



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CODIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PAGINA

1 de 2

Neiva, 24 de enero de 2018

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Emilce Beltrán Zúñiga, con C.C. No. 34319919,

Laura Ximena Fernandez Cruz, con C.C. No. 1081153290,

\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,

\_\_\_\_\_, con C.C. No. \_\_\_\_\_,

autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado \_\_\_\_\_

titulado: Interleuquina 6: utilidad en la aproximación diagnóstica de sepsis neonatal

\_\_\_\_\_  
presentado y aprobado en el año 2018 - como requisito para optar al título de

Pediatra;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.

Vigilada Mineducación



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CODIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PAGINA

2 de 2

- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Enrique Burbán J.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Laura Ximena Fernández C.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Interleuquina 6: utilidad en la aproximación diagnóstica de sepsis neonatal

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Beltrán Zúñiga	Emilce
Fernández Cruz	Laura Ximena

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Narváez Rojas	Carlos Fernando

**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Fonseca Becerra	Carlos Eduardo

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Pediatra

FACULTAD: Salud

PROGRAMA O POSGRADO: Pediatría

CIUDAD: Neiva      AÑO DE PRESENTACIÓN: 2018      NÚMERO DE PÁGINAS: 84

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Vigilada mieducación



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 3
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

Diagramas \_\_\_ Fotografías \_\_\_ Grabaciones en discos \_\_\_ Ilustraciones en general x \_\_\_ Grabados \_\_\_  
Láminas \_\_\_ Litografías \_\_\_ Mapas \_\_\_ Música impresa \_\_\_ Planos \_\_\_ Retratos \_\_\_ Sin ilustraciones \_\_\_  
Tablas o Cuadros x \_\_\_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: No

MATERIAL ANEXO: No

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Sepsis	Sepsis	6. _____	_____
2. Interleuquina 6	Interleukin 6	7. _____	_____
3. Neonato	Newborn	8. _____	_____
4. Biomarcadores	Biomarkers	9. _____	_____
5. Citoquinas	Cytokines	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El diagnóstico de la sepsis neonatal constituye un desafío para el pediatra. El patrón de oro, el hemocultivo solo es positivo en aproximadamente un 25% y existe la necesidad de mejores métodos diagnósticos. El objetivo de este estudio fue evaluar la precisión diagnóstica de la interleuquina 6 como marcador de infección en neonatos con sospecha de sepsis. En un diseño de casos y controles, se incluyó un grupo de neonatos con sospecha de sepsis neonatal y otro grupo sin causas infecciosas hospitalizados en el Hospital Universitario de Neiva, durante un año. Se determinó en ambos grupos los niveles plasmáticos de interleuquina 6 y se compararon sus resultados con otros marcadores de laboratorio usados en sepsis. Se incluyeron 167 pacientes, 64 casos y 103 controles. Los niveles séricos de proteína C reactiva presentaron valores más altos en los casos que en los controles ( $p= 0.012$ ) y la mediana de los niveles de procalcitonina no tuvieron una diferencia significativa. Los hemocultivos se realizaron en el 89.06% de los casos y el 14.04% fueron positivos. En el rendimiento operativo de IL 6 se encontró una sensibilidad de 36% y especificidad de 81% con un punto de corte de 18.4 pg/m. La mediana de los

Vigilada mieducación



niveles plasmáticos de IL 6 en los casos fue más alta. Podemos concluir que los neonatos con sepsis temprana tienen niveles más altos de IL 6, pero se recomienda atención al momento de interpretar los resultados, además ante la especificidad y sensibilidad se sugiere su uso como prueba confirmatoria.

**ABSTRACT:** (Máximo 250 palabras)

The diagnosis of neonatal sepsis is a challenge for the pediatrician. The gold standard, the blood culture alone is positive by approximately 25% and there is a need for better diagnostic methods. The aim of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of interleukin 6 as a marker of infection in neonates with suspected sepsis. In a case-control design, a group of neonates with suspected neonatal sepsis and another group without infectious causes hospitalized at the University Hospital of Neiva, were included for one year. Plasma levels of interleukin 6 were determined in both groups and their results were compared with other laboratory markers used in sepsis. 167 patients, 64 cases and 103 controls were included. The serum levels of C-reactive protein showed higher values in the cases than in the controls ( $p = 0.012$ ) and the median of the procalcitonin levels did not have a significant difference. The blood cultures were performed in 89.06% of the cases and 14.04% were positive. In the operative performance of IL 6, a sensitivity of 36% and specificity of 81% was found with a cut-off point of 18.4 pg / m. The median plasma levels of IL 6 in the cases were higher. We can conclude that neonates with early sepsis have higher levels of IL 6, but attention is recommended when interpreting the results, and in view of specificity and sensitivity, its use as a confirmatory test is suggested.

**APROBACION DE LA TESIS**

Nombre Presidente Jurado: *Jairo Anbriso Rodríguez*

Firma: *[Signature]*

Nombre Jurado: *Henny Borrero B.*

Firma: *[Signature]*

Nombre Jurado: *Marta Lago J.*

Firma: *[Signature]*

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

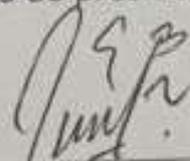
---

---

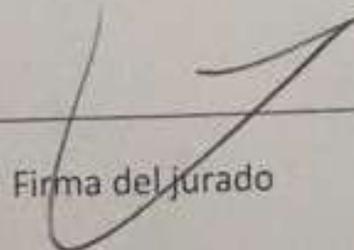
---



Firma de presidente de jurado



Firma del jurado



Firma del jurado

INTERLEUQUINA (IL)-6: UTILIDAD EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE  
SEPSIS NEONATAL

EMILCE BELTRÁN ZUÑIGA  
LAURA XIMENA FERNÁNDEZ CRUZ

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA  
NEIVA, HUILA  
2018

INTERLEUQUINA (IL)-6: UTILIDAD EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE  
SEPSIS NEONATAL

EMILCE BELTRÁN ZUÑIGA  
LAURA XIMENA FERNÁNDEZ CRUZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
Especialista en Pediatra

Asesores:  
CARLOS FERNANDO NARVÁEZ MD. PH.D.  
Maestría en Microbiología con énfasis Inmunología  
Universidad Javeriana  
Doctorado en Ciencias Biológicas  
Universidad Javeriana

CARLOS EDUARDO FONSECA MD.  
Medico y Pediatra  
Universidad Nacional de Colombia

Línea de investigación:  
Neonatología - Infectología

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD,  
ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA  
NEIVA, HUILA  
2018

Nota de aceptación:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

-----  
Firma del presidente del jurado

\_\_\_\_\_  
Firma del jurado

\_\_\_\_\_  
Firma del jurado

Neiva, Enero 29 del 2018.

