsis neonatal fue *Staphylococcus coagulasa* negativo^{1,5,10,30,31}.

Los estudios que han usado las diferencias de temperatura periférica-central para identificar a lactantes con sepsis han descrito resultados prometedores pero no se han validado en estudios efectuados con un mayor número de lactantes^{16,32}. Recientemente, Griffin et al han utilizado las características de la frecuencia cardíaca para predecir la infección y la muerte neonatal¹⁷, pero esto requiere confirmación.

Numerosos esfuerzos se han centrado en los parámetros hematológicos con el objetivo de aumentar el rendimiento diagnóstico en la sepsis neonatal. Rodwell et al³³ evaluaron el papel de los hallazgos hematológicos como prueba de cribado de la sepsis neonatal; en dicho estu-

dio, se evaluaron 298 lactantes en busca de sepsis, y 27 experimentaban sepsis demostrada mediante hemocultivo (lo que es similar a las tasas obtenidas en el presente estudio). De estos 27, en 26 (96%) se identificaron ≥ 3 criterios hematológicos en el momento del episodio de sepsis. Se concluyó que la presencia de ≥ 3 puntuaciones hematológicas tuvo una sensibilidad del 96% y una especificidad del 78%. Estos criterios también se caracterizaron por un valor predictivo positivo del 31% y un valor predictivo negativo del 99%. En otros estudios para diferenciar a lactantes con y sin sepsis se han usado los criterios modificados de Rodwell^{10,19,28}. Sin embargo, es preciso tener en cuenta la amplia variabilidad en la precisión diagnóstica de los índices de los leucocitos en la sepsis neonatal³⁴, en particular el recuento de bandas y su cociente I/T derivado.

También se ha investigado la determinación de citocinas como un medio de aumentar el rendimiento en la sepsis neonatal. Entre las diversas citocinas, la mayor parte de estudios han confirmado la utilidad de la interleucina 6^{10,11,24,35-46} (IL-6) como un marcador precoz de sepsis neonatal. Los valores de corte de esta interleucina para el diagnóstico de sepsis han fluctuado de 18 a 31 pg/ml^{10,11,44,45}. Por otra parte, la IL-8 no ha estado a la altura de las promesas iniciales como marcador diagnóstico de la sepsis neonatal^{10,24,47,48}. También es importante destacar que, aunque los inmunoanálisis manuales pueden proporcionar resultados a las 1,5-4 h, serían necesarios los procesos automatizados disponibles fácilmente para la determinación de citocinas si sus valores han de ayudar a las decisiones clínicas de iniciar o suspender el tratamiento con antibióticos²⁵. La falta de automatización y los costes implicados en los inmunoanálisis manuales han dificultado aun más la aceptación de estos marcadores en la práctica clínica general. Los reactantes de fase aguda, por ejemplo, la procalcitonina y la proteína C reactiva, también se han estudiado como marcadores de la sepsis neonatal^{22,23,34,45,48}. Lamentablemente, puesto que esos reactantes de fase aguda tienen propiedades diagnósticas similares, no se ha puesto de manifiesto que un marcador individual tenga una ventaja significativa sobre el otro²⁶.

Recientemente, se han estudiado una diversidad de marcadores de la superficie de los leucocitos para evaluar su potencial como marcadores de la sepsis neonatal (revisados²⁶). En la superficie de los neutrófilos se observa un aumento sustancial de la expresión del antígeno CD64 como respuesta a la infección bacteriana en recién nacidos, similar a lo observado en niños más mayores y adultos⁴⁹. La expresión de CD64 es un indicador muy específico de sepsis neonatal pero en un estudio de publicación reciente se ha documentado una baja sensibilidad⁵⁰. En niños de muy bajo peso al nacer, utilizando valores de corte de 6.136 y 4.000 moléculas de ficoeritrina unidas por célula, respectivamente, se ha identificado que la concentración de CD64 se caracteriza por una elevada sensibilidad (95-97%) y valor predictivo negativo (97-99%) en la infección de inicio precoz y tardío^{51,52}. La adición de la concentración de IL-6 o la proteína C reactiva mejoró adicionalmente la sensibilidad y especificidad hasta el 100%⁵². Por lo tanto, en el presente estudio prestamos atención al antígeno CD64 como adyuvante diagnóstico de los índices hematológicos de referencia.

