

Inmunofenotipificación de linfocitos T como marcador diagnóstico de sepsis neonatal tardía

M^ªJ. Dorado Moles^a, M^ªA. Figueredo Delgado^b, C. Fernández Pérez^c y M. Moro Serrano^a

^aServicio de Neonatología. Departamento de Pediatría. ^bServicio de Inmunología. ^cUnidad de Investigación. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

Introducción

Dada la elevada morbimortalidad asociada con la sepsis neonatal, es necesario un marcador diagnóstico que prediga la enfermedad antes de obtener el resultado del cultivo de sangre y/o líquido cefalorraquídeo.

Se evaluaron los cambios en el inmunofenotipaje de los linfocitos T CD4+ en neonatos con sepsis de comienzo tardío con el fin de mejorar los resultados obtenidos con los test diagnósticos empleados actualmente (proteína C reactiva, índice neutrófilos inmaduros/neutrófilos totales, leucocitosis).

Pacientes y métodos

Un estudio de cohortes prospectivo se llevó a cabo en 24 neonatos con sepsis de comienzo tardío y 48 recién nacidos controles no infectados, de edad gestacional igual o inferior a 37 semanas. Se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en sangre periférica mediante tinción con anticuerpos monoclonales y cuantificación por citometría de flujo. Se construyeron curvas de rendimiento diagnóstico mediante regresión logística.

Resultados

Como marcador de sepsis neonatal de comienzo tardío, un porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- > 3,5 % muestra una sensibilidad del 94,1 %, una especificidad del 69,2 %, un valor predictivo positivo del 80,0 %, valor predictivo negativo del 90,0 %, y una *odds ratio* de 36,0 ($p < 0,001$). Cuando se combina este marcador con una proteína C reactiva > 10,0 mg/l, la especificidad de esta combinación de marcadores aumenta al 94,7 % y el valor predictivo positivo, al 85,7 %.

Conclusiones

Un porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- > 3,5 % es un buen indicador de sepsis neonatal de comienzo tardío en neonatos pretérmino. Y si se combina

con una proteína C reactiva > 10,0 mg/l el rendimiento diagnóstico mejora.

Palabras clave:

Linfocitos T CD4+. Diagnóstico. Inmunofenotipaje. Sepsis neonatal de comienzo tardío.

T LYMPHOCYTE IMMUNOPHENOTYPE AS A DIAGNOSTIC MARKER OF LATE-ONSET NEONATAL SEPSIS

Background

Given the high risks associated with neonatal sepsis, there is a need for a diagnostic marker that would predict the disease before the results of blood or cerebrospinal fluid cultures are available. We evaluated changes in the CD4+ T lymphocyte immunophenotype in neonates with late-onset sepsis to try to improve the test combinations currently used (C reactive protein, immature:total neutrophil ratio, leukocytosis).

Patients and methods

We performed a prospective cohort study in 24 neonates with late-onset sepsis and 48 non-infected controls with a gestational age of 37 weeks or less. CD4+ T lymphocyte subpopulations in peripheral blood samples were identified by labeling with monoclonal antibodies and quantified by flow cytometry. Diagnostic performance curves were constructed by logistic regression.

Results

As a marker of late-onset neonatal sepsis, a percentage of CD4+/CD45RO+/CD45RA- T lymphocytes of > 3.5 % showed a sensitivity of 94.1 %, specificity of 69.2 %, positive predictive value of 80.0 %, negative predictive value of 90.0 %, and odds ratio of 36.0 ($p < 0.001$). When we com-

Correspondencia: Dra. M^ªJ. Dorado Moles.
Servicio de Neonatología. Hospital Clínico San Carlos.
Martín Lago, s/n. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: mjdmoles@yahoo.es

Recibido en octubre de 2007.

Aceptado para su publicación en octubre de 2007.

bined this marker with a C-reactive protein level of > 10.0 mg/L, the specificity of this combination of tests increased to 94.7% and the positive predictive value to 85.7%.

Conclusions

A percentage of CD4+/CD45RO+/CD45RA- T lymphocytes of > 3.5% is an effective indicator of late-onset neonatal sepsis in preterm infants. If this marker is combined with a C-reactive protein level of > 10.0 mg/l, its diagnostic performance is improved.

Key words:

CD4+ T lymphocytes. Diagnosis. Immunophenotyping. Late-onset neonatal sepsis.

INTRODUCCIÓN

La sepsis neonatal es una enfermedad de baja incidencia pero de elevada morbimortalidad asociada, lo que conduce a la realización de muchos test analíticos cuando se sospecha. No obstante, no existe en la actualidad ningún marcador analítico que confirme o descarte con seguridad la infección en el neonato, y el clínico no puede esperar a los resultados de los cultivos de sangre y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) para iniciar el tratamiento antibiótico. Esto ha conducido al uso de distintas combinaciones de test diagnósticos, con resultados muy dispares¹.