## DEDICATORIA

*A Dios por permitirnos realizar nuestros sueños.*

*A nuestros familiares por el apoyo incondicional y por confiar en nuestras capacidades*

**EMILCE  
LAURA XIMENA**

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan sus agradecimientos

A los asesores Doctores CARLOS FERNANDO NARVÁEZ MD. PH.D, Maestría en Microbiología con énfasis Inmunología, Universidad Javeriana, Doctorado en Ciencias Biológicas Universidad Javeriana y CARLOS EDUARDO FONSECA MD. Medico y Pediatra Universidad Nacional de Colombia, por sus conocimientos y aportes valiosos a la investigación.

A la UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA Facultad de salud, por darnos la oportunidad de estudiar y ser profesionales.

A todos los participantes en la investigación mil gracias.

## CONTENIDO

	Pág.
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 DEFINICIÓN	18
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	19
2.3 FACTORES DE RIESGO	19
2.4 AGENTES ETIOLÓGICOS	20
2.5 FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS	22
2.5.1 Reconocimiento y activación del sistema inmune innato	22
2.5.2 Células inflamatorias; reclutamiento y erradicación de patógenos	26
2.5.3 Activación de respuesta inmune adaptativa	27
2.5.4 De una respuesta localizada a una “tormenta de citocinas”.	27
2.5.5 Apoptosis de linfocitos	31
2.5.6 Coagulación y sepsis	32
2.6 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA SEPSIS NEONATAL	32
2.7 DIAGNÓSTICO DE SEPSIS NEONATAL	34
2.7.1 PCR y Procalcitonina en el diagnóstico de sepsis neonatal	35
2.7.2 Biomarcadores inflamatorios en el Diagnóstico de sepsis	39
2.7.3 Interleuquina 6 en el diagnóstico de sepsis neonatal	40
2.8 TRATAMIENTO	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GENERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. METODOLOGÍA	43
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	43
4.2 HIPÓTESIS OPERATIVA	43

		Pág.
4.3	POBLACIÓN	43
4.3.1	Criterios de inclusión	43
4.3.2	Criterios de exclusión	44
4.4	TAMAÑO DE LA MUESTRA	44
4.5	MUESTREO	44
4.6	PROCEDIMIENTO	44
4.7	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	45
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
5.1	CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN	49
5.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
6.	CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO	51
6.1	SITIO DE INVESTIGACIÓN	51
6.2	ARCHIVO DE DATOS Y SISTEMATIZACIÓN	51
6.3	CONFIDENCIALIDAD	51
7.	RESULTADOS	52
7.1	ANÁLISIS DESCRIPTIVO	52
7.2	ANÁLISIS BIVARIADO	56
7.3	ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	62
7.4	ANÁLISIS MULTIVARIADO	65
7.5	ANÁLISIS DE RENDIMIENTO DIAGNOSTICO	66
8.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	70
9.	DISCUSIÓN	72
10.	CONCLUSIONES	76
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXOS	82

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Períodos de la transmisión de las infecciones neonatales	20
Tabla 2	Variables clínicas y de laboratorio usadas para el diagnóstico de sepsis en recién nacidos	37
Tabla 3	Análisis descriptivo y bivariado de los antecedentes perinatales	53
Tabla 4	Análisis descriptivo y bivariado de los datos de hospitalización	54
Tabla 5	Análisis descriptivo y bivariado de los registros clínicos y paraclínicos	55
Tabla 6	Análisis descriptivo y bivariado de sepsis e Interleucina 6	56
Tabla 7	Análisis multivariado para factores de asociación independientes mediante modelamiento estadístico por regresión logística	65
Tabla 8	Análisis de rendimiento diagnóstico para IL-6 con punto de corte > 4.6 pg/ml	66
Tabla 9	Análisis de rendimiento diagnóstico para IL-6 con punto de corte > 9.2 pg/ml.	67
Tabla 10	Análisis de rendimiento diagnóstico para IL-6 con punto de corte > 18.4 pg/ml.	68

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Receptores de reconocimiento de patógenos. Tomada de: <i>Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer</i> . <i>Critical care medicine</i> . 2009;37(1):291-304	25
Figura 2	Respuesta del huésped en sepsis. "Severe Sepsis and Septic Shock. <i>New England Journal of Medicine</i>	30
Figura 3	Distribución de la edad cronológica en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana de la edad y los rangos intercuartílicos son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable	57
Figura 4	Distribución del tiempo de ruptura prematura de membranas en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana y los rangos intercuartílicos del tiempo en horas son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable	59
Figura 5	Distribución del conteo leucocitario en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana y los rangos intercuartílicos del conteo leucocitario, neutrófilos y linfocitos son relativamente menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de las variables	59
Figura 6	Distribución de los reactantes de fase aguda en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana y los rangos intercuartílicos de PCR y procalcitonina son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable	60

	Pág.	
Figura 7	Distribución de la interleucina 6 en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana de la concentración sérica de interleucina 6 y los rangos intercuartílicos son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable	61
Figura 8	Distribución de la interleucina 6 por positividad de hemocultivos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana de la concentración sérica de interleucina 6 y los rangos intercuartílicos son menores en el grupo de los hemocultivos negativos que en los positivos, además se sugiere una distribución no normal de la variable	62
Figura 9	Correlación entre edad cronológica e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde no se aprecia ninguna correlación	63
Figura 10	Correlación entre edad gestacional e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde no se aprecia ninguna correlación	63
Figura 11	Correlación entre PCR e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde no se aprecia ninguna correlación	64
Figura 12	Correlación entre procalcitonina e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde se aprecia una correlación del 36.71%	64
Figura 13	Análisis de construcción de curva ROC para IL-6. Encontrando un área bajo la curva del 61.73%.	69

## LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1 Distribución de ruptura prematura de membranas en los controles y en los casos. Diagrama de barras, se aprecia una mayor proporción en el grupo de los casos	58
Grafica 2 Distribución de corioamnionitis en los controles y en los casos. Diagrama de barras, se aprecia una mayor proporción en el grupo de los casos	58
Grafica 3 Distribución de interleucina 6 positiva (>18.4 pg/dl) en los controles y en los casos. Diagrama de barras, se aprecia una mayor proporción en el grupo de los casos	61

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Consentimiento informado para participantes de investigación	83
Anexo B. Instrumento	86

## RESUMEN

**Introducción:** Las manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal varían desde taquipnea, irritabilidad a hipotermia y su diagnóstico constituye un desafío para el pediatra, quien intenta obtener un diagnóstico más certero y oportuno sin lograr una buena especificidad ni sensibilidad. El patrón de oro, el hemocultivo, solo es positivo en aproximadamente el 25% de los casos y existe la necesidad de mejores y oportunos métodos diagnósticos y de seguimiento. El objetivo de este estudio es evaluar la precisión diagnóstica de la interleuquina 6 (IL-6) como marcador de infección en neonatos con sospecha de sepsis.