Utilizando flujocitometría la cuantificación de CD64 es rápida (< 60 min) y requiere un volumen mínimo de sangre. De hecho, para el presente estudio, no se obtuvieron muestras adicionales de sangre de los recién nacidos para realizar esta prueba; las muestras remitidas para el hemograma fueron suficientes. En el presente estudio, identificamos que el índice CD64 tuvo la mayor AUC comparado con los parámetros hematológicos de uso habitual (incluido el recuento de bandas y el cociente I/T) para diagnosticar la sepsis neonatal confirmada. Este hallazgo sólo justifica estudios prospectivos adicionales del antígeno CD64 en las evaluaciones de la sepsis neonatal. Además, CD64 demostró una utilidad sorprendente en todos los episodios de sepsis, incluso dado el uso *a priori* de otros índices hematológicos para establecer esta definición. De hecho, la combinación de los criterios del índice CD65 y el recuento absoluto de neutrófilos, sin otros índices hematológicos, demostró una sensibilidad del 95% para todos los episodios de sepsis y un valor del 93% para predecir los episodios que *no* se ajustaban a los criterios sépticos. Estos hallazgos sugieren firmemente que el índice CD64 objetivo podría reemplazar el recuento de bandas (y su cociente I/T derivado) como indicador hematológico de la sepsis. Además, el elevado valor predictivo negativo de la combinación CD64/recuento absoluto de neutrófilos sugiere que estos dos valores podrían ser satisfactorios en la toma de decisiones de suspender o no administrar tratamiento antibiótico. Están justificados estudios adicionales sobre una comparación directa del índice CD64 con el recuento de bandas y el cociente I/T para determinar si el primero puede reemplazar a estos criterios subjetivos junto con el recuento absoluto de neutrófilos.

CONCLUSIONES

Para concluir, el índice CD64 aumentó significativamente durante los episodios de sepsis neonatal y fue el parámetro más satisfactorio para el diagnóstico de sepsis confirmada; junto con el recuento absoluto de neutrófilos, este índice parece prometedor para reemplazar la determinación subjetiva del recuento de bandas y el cociente I/T. Sin embargo, antes de que pueda aceptarse en los ámbitos clínicos habituales, deben evaluarse cuidadosamente aspectos decisivos, como la disponibilidad y el coste. No obstante, de acuerdo con otros estudios publicados, los hallazgos del presente estudio alientan a incorporar el índice CD64 en los sistemas de puntuación de sepsis en los recién nacidos y evaluar prospectivamente su valor diagnóstico incremental (o como sustitución de los parámetros tradicionales).

AGRADECIMIENTO

El presente estudio se financió con una beca de Trillium Diagnostics, LLC.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a las enfermeras de la UCIN por su ayuda inestimable.