En un metaanálisis realizado sobre 194 estudios relacionados con los test diagnósticos más comúnmente usados en la sepsis neonatal (variables hematológicas, proteína C reactiva [PCR], cultivos de sangre), Fowlie y Schmidt² publicaron en 1998 que la calidad de los métodos usados para establecer la validez de los test diagnósticos era generalmente pobre y que, incluso en los estudios más rigurosos, la precisión de los test variaba sustancialmente. Las razones de esta imprecisión eran diversas e incluían la no distinción entre sepsis neonatal de comienzo precoz o tardío, diferentes puntos de corte para el mismo marcador y la introducción de rangos de edad gestacional muy amplios (24-42 semanas) en las series estudiadas.

A menudo, a pesar de que el recién nacido presenta signos clínicos y datos analíticos indicativos de infección bacteriana, los cultivos de sangre resultan negativos³⁻⁵. Esto se atribuye a una inadecuada proporción entre la cantidad de sangre extraída y el medio de cultivo usado, a una bacteriemia intermitente o de baja densidad y al uso creciente de antibióticos antes y durante el parto⁵⁻⁸.

Erkeller-Yuksel et al⁹ establecieron que, al nacer, \pm 91% de las células T CD4 expresan CD45RA+ en su superficie, y que la exposición repetida al antígeno causa un cambio del fenotipo CD45RA+/CD45RO- al CD45RA-/CD45RO+. Consecuentemente, estos autores propusieron que las células CD45RA+ son quizá células no primadas por el antígeno. También observaron que los linfocitos T CD45RO+

umentan lentamente desde el nacimiento hasta proporciones aproximadas al 45% a la edad de 15-16 años.

Este proceso de adquisición del fenotipo memoria parece ser un proceso conducido por el patógeno, más que lo que ocurre con otros factores, tales como la PCR. Las células memoria T CD4+ expresan en su superficie isoformas alteradas de CD45 que regulan la interacción del receptor de la célula T con su correceptor. La molécula CD45 es una tiroxina-fosfatasa transmembrana cuyo gen tiene tres exones variables (A, B, C), que codifican parte de una enzima del dominio externo. La célula T *naive* tiene una isoforma de alto peso molecular (CD45RA, con los 3 exones) que no se asocia con receptor. Pero en la célula T memoria los exones variables se pierden y la isoforma (CD45RO) se asocia con ambos, el receptor de la célula T y con su correceptor. Este complejo receptor-correceptor parece traducir la señal más efectivamente que el receptor de la célula T *naive*. Se cree que los cambios en el fenotipo ocurren tras el contacto con el microorganismo patógeno y no tras un proceso inflamatorio inespecífico.

En sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos a término, Rabian-Herzog et al¹⁰ observaron que el $31,0 \pm 10,8\%$ de los linfocitos T eran CD4+, comparado con el $42,4 \pm 7,2\%$ encontrado en sangre de adulto. Entre esos linfocitos T CD4+, el $63,8 \pm 12,7\%$ expresaba CD45RA+ en su superficie. Esto sugiere que la población linfocítica dominante en el neonato es población *naive*.

En 119 muestras de sangre de cordón, Michie y Harvey¹¹ encontraron que el antígeno CD45RO+ estaba presente en menos del 10% de los linfocitos T de los neonatos control, y fue detectado en al menos el 17% de los linfocitos T ($p < 0,006$) de los neonatos con infección congénita probada. El modo de parto, la incompatibilidad materno-fetal y la presencia de líquido teñido de meconio no alteraban dichos resultados.

Resultados similares publicaron Brüning et al¹², quienes confirmaron que la proporción de linfocitos T CD45RO+ en el punto de corte 9% mostraba una especificidad del 94,6% y una sensibilidad del 64,1% como marcador de infección congénita o infección neonatal de comienzo precoz debido a causa viral o toxoplasmosis.

Tezuka et al¹³ sugirieron que la expresión aumentada de CD45RO+ (en los linfocitos T, B y en las células *natural killers* [NK]) podría actuar como marcador diagnóstico de sepsis neonatal, especialmente su determinación en los linfocitos T CD4+. Dichos autores observaron que alrededor del 90% de los linfocitos T en sangre de cordón de neonatos a término expresaban CD45RA+/CD45RO- y, como las concentraciones basales de CD45RO+ son bajas, no sorprende que pequeños incrementos sean fácilmente detectables.

En paralelo a este trabajo, Hodge et al¹⁴ evaluaron el fenotipo CD45RO y CD45RA/CD45RO (doblemente marcado) en neonatos sanos e infectados, registrando rangos de referencia para la expresión de CD45RA/CD45RO

TABLA 1. Datos clínicos de los 72 neonatos examinados según el grupo de estudio

	Sepsis neonatal de comienzo tardío (n = 24)	Control (n = 48)
Edad gestacional (días)*	241 (39,4)	252 (31,4)
Edad posconcepcional (días)*	250 (41,2)	259 (32,9)
Peso al nacer (g)*	1.915,8 (1.082,7)	2.468,6 (902,2)
Puntuación de Apgar, 1 min**	8 (6-8)	9 (7-9)
Puntuación de Apgar, 5 min**	9 (8-9)	10 (9-10)
Varón, n (%)	15 (62,5)	32 (66,6)

No existen diferencias significativas entre los grupos.