**Metodología:** En un diseño de casos y controles, se incluyó un grupo de neonatos con sospecha de sepsis neonatal que se encuentren hospitalizados en la Unidad de cuidado intensivo neonatal (UCIN) y la Unidad de cuidado básico neonatal (UCBN) del Hospital Universitario de Neiva, durante el periodo de mayo de 2016 a mayo de 2017 y otro grupo de neonatos hospitalizados por causas no infecciosas. Se determinó en ambos grupos los niveles plasmáticos de IL-6 por Inmuno ensayo ligado a enzima (ELISA, en inglés) usando un estuche comercial y se compararon sus resultados en términos de rendimiento operativo, con otros marcadores de laboratorio y bioquímicos la clásicamente usados en sepsis como índices hematológicos, reactantes de fase aguda y hemocultivo.

**Resultados:** Un total de 167 pacientes, 64 casos de sepsis y 103 controles fueron incluidos. Hubo una diferencia estadísticamente en la edad de los recién nacidos con sospecha de sepsis (3 días) y los recién nacidos sin sospecha de sepsis (1 día). Los niveles séricos de proteína C reactiva y presentaron medianas de 0.29 mg/dl siendo estos valores más altos en los casos (0.71 mg/dl) que en los controles (0,21 mg/dl) ( $p= 0.012$ ) y la mediana de los niveles de procalcitonina fue 1.05 ng/ml sin encontrar una diferencia significativa de estos valores en ambos grupos. , los hemocultivos se realizaron en el 89.06% de los casos y tan solo el 14.04% fueron positivos, el 38.32% de los pacientes presentaron un diagnóstico de sepsis. Al realizar el rendimiento operativo de IL 6 como prueba diagnóstica en sepsis se encontró una sensibilidad del 56% y especificidad del 56% con un punto de corte de 4.6 pg/ml y una sensibilidad de 36% y especificidad de 81% con un punto de corte de 18.4 pg/ml según el análisis de rendimiento diagnóstico realizado. La mediana de los niveles plasmáticos de IL 6 en los casos fueron significativamente más altos que en los controles con 6.48pg/ml y 2.42 pg/ml ( $p=0.008$ ) respectivamente.

**Conclusión:** En este estudio se mostró que los neonatos con sepsis temprana tienen niveles significativamente más altos de IL 6 comparado con aquellos

neonatos sin sepsis, sin embargo, debido a la falta de consenso en la definición de sepsis y la heterogeneidad de los hallazgos encontrados hasta ahora en los diferentes estudios, se recomienda prestar atención al momento de interpretar los resultados, adicionalmente el hallazgo de una adecuada especificidad y baja sensibilidad de IL 6 sugiere que su uso sería más adecuado como prueba confirmatoria y no de tamizaje como se reporta en otros estudios. Se sugiere la realización de futuros estudios.

Palabras claves: Sepsis, interleuquina (IL)-6, neonatos.

## SUMMARY

**Introduction:** The clinical manifestations of neonatal sepsis vary from tachypnea, irritability to hypothermia and its diagnosis constitutes a challenge for the pediatrician, who tries to obtain a more accurate and timely diagnosis without achieving a good specificity or sensitivity. The gold standard, the blood culture, is only positive in approximately 25% of cases and there is a need for better and timely diagnostic and follow-up methods. The aim of this study is to evaluate the diagnostic accuracy of interleukin 6 (IL-6) as a marker of infection in neonates with suspected sepsis.

**Methodology:** In a case-control design, we included a group of neonates with suspected neonatal sepsis who are hospitalized in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) and the Neonatal Basic Care Unit (UCBN) of the University Hospital of Neiva, during the period from March 2016 to May 2017 and another group of neonates hospitalized for non-infectious reasons. The plasma levels of IL-6 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were determined in both groups using a commercial kit and their results were compared in terms of operational performance with other laboratory and biochemical markers classically used in sepsis. Hematological indices, acute phase reactants and blood culture.

**Results:** A total of 167 patients, 64 cases of sepsis and 103 controls were included. There was a statistically significant difference in the age of newborns with suspected sepsis (3 days) and newborns without suspected sepsis (1 day). The serum levels of C-reactive protein had medians of 0.29 mg / dl, these values being higher in the cases (0.71 mg / dl) than in the controls (0.21 mg / dl) ( $p = 0.012$ ) and the median Procalcitonin levels were 1.05 ng / ml without finding a significant difference of these values in both groups. Blood cultures were performed in 89.06% of the cases and only 14.04% were positive; 38.32% of the patients presented a diagnosis of sepsis. When performing the operative performance of IL 6 as a diagnostic test in sepsis, a sensitivity of 56% and specificity of 56% was found with a cut-off point of 4.6 pg / ml and a sensitivity of 36% and specificity of 81% with a point of cut of 18.4 pg / ml according to the diagnostic performance analysis performed. The median plasma levels of IL 6 in the cases were significantly higher than in the controls with 6.48 pg / ml and 2.42 pg / ml ( $p = 0.008$ ) respectively.

**Conclusion:** This study showed that neonates with early sepsis have significantly higher levels of IL 6 compared to neonates without sepsis, however, due to the lack of consensus in the definition of sepsis and the heterogeneity of the findings found until now, in the different studies,

It is recommended to pay attention when interpreting the results. In addition, the finding of adequate specificity and low sensitivity of IL 6 suggests that its use would be more appropriate as a confirmatory test and not as a screening test as reported in other studies. . It is suggested that future studies be carried out.

Key words: Sepsis, interleukin (IL) -6, neonates

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección neonatal representa un grave problema de salud pública siendo una principal causa de complicaciones y fallecimientos en las unidades de cuidado intensivo neonatal (UCIN). El diagnóstico de la sepsis neonatal sigue siendo un desafío clínicamente relevante y el problema principal es que su presentación puede ser sutil e inespecífica o confundirse con causas no infecciosas. Al considerar un recién nacido (RN) con riesgo de sepsis ha habido gran número de estudios sobre diversos marcadores de diagnóstico, como son los índices hematológicos, proteína C reactiva (PCR), procalcitonina (PCT), citoquinas, y marcadores de superficie celular, entre otros. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales que permitan identificar biomarcadores con alta precisión diagnóstica y validez y así disminuir el uso generalizado y prolongado de antibióticos en muchas ocasiones.

Dentro de éstas herramientas diagnósticas se encuentra la IL-6, un promisorio biomarcador de inflamación, que ha sido evaluado con aceptables resultados en estudios para diagnóstico de sepsis neonatal, encontrando una aceptable sensibilidad y especificidad respecto a otros marcadores como la interleuquina 8 (IL8) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) los cuales son usados como marcadores de infección, al estimular la fase aguda de la reacción inflamatoria, además valores elevados de IL 6 se han asociado con mayor riesgo de mortalidad, su detección por ELISA es poco costosa, rápida y confiable. Estas características podrían ser usadas para probar su eficiencia diagnóstica cuando se compara con los métodos locales actualmente disponibles.