BIBLIOGRAFÍA

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

2. Lawn JE, Wilczynska-Ketende K, Cousens SN. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *Int J Epidemiol.* 2006;35:706-18.
3. Afroza S. Neonatal sepsis: a global problem: an overview. *Mymensingh Med J.* 2006;15:108-14.
4. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birthweight infants with neonatal infection. *JAMA.* 2004;292:2357-65.
5. Bhandari V, Eisenfeld L, Lerer T, Holman M, Rowe J. Nosocomial sepsis in neonates with single lumen vascular catheters. *Indian J Pediatr.* 1997;64:529-35.
6. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003;27:293-301.
7. Clapp DW. Developmental regulation of the immune system. *Semin Perinatol.* 2006;30:69-72.
8. Benjamin DK Jr, Stoll BJ. Infection in late preterm infants. *Clin Perinatol.* 2006;33:871-882.
9. Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 1991;18:361-81.
10. Gonzalez BE, Mercado CK, Johnson L, Brodsky NL, Bhandari V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J Perinat Med.* 2003;31:60-8.
11. Kuster H, Weiss M, Willeitner AE, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet.* 1998;352:1271-7.
12. Janjindamai W, Phetpisal S. Time to positivity of blood culture in newborn infants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006;37:171-6.
13. Jardine L, Davies MW, Faagali J. Incubation time required for neonatal blood cultures to become positive. *J Paediatr Child Health.* 2006;42:797-802.
14. Hurst MK, Yoder BA. Detection of bacteremia in young infants: is 48 hours adequate? *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14:711-3.
15. Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, Gerstmann DR. Empiric use of ampicillin and cefotaxime, compared with ampicillin and gentamicin, for neonates at risk for sepsis is associated with an increased risk of neonatal death. *Pediatrics.* 2006;117:67-74.
16. Bhandari V, Narang A. Thermoregulatory alterations as a marker for sepsis in normothermic premature neonates. *Indian Pediatr.* 1992;29:571-5.
17. Griffin MP, Lake DE, Bissonette EA, Harrell FE Jr, O'Shea TM, Moorman JR. Heart rate characteristics: novel physiologic markers to predict neonatal infection and death. *Pediatrics.* 2005;116:1070-4.
18. Dalgic N, Ergenekon E, Koc E, Atalay Y. NOSEP and clinical scores for nosocomial sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Trop Pediatr.* 2006;52:226-7.
19. Smulian JC, Bhandari V, Campbell WA, Rodis JF, Vintzileos AM. Value of umbilical artery and vein levels of interleukin-6 and soluble intracellular adhesion molecule-1 as predictors of neonatal hematologic indices and suspected early sepsis. *J Matern Fetal Med.* 1997;6:254-9.
20. Okascharoen C, Sirinavin S, Thakkinstant A, Kitayaporn D, Supapanachart S. A bedside prediction-scoring model for late-onset neonatal sepsis. *J Perinatol.* 2005;25:778-83.
21. Ng PC, Li K, Chui KM, et al. IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants. *Pediatr Res.* 2007;61:93-8.
22. Khassawneh M, Hayajneh WA, Kofahi H, Khader Y, Amarin Z, Daoud A. Diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6 and immunoglobulin M. *Scand J Immunol.* 2007;65:171-5.
23. Turner D, Hammerman C, Rudensky B, Schlesinger Y, Schimmel MS. The role of procalcitonin as a predictor of nosocomial sepsis in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2006;95:1571-6.
24. Bhandari V. Cytokines in neonatal sepsis: diagnostic and therapeutic considerations. En: Singhi S, editor. *Current concepts in pediatric intensive care.* Chandigarh, India: Re-lume Printec; 2000. p. 92-107.
25. Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:879-87.
26. Ng PC, Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18:125-31.
27. Hoffmeyer F, Witte K, Schmidt RE. The high-affinity FcγRI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology.* 1997;92:544-52.
28. Buhimschi CS, Buhimschi IA, Abdel-Razeq S, et al. Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation: relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate. *Pediatr Res.* 2007;61:318-24.
29. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:654-61.
30. Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, et al. Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants: National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:593-8.
31. Beck-Sague CM, Azimi P, Fonseca SN, et al. Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13:1110-6.
32. Messaritakis J, Anagnostakis D, Laskari H, Katerelos C. Rectal skin temperature difference in septicemic newborn infants. *Arch Dis Child.* 1990;65:380-2.
33. Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr.* 1988;112:761-7.
34. 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.
35. Ozdemir A, Oygur N, Gultekin M, Coskun M, Yegin O. Neonatal tumor necrosis factor, interleukin-1α, interleukin-1β, and interleukin-6 response to infection. *Am J Perinatol.* 1994;11:282-5.
36. Groll AH, Meiser A, Weise M, et al. Interleukin 6 as early mediator in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 1992;11:496-8.
37. Panero A, Pacifico L, Rossi N, Mancuso G, Stegagno M, Chiesa C. Interleukin 6 in neonates with early and late onset infection. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:370-5.
38. Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics.* 1994;93:54-8.
39. Harris MC, Costarino AT Jr, Sullivan JS, et al. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 1994;124:105-11.
40. Mehr SS, Doyle LW, Rice GE, Vervaaert P, Henschke P. Interleukin-6 and interleukin-8 in newborn bacterial infection. *Am J Perinatol.* 2001;18:313-24.
41. De Bont ES, Martens A, van Raan J, et al. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatr.* 1994;83:696-9.
42. Onal EE, Kitapci F, Dilmen U, Adam B. Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis. *Lancet.* 1999;353:239-40.
43. Kantar M, Kultursay N, Kutukculer N, Akisu M, Cetingul N, Caglayan S. Plasma concentrations of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in septic and healthy preterms. *Eur J Pediatr.* 2000;159:156-7.
44. Magudumana MO, Ballot DE, Cooper PA, et al. Serial interleukin 6 measurements in the early diagnosis of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr.* 2000;46:267-71.
45. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, et al. 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:F221-7.
46. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr.* 2001;160:345-50.

47. Edgar JD, Wilson DC, McMillan SA, et al. Predictive value of soluble immunological mediators in neonatal infection. *Clin Sci (Lond)*. 1994;87:165-71.
48. Franz AR, Kron M, Pohlandt F, Steinbach G. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18:666-71.
49. Fjaertoft G, Hakansson L, Ewald U, Foucard T, Venge P. Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fc γ -receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr Res*. 1999;45:871-6.
50. Layseca-Espinosa E, Perez-Gonzalez LF, Torres-Montes A, et al. Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13:319-27.
51. Ng PC, Li G, Chui KM, et al. Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatr Res*. 2004;56:796-803.
52. Ng PC, Li K, Wong RP, Chui KM, Wong E, Fok TF. Neutrophil CD64 expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants. *Pediatr Res*. 2002;51:296-303.