*Datos expresados como medias (desviación estándar).

** Datos expresados como medianas (rango intercuartílico).

y CD45RO en neonatos control de menos del 11% y del 19%, respectivamente, con un valor predictivo positivo (VPP) del 100%. Estos autores concluyeron que CD45RO es un marcador de activación tardía y que CD45RA/CD45RO (doblemente marcado) es un marcador de activación muy precoz (detectado en fases muy precoces de la infección). No se encontraron diferencias significativas en relación con la edad gestacional, modo de parto, presencia de distrés respiratorio, isoimmunización o tratamiento corticoideo o antibiótico en la madre o el neonato.

Nuestro estudio fue diseñado para evaluar la utilidad de los linfocitos T CD4+ como marcador diagnóstico de sepsis neonatal de comienzo tardío en neonatos pretérmino.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio de cohortes prospectivo con una muestra de 72 neonatos, menores de 259 días de edad gestacional, que se dividieron en dos grupos: sep-

sis tardía (n = 24) y controles no infectados (n = 48). Las muestras de sangre venosa periférica del grupo sepsis se obtuvieron en el momento en que la infección fue sospechada, después de las primeras 72 h de vida.

La tabla 1 expone los datos clínicos de los 72 neonatos examinados según el grupo de estudio.

El grupo sepsis incluye recién nacidos con:

1. Factores de riesgo de sepsis de transmisión horizontal: catéter central o venoso, ventilación mecánica, alimentación parenteral, intralípidos, sepsis previa y tratamiento antibiótico previo, exsanguinotransfusión.

2. Signos clínicos de infección que comienzan pasadas las primeras 72 h de vida¹⁵: malestar general, mala perfusión periférica/cianosis/palidez cutánea, hipotonía/letargia, disregulación térmica/fiebre, hipotensión, distensión abdominal, mala tolerancia digestiva/vómitos/diarrea, hepatoesplenomegalia, ictericia, hipoglucemia, coagulación intravascular diseminada, dificultad respiratoria/incremento de los requerimientos ventilatorios o de oxígeno, irritabilidad, convulsiones.

3. Datos analíticos indicativos de infección: leucocitosis > 20.000/ml o leucopenia < 5.000/ml; índice neutrófilos inmaduros/neutrófilos totales (NI/NT) > 0,2; recuento plaquetario < 150.000/ml; PCR > 10,0 mg/l.

4. Todos los neonatos del grupo sepsis recibieron tratamiento antibiótico durante 7-10 días.

La edad gestacional media de este grupo fue de 241 días y la edad posconcepcional media, de 250 días (tabla 1).

En el grupo sepsis, 14 de 24 neonatos tuvieron cultivo de sangre y/o LCR positivo. La tabla 2 muestra los microorganismos causantes.

Un total de 10 de los 24 neonatos incluidos en el grupo sepsis tuvieron cultivos negativos. Éstos son los diag-

TABLA 2. Microorganismos causantes de la sepsis neonatal de comienzo tardío y diagnósticos al alta además de sepsis tardía

Microorganismo	Episodios (n = 14/24)	Diagnósticos
<i>Estafilococos coagulasa negativa</i> (2 cultivos positivos)	5	Edema pulmonar bilateral, anemia, hipotensión que precisó drogas vasoactivas Distrés respiratorio que requirió ventilación mecánica Quilotórax bilateral, neumotórax izquierdo Neumonía Enterocolitis necrosante
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	Meningitis, estatus convulsivo, SIADH Meningitis Sepsis
<i>Escherichia coli</i>	2	Infección del tracto urinario, insuficiencia renal (diálisis peritoneal por acidosis e hipopotasemia) Infección del tracto urinario
<i>Enterobacter spp.</i>	2	Hemorragia intraventricular masiva Sepsis
<i>Serratia marcescens</i>	1	Infección del tracto urinario
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	Onfalitis

SIADH: síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética.

nósticos en el momento del alta además de sepsis tardía: un neonato fallecido por fallo multiorgánico, un neonato con neumonía del lóbulo superior derecho, un neonato con enterocolitis necrosante, dos neonatos con meningitis (el LCR mostraba pleocitosis, hiperproteinorraquia, hipogluorraquia, cultivo negativo).

El grupo control incluye neonatos ingresados en la unidad neonatal a causa de síndrome de distrés respiratorio tipo II, hijo de madre diabética, asfixia perinatal moderada, isoimmunización, bajo peso al nacer, hiperbilirrubinemia, hijo de madre usuaria de drogas por vía parenteral, malformación del tracto urinario sin evidencia de infección, hipoglucemia, poliglobulia, nacidos de embarazo no controlado, soplo sistólico. En resumen, el grupo control comprende neonatos con enfermedad no infecciosa. Todos ellos evolucionaron favorablemente sin precisar tratamiento antibiótico. Previamente se había comprobado que no existían diferencias significativas en términos de datos clínicos entre estos neonatos.