La pregunta que se desea responder con este trabajo es: ¿Cuál es la utilidad diagnóstica de la IL-6 en los RN con sepsis neonatal?

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 DEFINICIÓN

La sepsis neonatal es una infección sistémica que ocurre en los RN menores de 28 días de vida(1). Es una causa importante de morbilidad y mortalidad en este grupo de edad(1,2). Se clasifica de forma variable con base a la edad de inicio. Sepsis neonatal temprana es la que ocurre en un periodo menor a 72 horas (2,3) después del nacimiento; Si la infección sucede en un tiempo mayor, se trata de una sepsis neonatal tardía (2). La sepsis temprana, está relacionada con las infecciones placentarias e infecciones ascendentes desde el tracto genital materno, mientras que la tardía está asociada con ambientes ya sea nosocomiales o de la comunidad (4).

El diagnóstico de sepsis sigue siendo un desafío clínicamente relevante, el problema principal es que la presentación de la infección neonatal puede ser sutil e inespecífica o parecerse a causas no infecciosas. Al considerar un RN con riesgo de sepsis, muchos clínicos empiezan empíricamente regímenes antimicrobianos de amplio espectro, que en algunas ocasiones se continúan ordenando a pesar de tener hemocultivos negativos. Esta práctica puede ser perjudicial ya que aumenta el riesgo de infecciones fúngicas invasivas, enterocolitis necrotizante (NEC) o la muerte, además de aumentar la selección de microorganismos multidrogos resistentes e incluso el riesgo de sepsis tardía(2). El manejo en las UCIN ha sufrido un gran avance, y se ha logrado una disminución en la mortalidad, sin embargo, los resultados no son favorables cuando se analiza la incidencia de secuelas y discapacidad en esta población. Así, se ha observado que neonatos que han sufrido sepsis son más propensos a padecer efectos adversos en el desarrollo neurológico entre los que se incluyen: parálisis cerebral, menores puntuaciones del índice de desarrollo mental y psicomotor, discapacidad visual y problemas de crecimiento. Lo anterior aumenta la carga social y económica de familias que, en muchos casos, ya sobreviven en condiciones precarias(5).

El diagnóstico precoz y tratamiento de la sepsis neonatal son un reto. En este contexto, se han realizado estudios sobre diversos marcadores diagnósticos para sepsis neonatal como los índices hematológicos, reactantes de fase aguda, PCR, procalcitonina(PCT), citoquinas como IL 1  $\beta$ , IL-8, IL-12, IL-18, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )y marcadores de superficie celular entre otros. Sin embargo, aún existe amplio vacío de investigación en la búsqueda de biomarcadores que cuenten con alta precisión diagnóstica y validez (6).

## 2.2 EPIDEMIOLOGÍA

Aunque a nivel mundial se ha logrado una disminución de la mortalidad infantil, el comportamiento a nivel neonatal no ha sido tan favorable, representa el 40% del total de la mortalidad en la infancia(7,8). Cada año mueren 2,6 millones de RN; tres cuartos de estas muertes se producen en la primera semana de vida, y cerca del 99% de los casos en países de bajos y medianos ingresos. La sepsis neonatal es la tercera causa de mortalidad en este grupo etario, antecedido por la prematuridad y la asfixia al nacer, es responsable del 13% de la mortalidad neonatal y el 42% de las muertes en la primera semana de vida (7). En países desarrollados, la sepsis diagnosticada clínicamente está presente en 49-170 de cada 1,000 nacidos vivos(NV)(7). Con relación a la incidencia de sepsis temprana y tardía, para la temprana se estima 0.98 casos por cada 1,000 NV, con tendencia al aumento y la tardía, se ha observado con mayor frecuencia en los recién nacidos con peso muy bajo al nacer (RNMBPN) < 1,500 g, con tasas inversamente proporcionales a la edad gestacional (EG), RN < 1,000 g, 26/1,000 NV, RN 1,000 y 1,500 g, 8/1,000 NV, otro factor de riesgo importante es la raza negra con tasas más altas tanto en infecciones como en mortalidad con 5,14/1.000 nacidos vivos y 24,4% respectivamente (1).

## 2.3 FACTORES DE RIESGO

Otro punto de gran importancia con respecto a la sepsis neonatal es la revisión de los factores de riesgo, a modo general se describen los relacionados con riesgos maternos y neonatales. Dentro de los maternos encontramos riesgos previos al parto, como ingesta de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes*, el cerclaje cervical, la amniocentesis, pobre control prenatal o inicio tardío, nutrición inadecuada, status socioeconómico bajo, uso de sustancias psicoactivas(1). Durante el parto, se debe tener especial cuidado sobre, ruptura de membranas prolongada mayor a 18 horas, la presencia de corioamnionitis (1–4).Otros factores mencionados en este periodo son, fiebre, colonización genital con estreptococo del grupo B (SGB), bacteriuria por SGB, antecedente de RN con infección por SGB, una inadecuada respuesta inmune materna con títulos bajos de anticuerpos IgG contra polisacáridos capsulares específicos del SGB (1,3).

En relación a los factores de riesgo neonatales se describen, prematuridad, bajo peso, anomalías congénitas, APGAR < 6 a los 5 minutos, inmadurez del sistema inmune neonatal, Múltiples procedimientos invasivos, sexo masculino (1).

## 2.4 AGENTES ETIOLÓGICOS

Diferentes agentes patógenos pueden ser adquiridos durante el embarazo (prenatal), durante el parto (perinatal), o después de este (posnatal). La Tabla 2-1 muestra los diferentes períodos de la transmisión de diversos patógenos neonatales(2).

Tabla 1. Períodos de la transmisión de las infecciones neonatales.

Patógenos	Durante el embarazo	Durante el parto	Después del parto
<b>BACTERIAS</b>			
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	+	-
Estreptococo del grupo B	++	++	++
<i>Enterococcus spp</i>	-	+	+
Enterobacteriaceae	-	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+
<i>Neisseria gonorrea</i>	-	+	-
<i>Staphylococcus spp</i>	-	-	++
<i>Treponema pallidum</i>	+	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	+	-
<b>VIRUS</b>			
Coronavirus	-	-	+
Cytomegalovirus	+	+	+
Enterovirus	+	+	+
Hepatitis B	+	+	-
Herpes simplex	+	-	-
Inmunodeficiencia humana	+	+	+
Metapneumovirus humano	-	-	+
Influenza	-	-	+
Parainfluenza	-	-	+

Parvovirus B19	+	-	-
Sincitial Respiratorio	-	-	+
Rhinovirus	-	-	+
Rubeola	+	-	-
Varicella-zoster	+	+	+
HONGOS			
Candida spp	-	+	+
Aspergillus spp	-	-	+
PROTOZOOS			
Toxoplasma gondii	+	-	-

Fuente: Adaptada de la tabla 1 de la Guía práctica para el diagnóstico, tratamiento y prevención de las infecciones neonatales (2).