La edad gestacional media y posconcepcional media fue 252 días y 259 días, respectivamente, para el grupo control ($p = 0,29$ con respecto al grupo sepsis) (tabla 1). De todos los neonatos asignados al grupo control se obtuvo muestra de sangre después de las primeras 72 h de vida.

Para la tinción de los linfocitos se usó 0,5 ml de sangre venosa periférica que fueron recogidos en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y conservados a 4 °C. Dos alícuotas de 20 μ l de sangre completa se separaron en dos tubos diferentes (dos tubos por cada neonato, un tubo para añadir anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo, y otro tubo para el control isotipo, 40 μ l en total). Los eritrocitos se lisaron (ImmunoPrep® Reagent System, Beckman Coulter®) y se lavaron dos veces.

Se añadieron los siguientes anticuerpos monoclonales a los tubos:

Tubo 1: 10 μ l de CD45RA (*mouse anti-human IgG1, CD45RA-PECy5*, conjugado con tercer color) + 5 μ l de CD45RO (*mouse monoclonal antibody to human CD45RO conjugado a FITC [isotiocianato de fluoresceína, verde]*) + 2 μ l de CD4 (*mouse monoclonal antibody to human CD4-RPE [CD4 R-ficoeritrina, rojo]*) (CD45RA: CD45RA-PECy5, Cytognos, Avda. del Campo Charro, s/n. 37007 Salamanca; CD45RO y CD4: Caltag Laboratories, 1849 Old Bayshore Hwy., Suite 200, Burlingame, California, EE.UU.).

Tubo 2 (control isotipo): 10 μ l *mouse isotype control IgG1-PECY5*, Cytognos + 5 μ l de CD45RO *mouse isotype control IgG2a-FITC* (Caltag Laboratories) + 2 μ l de CD4 *mouse isotype control IgG2a-RPE* (Caltag Laboratories).

Los tubos fueron incubados a 4 °C durante al menos 20 min, después se añadió PBS (suero salino tampón fos-

fato) + BSA (albúmina bovina al 0,3%) + EDTA, hasta alcanzar 1 ml y se analizó por citometría de flujo. Este método identifica los inmunofenotipos de las poblaciones celulares de acuerdo con los antígenos de superficie.

Se calculó el índice NI/NT dividiendo el número de precursores neutrófilos entre el total de neutrófilos. Un índice hasta 0,2 se considera normal¹⁶⁻¹⁹.

La PCR se determinó mediante nefelometría (Behring Nephelometer Analyzer II), usando muestras de 0,5 ml de sangre completa. Se define una PCR patológica cuando excede 10,0 mg/l^{3,20-23}.

Las variables cuantitativas se resumen en su media y desviación estándar (DE). En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos. Se analizaron las diferencias en media entre los grupos de estudio con el test de la t de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías) y/o el análisis de la variancia (ANOVA). En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

Se estimaron las curvas de rendimiento diagnóstico para los marcadores con el fin de detectar los puntos discriminativos o de corte de detección de sepsis. Se han calculado las áreas bajo la curva y sus intervalos de confianza (IC) del 95% para evaluar la capacidad diferenciadora global de los marcadores.

Se calcularon los siguientes índices de validez y su IC 95%: sensibilidad, especificidad, VPP y valor predictivo negativo (VPN), valor global de la prueba (VGP) (grado en el que un test representa el valor verdadero) y razón de verosimilitud positiva (RVP) y negativa (RVN).

Se ajustó un modelo de regresión logística, con el objeto de evaluar qué marcador era más predictor de sepsis. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas. En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05. El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 11.0.

RESULTADOS

Marcadores linfocitarios

El porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- fue significativamente mayor en el grupo sepsis neonatal tardía frente al grupo control ($7,0 \pm 2,8\%$ frente a $3,5 \pm 1,9\%$; $p = 0,001$) (tabla 3).

La figura 1 muestra que el área bajo la curva ROC (*receiver operating characteristic*) de la variable porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- es 0,85 y que el mejor punto de corte es superior al 3,5%. La curva ROC también indica que para ese punto de corte superior al 3,5%, como marcador de sepsis neonatal tardía, esta

TABLA 3. Variables linfocitarias recogidas en los 72 neonatos examinados según el grupo de estudio

Porcentaje	Sepsis neonatal de comienzo tardío (n = 24) Media (DE)	Control (n = 48) Media (DE)	p
RO(+)/RA(-)	7,0 (2,8)	3,5 (1,9)	0,001
RA(+)/RO(-)	79,6 (6,3)	84,9 (5,6)	0,02

RO(+)/RA(-): porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA-.
RA(+)/RO(-): porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RA+/CD45RO-.
DE: desviación estándar.

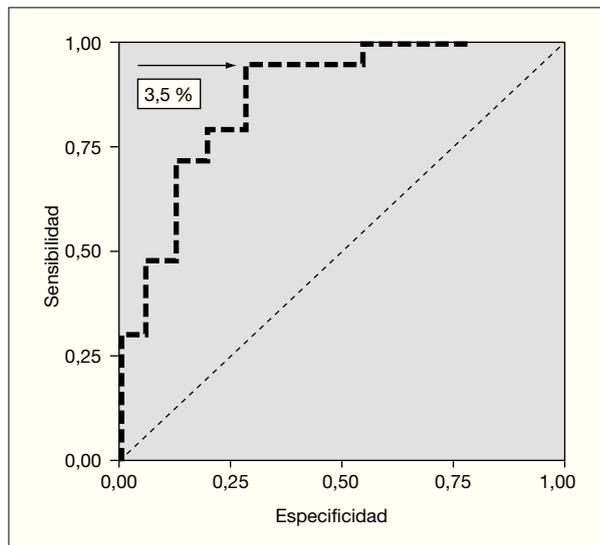


Figura 1. Curva ROC (receiver operating characteristics) del parámetro porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- en el grupo sepsis neonatal de comienzo tardío (n = 24) comparado con el grupo control (n = 48). El área bajo la curva es de 0,85; el punto de corte óptimo, de 3,5% (sensibilidad, 94,1%; especificidad, 69,2%).

variable muestra una sensibilidad del 94,1% (IC 95%: 69,2-99,7), una especificidad del 69,2% (IC 95%: 38,9-89,6), VPP del 80,0% (IC 95%: 55,7-93,4), VPN del 90,0% (IC 95%: 54,1-99,5), un VGP del 83,3% (IC 95%: 64,5-93,7), RVP de 3,1 (1,3-7,0) y RVN de 0,1 (0,0-0,6) (tabla 4).

El porcentaje de linfocitos TCD4+/CD45RO+/CD45RA- superior al 3,5% alcanza una *odds ratio* de 36,0 (IC 95%: 3,5-373,2; p < 0,001), en la que la sensibilidad es del 94,1% y la especificidad, del 69,2%.

En el grupo sepsis neonatal tardía la media del porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- fue similar para los neonatos con cultivo de sangre negativos comparados con aquéllos con infección probada bacteriológicamente.

Proteína C reactiva

La figura 2 muestra que el área bajo la curva ROC de la variable de PCR es 0,66 y el mejor punto de corte, > 10,0 mg/l. La curva ROC también indica que en ese punto de corte superior al 10,0 mg/l, como marcador de sepsis neonatal tardía, esta variable muestra una sensibilidad de 57,1% (IC 95%: 29,6-81,2), especificidad del 68,4% (IC 95%: 43,5-86,4), VPP del 57,1% (IC 95%: 29,6-81,2), VPN del 68,4% (IC 95%: 43,5-86,4), VGP del 63,6% (IC 95%: 45,1-79,0), RVP de 1,8 (0,8-4,0) y RVN de 0,6 (0,3-1,2) (tabla 4).

Combinación de test diagnósticos

Para comprobar si el marcador linfocitario propuesto podría mejorar la validez de las variables generalmente usadas para el diagnóstico de la sepsis neonatal (PCR, NI/NT), se intentaron varias combinaciones de dichas variables con nuestro marcador. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de las variables linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- y PCR.

TABLA 4. Índices de validez de criterio y su correspondiente intervalo de confianza del 95 % para los puntos de corte identificados de las variables

		Sepsis neonatal de comienzo tardío	Controles	Sensibilidad (%) [IC 95%]	Especificidad (%) [IC 95%]	VPP (%) [IC 95%]	VPN (%) [IC 95%]	VGP	RVP (%) [IC 95%]	RVN (%) [IC 95%]
RO(+)/RA(-)	(+)	16	4	94,1	69,2	80,0	90,0	83,3	3,1	0,1
> 3,5	(-)	1	9	[69,2-99,7]	[38,9-89,6]	[55,7-93,4]	[54,1-99,5]	[64,5-93,7]	[1,3-7,0]	[0,0-0,6]
	Total	17	13							
RA(+)/RO(-)	(+)	14	5	82,4	61,5	73,7	72,7	73,3	2,1	0,3
< 84,5	(-)	3	8	[55,8-95,3]	[32,3-84,9]	[48,6-89,9]	[39,3-92,7]	[53,8-87,0]	[1,0-4,4]	[0,1-0,9]
	Total	17	13							
PCR > 10,0 mg/l	(+)	8	6	57,1	68,4	57,1	68,4	63,6	1,8	0,6
	(-)	6	13	[29,6-81,2]	[43,5-86,4]	[29,6-81,2]	[43,5-86,4]	[45,1-79,0]	[0,8-4,0]	[0,3-1,2]
	Total	14	19							

RO(+)/RA(-): porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- de más del 3,5%; RA(+)/RO(-): porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RA+/CD45RO- por debajo del 84,5%, y PCR > 10,0 mg/l, al comparar el grupo sepsis neonatal de comienzo tardío (n = 24) y el grupo control (n = 48).

IC: intervalo de confianza; PCR: proteína C reactiva; VGP: valor global de la prueba; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo; RVP: razón de verosimilitud positiva; RVN: razón de verosimilitud negativa.