Los organismos involucrados con mayor frecuencia en la sepsis neonatal son SGB y *Escherichia coli*, representan aproximadamente el 70% de las infecciones combinadas(1,2). Patógenos adicionales a tener en cuenta, que representan la minoría de los casos, son estreptococos (estreptococos del grupo viridans y *Streptococcus pneumoniae*), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, Bacilos entéricos Gram-negativos, tales como *Enterobacter spp*, *Haemophilus influenzae* y *Listeria monocytogenes*. En el grupo de los recién nacidos prematuros y de bajo peso al nacer se incrementa la carga de enfermedad atribuible a *E. coli* y otros bacilos gran negativos, siendo considerados la etiología más común. También es importante nombrar que mientras que estos patógenos bacterianos son más susceptibles de ser confirmados por métodos de cultivo, hay muchos episodios de sepsis neonatal clínica que se manejan empíricamente con antibióticos a pesar de no tener patógeno aislado (1).

Las infecciones virales, incluyendo el virus herpes simple (HSV), enterovirus, y parechovirus, también están implicados en la sepsis temprana y deben ser clínicamente diferenciados de la sepsis bacteriana. Virus estacionales adicionales, incluyendo virus sincitial respiratorio (VSR), adenovirus, rinovirus, y los rotavirus, se han identificado en neonatos hospitalizados, relacionadas principalmente con la transmisión horizontal. Sin embargo, estos patógenos no son típicamente asociados con una la sepsis temprana(1,2).

Los hongos patógenos rara vez se asocian con sepsis neonatal temprana. La infección por *Candida spp.* Es más probable en RN con bajo peso al nacer, también puede presentarse como candidiasis congénita que puede ocurrir en recién nacidos a término o prematuros, con síntomas que ocurren en el nacimiento o en las primeras 24 h de vida(1).

## 2.5 FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

El desarrollo de la sepsis está determinado por la interacción entre las características del hospedero y los factores intrínsecos del patógeno (5). La respuesta inmune a los patógenos se basa tanto en componentes innatos como adaptativos.

La primera línea de defensa contra los invasores consiste en barreras físicas como la piel, las membranas mucosas del aparato gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. La segunda línea de defensa está dada por el sistema inmune innato (incluido el complemento, citocinas, células fagocíticas y células asesinas naturales), que juega un papel activador y controlador del sistema inmune adaptativo (6).

Los patógenos causantes de sepsis neonatal de aparición temprana pueden invadir el torrente sanguíneo del recién nacido directamente por la adquisición transplacentaria del agente infeccioso durante una bacteriemia materna, por exposición al líquido amniótico infectado o por el contacto con secreciones maternas colonizadas por microorganismos patógenos. Por lo tanto, la infección se puede adquirir, ya sea en el útero o durante el nacimiento. Otra forma de presentación está relacionada con la colonización de la piel y las membranas mucosas que pueden manifestarse clínicamente después del nacimiento, cuando las barreras pierden su integridad. Esta colonización también se puede dar por patógenos nosocomiales(7).

2.5.1 Reconocimiento y activación del sistema inmune innato. Cuando el agente patógeno invade los tejidos estériles, las células locales lo detectan e inician la respuesta inflamatoria (8). El evento iniciador de la respuesta inflamatoria es el reconocimiento de los componentes estructurales o de las toxinas del agente infeccioso por el sistema inmune del hospedero, que conduce a la secreción de un gran número de mediadores para activar las vías de la inflamación y la coagulación (5).

Cuando la cantidad de bacterias invasoras es limitada, las respuestas locales son suficientes para eliminar los patógenos(8). En los primeros días de infección, los macrófagos fagocitan la bacteria y producen una gama de citocinas proinflamatorias las cuales inician el sistema inmune innato en respuesta al patógeno. Las células presentadoras de antígenos (antigen presenting cells - APC) como los macrófagos y las células dendríticas, alertan al huésped sobre la presencia de infección a través del reconocimiento de estructuras denominadas patrones moleculares asociadas a patógenos (pathogen associated molecular patterns [PAMPs], por sus iniciales en inglés), que son moléculas microbianas que están presentes en una amplia variedad de bacterias, hongos y virus (8). Estas moléculas exclusivas del metabolismo microbiano son reconocidas por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) presentes en las APC. Estos componentes centrales del sistema inmune innato reconocen las señales de peligro como la invasión de bacterias e inician la respuesta inmune secretando citocinas que contribuyen a la respuesta inflamatoria innata (9).

Los PRR también pueden reconocer señales de peligro endógenas, llamadas DAMP (del inglés danger-associated molecular patterns) que se liberan durante el estrés inflamatorio (por ejemplo, quemaduras, trauma y necrosis tisular), advirtiéndole al sistema inmune del huésped de peligro inminente (9).

Se han identificado diversos tipos de PRR en vertebrados, siendo los más importantes los receptores Toll-like (TLR), los receptores Nod-like (NLR), los receptores RIG-like (RLR) y los receptores de lectina tipo C (CLR) (34). Los PRR más estudiados en el contexto de sepsis son los TLRs, particularmente TLR4 y los NLRs(10).

Existen 13 TLRs que reconocen bacterias de los cuales 10 se expresan en humanos (11,12). Estos se expresan en la superficie celular o intracelularmente en múltiples tipos de células tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas y son fundamentales para el reconocimiento de los patógenos a través de sus productos microbianos distintivos(11). Cada receptor tiene una molécula ligando específico que lo activa, por ejemplo, se describen receptores específicos para los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas, el ácido lipoteicoico de las bacterias gram positivas y la doble cadena de ARN viral a través de TLR4, TLR2 y TLR3, respectivamente (11).

Los microorganismos a menudo estimulan más de un TLR simultáneamente que permite el inicio de una respuesta del huésped específica del patógeno (11).

Debido a la gravedad del choque séptico por gérmenes gram-negativos, tanto en neonatos críticamente enfermos como en adultos, el TLR4, (receptor para lipopolisacáridos o señalización de endotoxinas) es uno de los PRR más estudiados. La señalización de TLR4 no solo es crítica para la activación inmune de leucocitos, sino que también se expresa en muchas células epiteliales (12).

El TLR2 forma heterodímeros con TLR1 y TLR6 que reconocen las lipoproteínas de triacilo y diacilo respectivamente. Relevante para la patogénesis de la sepsis, el TLR2 también detecta el peptidoglicano (componente de la pared celular bacteriana), ácido lipoteicoico (bacterias gram-positivas) y zymosan (hongos) (9). El TLR5 reconoce la flagelina, que forma los flagelos bacterianos. Los TLR ubicados en endosomas y endolisosomas en su mayoría reconocen los ácidos nucleicos de los patógenos. De estos, el TLR3 reconoce el ARN bicatenario viral, mientras que TLR7 y TLR8 reconocen el ARN viral monocatenario. El TLR9 detecta microbios (CpG no metilado) ADN altamente expresado en bacterias, virus y parásitos (9)

Al entrar en contacto con su ligando, los TLR se activan e inician la transducción de señales intracelulares por dos vías: la una dependiente del factor de diferenciación mieloide de 88 kd (MyD88), que utiliza la mayoría de los TLR, y la otra, independiente de MyD88 y dependiente de la proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón- $\beta$  (TRIF, por la sigla en inglés de TIR domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), exclusiva de TLR3 y TLR4 (29).