La proporción de neonatos sanos mayores de 72 h de vida que tienen una PCR inferior a 10,0 mg/l y un porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- por debajo del 3,5 % (especificidad) es del 94,7 % (IC 95 %: 71,9-99,7). La probabilidad de que un neonato con ambos test positivos (PCR > 10,0 mg/l y porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- > 3,5 %) tenga una sepsis tardía (VPP) es del 85,7 % (IC 95 %: 42,0-99,2) (tabla 5). La proporción de neonatos infectados mayores de 72 h de vida con ambos test positivos (PCR > 10,0 mg/l y porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- > 3,5 %) (sensibilidad) es del 100,0 % (IC 95 %: 78,1-100,0), aunque, en este caso, la especificidad baja a 30,8 % (IC 95 %: 10,4-61,1).

Finalmente, la probabilidad de que un neonato con ambos test negativos (PCR < 10,0 mg/l y porcentaje de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- < 3,5 %) no tenga una sepsis tardía (VPN) es del 100,0 % (IC 95 %: 39,6-100,0) (tabla 5).

La inclusión del NI/NT en el punto de corte 0,2 no mejoró la validez diagnóstica del marcador linfocitario.

DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos reflejan que, como marcador de sepsis neonatal de comienzo tardío en neonatos pretérmino, una proporción de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- superior al 3,5 % en sangre periférica tiene una sensibilidad del 94,1 %, un VPP del 80 % y un VPN del 90 %, aunque con una especificidad del 69,2 %. Así, un neonato con este marcador presenta una *odds ratio* para esta enfermedad de 36,0 ($p < 0,001$).

La proporción de neonatos pretérmino sanos con una PCR < 10,0 mg/l y/o proporción de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- por debajo del 3,5 % (especificidad) es del 94,7 %, aunque con una sensibilidad del 46,2 %. La probabilidad de que un neonato con ambos test positivos (PCR > 10,0 mg/l y linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- > 3,5 %) esté realmente infectado es del 85,7 % (VPP).

De esta forma, el uso de la combinación de estos test mejora la especificidad, el VPP y el VPN, del uso aislado de

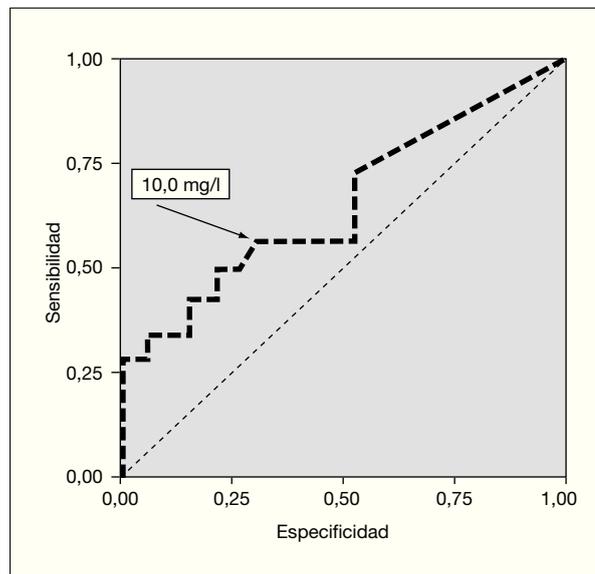


Figura 2. Curva ROC (receiver operating characteristics) del parámetro proteína C reactiva (mg/l) en el grupo sepsis neonatal de comienzo tardío ($n = 24$) comparado con el grupo control ($n = 48$). El área bajo la curva es de 0,66; el punto de corte óptimo, de 10,0 mg/l (sensibilidad, 57,1 %; especificidad, 68,4 %).

la proporción de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA-, y también mejora la especificidad, el VPP, el VPN y el VGP del uso aislado de la PCR.

Dado que algunos neonatos sufren más de un episodio de infección nosocomial, también evaluamos el uso de este marcador en neonatos con infección nosocomial recurrente. Este análisis reveló que las células CD45RO+ volvían a las concentraciones observadas en los neonatos no infectados, independientemente de si el neonato había sufrido uno o varios episodios de infección. De todas formas, el tamaño poblacional era demasiado pequeño para establecer conclusiones definitivas a este respecto.

La proporción de neonatos pretérmino con sepsis tardía con ambos test positivos (sensibilidad) es del 100 %.

TABLA 5. Índices de validez de criterio y su correspondiente intervalo de confianza del 95 % para los puntos de corte identificados de las variables

Sepsis neonatal de comienzo tardío	PCR > 10,0 mg/l o RO(+)/RA(-) > 3,5 %	PCR > 10,0 mg/l y RO(+)/RA(-) > 3,5 %
Sensibilidad [% (IC 95 %)]	100,0 (78,1-100,0)	46,2 (20,4-73,9)
Especificidad [% (IC 95 %)]	30,8 (10,4-61,1)	94,7 (71,9-99,7)
Valor predictivo positivo [% (IC 95 %)]	60,0 (40,7-76,8)	85,7 (42,0-99,2)
Valor predictivo negativo [% (IC 95 %)]	100,0 (39,6-100,0)	70,8 (48,7-86,6)
Valor global de la prueba	62,5 (43,7-78,3)	74,2 (55,1-87,5)
Razón de verosimilitud positiva (IC 95 %)	1,2 (0,9-1,4)	8,3 (1,1-61,0)
Razón de verosimilitud negativa (IC 95 %)	0,00 (-)	0,6 (0,3-1,0)

PCR superior a 10,0 mg/l y RO(+)/RA(-) (linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- de más del 3,5 %) combinados en un test diagnóstico, al comparar el grupo sepsis neonatal de comienzo tardío ($n = 24$) y el grupo control ($n = 48$).
IC: intervalo de confianza; PCR: proteína C reactiva.

Y la probabilidad de que un neonato con ambos test negativos no tenga una sepsis tardía es del 100% (VPN).

Junto con el NI/NT, la PCR ha sido la variable más ampliamente usada para el diagnóstico de la sepsis neonatal. De todas formas, la PCR tiene un bajo VPP, puesto que a menudo se eleva en situaciones diferentes a la infección (p. ej., asfixia perinatal, síndrome de distrés respiratorio, hemorragia intracerebral, aspiración meconial)⁵.

Aunque se han usado varios puntos de corte para la PCR (> 6, 7, 9, 10 mg/l) y diferentes momentos para su determinación (horas, días), existe mucha variación en la literatura médica acerca del valor diagnóstico de la determinación de las concentraciones de la PCR, con rangos de sensibilidad de 29-90%, especificidad de 41-100%, VPP de 18-100% y VPN de 38-98%. Cuando varios marcadores se combinan para el diagnóstico de la sepsis neonatal existe también gran variación. La combinación más comúnmente usada es la PCR junto a valores hematológicos (recuento leucocitario, NI/NT, recuento de neutrófilos), lo cual arroja rangos de sensibilidad de 22-75%, de especificidad de 45-98%, de VPP de 9-71% y de VPN de 63-95%².

Blommdahl et al²⁴ usaron PCR y procalcitonina como marcadores para el diagnóstico de sepsis neonatal. Cuando una de estas variables es positiva, la sensibilidad de la combinación es del 75%, la especificidad del 84%, el VPP del 14% y el VPN del 96%. Cuando ambas variables son positivas, los respectivos valores son del 58, 86, 28 y 96% (rangos no publicados). Ninguno de los marcadores estudiados por dichos autores fue válido por sí solo.

Muchos autores argumentan que los diferentes puntos de corte de las variables, los diferentes métodos de medición, el diseño de los estudios, la definición de sepsis y el amplio rango de edades posnatales son causantes de la ausencia de consenso general acerca de la validez de los marcadores de infección neonatal^{25,26}.

Desde hace algún tiempo, algunos autores defienden el uso de diferentes puntos de corte para los marcadores de sepsis neonatal según las horas de vida del neonato. Por ejemplo, Chiesa et al²⁷ identificaron diferentes puntos de corte para la PCR en función de las horas de vida: 4 mg/l al nacer y 10 mg/l a las 24 h y 48 h de vida. Este hallazgo es consistente con el valor óptimo de la PCR para el diagnóstico de la sepsis neonatal precoz de 5 mg/l observado en nuestro estudio (antes de las primeras 72 h de vida, resultados no mostrados), y 10 mg/l para la sepsis neonatal tardía (después de las primeras 72 h de vida).

Hodge et al²⁸ publicaron que un conjunto de marcadores (CD69 en la superficie de las células NK, y CD45RA, CD45RO, CD25 y CD69 en la superficie de los linfocitos T de sangre periférica) es la combinación más sensible y específica para el diagnóstico de sepsis neonatal. Al igual que nosotros, propusieron que los marcadores de activación estudiados en la superficie de los linfocitos se estudian más fácilmente que los marcadores

en la superficie de los neutrófilos, puesto que estos últimos se alteran más por la apoptosis y por los medios de conservación (heparina, EDTA).

Ng et al²⁹ rechazaron el uso de CD45RO como marcador de sepsis nosocomial en su estudio con una población de neonatos de muy bajo peso al nacer al no alcanzar dicho marcador una sensibilidad y una especificidad del 75%. De todas formas, estos autores también sugirieron el uso de una combinación de marcadores (CD64, PCR, interleucina 6 [IL-6]), al no encontrar ningún marcador válido por sí solo para el diagnóstico de la sepsis neonatal.

Por el momento, ningún autor ha determinado el punto de corte diferenciador de sepsis para la PCR, cuenta leucocitaria, NI/NT o cualquier otro marcador, usando los criterios de selección universalmente aceptados aplicados a las diferentes edades gestacionales y edades posconcepcionales^{30,31}.

En el medio hospitalario, la determinación de CD45RO puede obtenerse en 120 min y su coste en nuestro centro equivale a 2,5 veces la determinación de las concentraciones de PCR.

Nuestros hallazgos observados en neonatos de 37 semanas de edad gestacional o menos sugieren la validez de la subpoblación de linfocitos T CD4+/CD45RO+/CD45RA- como marcador de sepsis neonatal de comienzo tardío. El desarrollo de un método automatizado, reproducible y de bajo coste para la determinación de este marcador permitiría su uso en hospitales de cualquier nivel.