El factor nuclear (NF)- $\kappa$ B regula la transcripción de los mediadores inmuno moduladores involucrados en el desarrollo de la sepsis. Este interactúa con secuencias específicas de genes promotores inducida por el estímulo de endotoxinas, productos de bacterias gram positivas, citoquinas, oxidantes y otros estresores químicos o físicos. Cuando la célula es activada por dicho estímulo, el(NF)- $\kappa$ B en el citoplasma es fosforilado y luego degradado por el proteosoma 26S. Esto le permite moverse al núcleo donde puede interactuar con el coactivador de proteínas y unirse a secuencias específicas de regiones promotoras de genes implicados principalmente en la respuesta inflamatoria e iniciar la transcripción de estos mediadores(13).Después de la estimulación de PRRs, se obtiene una amplificación de la respuesta inflamatoria dada por la producción de citocinas y quimiocinas como la interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (11), así como de interferones tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (5).

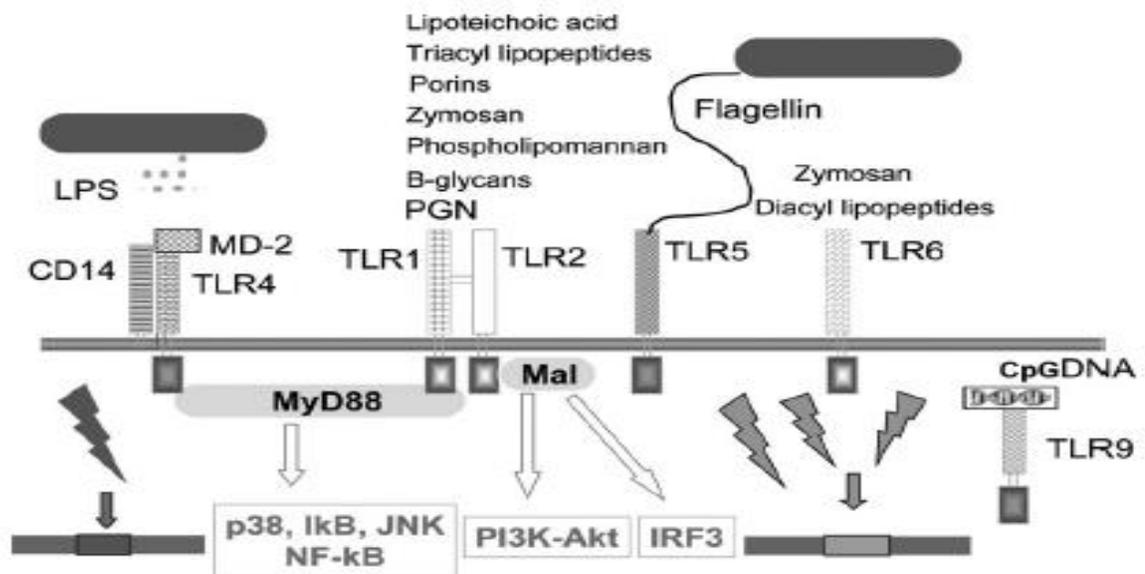
Clásicamente una diferencia en la respuesta inmune edad-dependiente ha sido descrita(14). Así, en comparación con los adultos sépticos, los recién nacidos

sépticos producen menos IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12. La disminución de la producción de citocinas se debe en parte a la disminución producción de importantes mediadores intracelulares de señalización de TLR, incluyendo MyD88, factor regulador de interferón 5 (IRF5) y p38 (11).

De manera similar a los TLR, los NLR reconocen una porción de componentes virales y bacterianos y participan en la respuesta inflamatoria que permite que el hospedero responda a la infección. Los NLRs y el inflamasoma son integrales en la conversión de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 a formas activas de IL-1 $\beta$  e IL-18. La formación del complejo citosólico multi-proteína conocido como inflamasoma ha sido atribuido a varios NLR diferentes, como Nalp3 / NLRP3, así como caspase-1 y también incluye el receptor de ATP, P2X7 (12).

Hay 23 miembros de la familia NLR en humanos, entre los miembros de la familia NLR, algunos se han especializado en el reconocimiento no solo de PAMP sino también de DAMP, como adenosina trifosfato, canales iónicos, material fibroso y cristalino y agregados proteicos, a través de una ruta particular que conduce al reclutamiento de caspasas que finalmente rompen y activan las pro-formas de IL-1 $\beta$  e IL-18 (la ruta de los inflamasomas) (15).

Figura 1. Receptores de reconocimiento de patógenos. Tomada de: Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. Critical care medicine. 2009;37(1):291-304.



La unión de receptores tipo toll (TLR) activa las vías de transducción de señales intracelulares que conducen a la activación de activadores transcripcionales tales como factores reguladores del interferón, fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K) / Akt, proteína activadora-1 y factor nuclear citosólico-kappa (NF-). Activado NF- se mueve desde el citoplasma al núcleo, se une a los sitios de transcripción e induce la activación de una matriz de genes para proteínas de fase aguda, óxido nítrico sintasa inducible, factores de coagulación, citocinas proinflamatorias, así como activación enzimática de proteasas celulares.

El papel central de los NLR en el reconocimiento de la invasión bacterias y el inicio del sistema inmune innato es por ahora bien reconocido. La activación de inflamasomas durante la sepsis puede amplificar las respuestas inflamatorias (9)

Esta respuesta inflamatoria permite la activación de células endoteliales incluyendo el aumento de expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) que facilitan el reclutamiento de leucocitos y diapédesis celular, que durante la sepsis facilita el paso y la migración extravascular de los leucocitos(11), producen prostaglandinas y óxido nítrico que estimulan la vasodilatación y reorganizan sus filamentos de actina, abriendo las uniones gap entre las células. Para un adecuado reclutamiento de los leucocitos es necesaria la producción quimiocinas y las interacciones con las CAMs, ya que en ausencia o déficit de estos existe un mayor riesgo de propagación de una infección local a una sistémica (11).

La alteración de la integridad endotelial también induce la activación del complemento y los sistemas de coagulación, contribuyendo a un síndrome inflamatorio sistémico, un estado pro-trombótico y una fuga vascular de proteínas plasmáticas, que culmina en inestabilidad hemodinámica y shock (15).