Dado el escaso tamaño de la muestra es necesario un estudio más amplio para comprobar estos resultados. También es necesario para determinar si es un marcador diagnóstico válido para la sepsis precoz, e independiente del peso al nacer, edad gestacional, microorganismo causante y tratamiento antibiótico o corticoideo en la madre o en el recién nacido.

BIBLIOGRAFÍA

1. García-Prats JA, Cooper TR, Schneider VF, Stager CE, Hansen TN. Rapid detection of microorganisms in blood cultures of newborn infants utilizing an automated blood culture system. *Pediatrics*. 2000;105:523-7.
2. Fowlie PW, Schmidt B. Diagnostic tests for bacterial infection from birth to 90 days: A systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998;78:F92-8.
3. Ehl S, Gering B, Bartmann P, Högel J, Pohlandt F. C reactive protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection. *Pediatrics*. 1997;99:216-21.
4. Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellmann A, Reinhart K. Procalcitonin: A new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection*. 1997;25:329-34.
5. Chiesa C, Pacifico L, Mancuso G, Panero A. Procalcitonin in *Pediatrics*: Overview and challenge. *Infection*. 1998;26:236-41.
6. Allen SR. Management of asymptomatic term neonates whose mothers received intrapartum antibiotics. Part 2: Diagnostic test and management strategies. *Clin Pediatr*. 1997;36:617-24.

7. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. *Pediatrics*. 1997;99:489-96.
8. Escobar GJ, Li DK, Armstrong MA, Gardner MN, Folck BF, Verdi JE, et al. Neonatal sepsis workups in infants \geq 2,000 grams at birth: A population-based study. *Pediatrics*. 2000;106:256-63.
9. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannet I, Hulstaert F, Hamilton C, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr*. 1992;120:216-22.
10. Rabian-Herzog C, Lesage S, Gluckman E. Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 1992;9 Suppl 1:64-7.
11. Michie C, Harvey D. Can expression of CD45RO, a T-cell surface molecule, be used to detect congenital infection? *Lancet*. 1994;343:1259-60.
12. Brüning T, Daiminger A, Enders G. Diagnostic value of CD45RO expression on circulating T lymphocytes of fetuses and newborn infants with pre-, peri- or post-natal infection. *Clin Exp Immunol*. 1997;107:306-11.
13. Tezuka T, Sugita K, Mizobe N, Goi K, Miyamoto N, Nakamura M, et al. Transient increase in CD45RO expression on T lymphocytes in infected newborns. *Pediatr Res*. 1998;43:283-90.
14. Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. Surface activation markers of T lymphocytes: role in the detection of infection in neonates. *Clin Exp Immunol*. 1998;113:33-8.
15. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, et al. Late-onset sepsis in very low birthweight neonates: A report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr*. 1996;129:63-71.
16. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. Part I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr*. 1979;95:89-98.
17. Philip AG, Tito AM, Gefeller O, Speer CP. Neutrophil elastase in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13:323-6.
18. Da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. Accuracy of leukocyte indices and C reactive protein for diagnosis of neonatal infection: A critical review. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14:362-6.
19. Schelonka RL, Yoder BA, Hall RB, Trippett TM, Louder DS, Hickman JR, et al. Differentiation of segmented and band neutrophils during the early newborn period. *J Pediatr*. 1995;127:298-300.
20. Jurgens ES, Henderson DC. Inflammatory and immunological markers in preterm infants: correlation with disease. *Clin Exp Immunol*. 1996;105:551-5.
21. Hogevik H, Olaison L, Anderson R, Alestig K. C reactive protein is more sensitive than erythrocyte sedimentation rate for diagnosis of infective endocarditis. *Infection*. 1997;25:82-5.
22. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecules, and C reactive protein in preterm very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1997;77:F221-7.
23. Hengst JM. The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. *Adv Neonatal Care*. 2003;3:3-13.
24. Blommendahl J, Janas M, Laine S, Miettinen A, Ashorn P. Comparison of Procalcitonin with CRP and different white blood cell count for diagnosis of culture-proven neonatal sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2002;34:620-2.
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. Malik A, Hui CP, Pennie RA, Kirpalani H. Beyond the complete blood cell count and C-reactive protein: A systematic review of modern diagnostic test for neonatal sepsis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157:511-6.
27. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: Influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem*. 2003;49:60-8.
28. Hodge G, Hodge S, Han P, Haslam R. Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:125-9.
29. 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 birth weight infants. *Pediatr Res*. 2002;51:296-303.
30. Chiesa C, Panero A, Osborn JF, Simonetti AF, Pacifico L. Diagnosis of neonatal sepsis: A clinical and laboratory challenge. *Clin Chem*. 2004;50:279-87.
31. Polin RA. The "ins and outs" of neonatal sepsis. *J Pediatr*. 2003;143:3-4.

Fe de errores

En el artículo titulado "Encuesta sobre la actividad investigadora en los servicios de neonatología en España en el período 2000-2004" (*An Esp Pediatr* 2002;67(4):301-8) se ha producido un error en el apellido del segundo autor. El nombre correcto es E. Villamor.