2.5.2 Células inflamatorias; reclutamiento y erradicación de patógenos. La bacteria fagocitada por los neutrófilos es contenida dentro del fagosoma y a través de las propiedades antimicrobianas que contienen naturalmente los gránulos de los neutrófilos (azurófilos) tales como  $\alpha$ -defensinas y antibiótico proteasas (catepsina G, elastasa, y mieloperoxidasa) se aumenta la permeabilidad bacteriana. La fusión de los gránulos de neutrófilos con la bacteria crea un ambiente local hostil, con pH disminuido y proteasas potentes que permiten la eliminación del patógeno (8).

Sin embargo, la sepsis puede ocurrir cuando las bacterias escapan y la respuesta inflamatoria a la infección se eleva a tal nivel que ocurren alteraciones fisiológicas dentro del huésped (8).

2.5.3 Activación de respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos son células clave en la respuesta del sistema inmune adaptativo. El antígeno microbiano es presentado a las células T por las APC junto con otras proteínas de la superficie celular tales como CD3 y moléculas coestimulantes. Con las señales apropiadas, los linfocitos T CD4 secretan citocinas como interferón (IFN)  $\gamma$ , que activan las células fagocíticas para eliminar bacterias intracelulares e interactúan con los linfocitos B, que luego producen anticuerpos antimicrobianos (8).

La activación de los neutrófilos, macrófagos y monocitos por moléculas coestimuladoras en el sitio de la infección activará el sistema inmune adaptativo local (33). La interacción entre las APCs y el sistema inmune adaptativo juega un papel importante en la respuesta del hospedero durante la sepsis. Estas interacciones se desarrollan en el paciente séptico cuando los macrófagos locales y los neutrófilos reclutados no pueden contener la infección inicial (8).

Los pacientes sépticos experimentan una disminución significativa del número de linfocitos a través de apoptosis, lo cual es considerado como un factor que contribuye al estado de inmunosupresión frecuentemente observado en los estados avanzados de la sepsis y el cual hace al paciente vulnerable a nuevas infecciones (10,16).

2.5.4 De una respuesta localizada a una “tormenta de citocinas”. En el caso de un desequilibrio (proinflamatorio y antiinflamatorio) en la respuesta, el proceso localizado se sale de control y se vuelve sistémico (33). Cuando la respuesta local se extiende sistémicamente la activación de varias clases de PRR generan la liberación de una gran cantidad de mediadores llamados citocinas (5).

Las citocinas son una amplia categoría de pequeñas proteínas que se producen y lanzan con el objetivo de señalización celular y juegan una función inmunomoduladora. Después de la unión a receptores específicos en varios tipos de células, las citocinas inducen la activación, proliferación o migración de células diana.

Las citocinas se pueden dividir en varias categorías: interleuquinas, quimiocinas, interferones, factor de necrosis tumoral y factores de crecimiento, dependiendo su función principal(10).

Las interleuquinas son el grupo más importante de citoquinas liberadas durante procesos infecciosos. Abarcan una gran variedad de proteínas secretadas por

leucocitos y células endoteliales (entre otros) y que contribuyen a la señalización celular y promueven activación, proliferación, muerte y / o motilidad de las células inmunes (10).

Entre las numerosas citoquinas proinflamatorias estudiadas durante la sepsis, la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-17 son de crucial importancia.

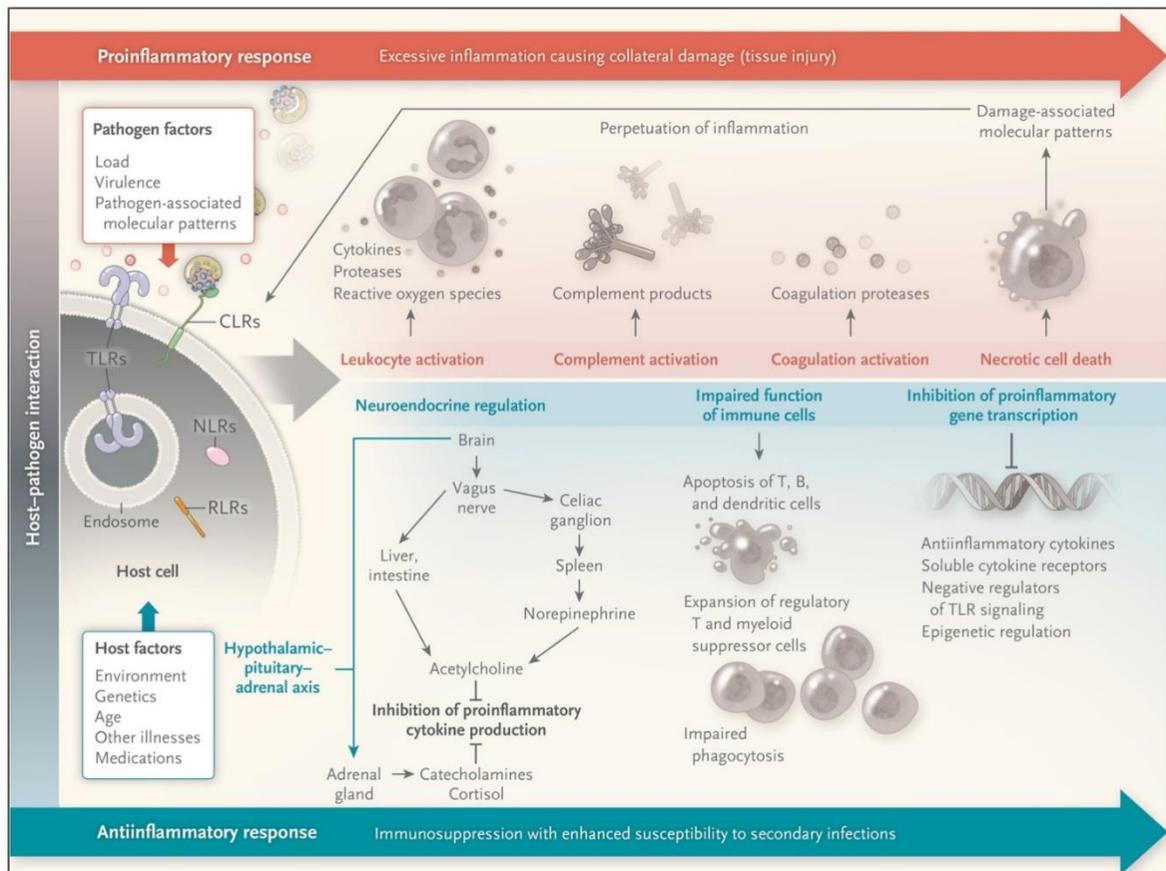
A continuación, se describen las principales citoquinas inflamatorias involucradas en la sepsis.

- Interleuquina-1 beta (IL-1  $\beta$ ): activa los linfocitos B y linfocitos T, células asesinas naturales (NK), células endoteliales, neutrófilos y osteoclastos; induce la secreción de otras citocinas, factores de crecimiento y catecolaminas; estimula el catabolismo, que lleva a hipertrigliceridemia; aumenta de la temperatura corporal y, en dosis altas, puede causar hipotensión, leucopenia, congestión pulmonar e incluso la muerte (5).
- Interleuquina-6 (IL-6): aunque no induce por sí sola las características del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), es un marcador importante de inflamación, ya que su concentración plasmática se mantiene alta en el tiempo. La liberan monocitos, macrófagos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, Linfocitos T y Linfocitos B. Conduce a la producción hepática de reactantes de fase aguda e interviene en la diferenciación de los Linfocitos B, la activación de los Linfocitos T y la liberación del factor tisular (FT) (5).
- Interleuquina-12 (IL-12): participa en el establecimiento de la respuesta Th1 y en la producción de IFN- $\gamma$  por los Linfocitos T y las células NK. También se la ha relacionado con hepatomegalia y esplenomegalia, leucopenia y anemia (5).
- Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ): en los estadios iniciales de la inflamación, las células NK producen IFN- $\gamma$  y, a medida que se desarrolla la respuesta inmune, los LT CD4+ Th1 se convierten en la principal fuente de este mediador. La combinación de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  conduce a una activación óptima de los macrófagos, que los convierte en células microbicidas potentes (5).
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ): los estímulos para la liberación de este mediador incluyen los PAMP, la fracción C5a del complemento, la IL-1 y el mismo

TNF- $\alpha$ . Este produce fiebre, aumenta la concentración de catecolaminas, activa neutrófilos, células endoteliales, monocitos y macrófagos, induce actividad procoagulante y estimula la liberación de otras citocinas, mediadores lipídicos y factores de crecimiento. El nivel plasmático de esta citocina aumenta tempranamente durante la sepsis, pero disminuye después de algunas horas. Es producido por los neutrófilos, linfocitos T, células endoteliales, mastocitos y células NK(5).

- Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF): Esta sustancia estimula la secreción de citocinas proinflamatorias, de óxido nítrico (NO) y de mediadores lipídicos. Lo secretan las células epiteliales pulmonares y renales, los macrófagos y los eosinófilos tras la exposición a citocinas proinflamatorias y a PAMP (5).
- Quimiocinas: facilitan la migración leucocitaria y median otros procesos como la angiogénesis y la degranulación de leucocitos. La interleucina-8 (IL-8) es una quimiocina liberada por monocitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y epiteliales estimuladas por PAMP, TNF- $\alpha$  o IL-1, cuyos principales efectos son la quimiotaxis y la activación de los neutrófilos. La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1, por la sigla en inglés de monocyte chemoattractant-1 protein) es otra quimiocina importante en sepsis por su potente acción quimioatrayente sobre las células mononucleares (5).

Figura 2. Respuesta del huésped en sepsis. “Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, 369(9), 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>.



La respuesta del huésped a la sepsis se caracteriza por respuestas proinflamatorias (parte superior del panel, en rojo) e inmunosupresores antiinflamatorios (abajo del panel, en azul). La dirección, extensión y duración de estas reacciones están determinadas por ambos factores del huésped (por ejemplo, características genéticas, edad, enfermedades coexistentes y medicamentos) y factores de patógenos (por ejemplo, carga microbiana y virulencia). La respuesta inflamatoria se inicia por interacción entre patrones moleculares asociados a patógenos expresados por patógenos y reconocimiento de patrones receptores expresados por células hospedadoras en la superficie celular (receptores tipo toll [TLR] y receptores de lectina tipo C [CLR]), en el endosoma (TLR), o en el citoplasma (receptores 1-like del gen 1 del ácido retinoico [RLR]) y oligomerización de unión a nucleótidos receptores de tipo dominio [NLRs]). La consecuencia de la inflamación exagerada es el daño colateral del tejido y la muerte celular necrótica, que da como resultado la

liberación de patrones moleculares asociados al daño, las llamadas moléculas de peligro que perpetúan la inflamación al menos en parte actuando sobre los mismos receptores de reconocimiento de patrones que se desencadenan por patógenos.

2.5.5 Apoptosis de linfocitos. La apoptosis se ha destacado como un factor potencial en la inmunosupresión y la mortalidad en la sepsis (2). Se ha observado que los pacientes con sepsis presentan evidencia de apoptosis masiva de linfocitos, tanto en sangre periférica como en tejido linfoide. Esta muerte es inducida tanto por la vía extrínseca como por la intrínseca de la apoptosis. La linfopenia resultante se asocia claramente con la mortalidad, puesto que la destrucción masiva de las células del sistema inmune impide una respuesta efectiva contra el insulto primario y además favorece la aparición de infecciones secundarias (16).

La apoptosis se induce a través de dos cascadas de señales principales denominadas vía extrínseca e intrínseca.

En la vía extrínseca las proteínas externas se unen a los receptores de superficie de la célula que posteriormente inducen apoptosis. Diferentes moléculas están involucradas, incluido el TNF, TRAIL y FAS. Al unirse al receptor, la proteína adaptadora se recluta a la superficie interna de la membrana celular. Este evento inicia una cascada de eventos intracelulares, que incluyen la regulación positiva de proteínas inhibidoras de la apoptosis las cuales dan una regulación negativa. La caspasa 3 se activa como evento terminal (8).

La vía intrínseca es la vía mitocondrial de la apoptosis. En esta vía los radicales de oxígeno la radiación  $\gamma$  o la lesión del ADN juegan un papel central. Existe un equilibrio entre (a) proteínas antiapoptóticas tales como BCL-2, BCLXL, y varios otros; y (b) proteínas proapoptóticas como Bim, Bax y PUMA. Existe un enlace entre las proteínas discretas y el inicio de la señal apoptótica; por ejemplo, PUMA regula la apoptosis inducida por el daño del ADN, las proteínas proapoptóticas inducen a las mitocondrias a liberar citocromo c que a través de una serie de eventos activa la caspasa 9 y este se convierte en el evento terminal (8).

2.5.6 Coagulación y sepsis. Al hablar de sepsis, otro aspecto relevante para nombrar es el desequilibrio que se produce en la coagulación, el cual está dado por un aumento de los factores procoagulantes y una disminución en factores anticoagulantes. La sepsis inicia la coagulación por activación del endotelio incrementando la producción de factor tisular. La activación de la cascada de la coagulación (factores Va y VIIIa), conduce a la formación de trombina- $\alpha$ , que convierte el fibrinógeno en fibrina, esta se une a las plaquetas facilitando la adherencia a las células endoteliales donde finalmente formaran trombos a nivel microvascular; una vez formado los trombos, obstruirán la luz vascular, amplificaran la lesión a través de la liberación de mediadores causando isquemia distal e hipoxia tisular (17).

En condiciones fisiológicas, el funcionamiento normal de los anticoagulantes naturales (proteína C y proteína S), antitrombina III, el inhibidor el factor tisular, modulan la coagulación, mejoran la fibrinólisis y eliminan los micro trombos; en las células endoteliales se da la unión de trombina- $\alpha$  a la trombo modulina, lo que aumenta drásticamente la activación de la proteína C que inactiva proteolíticamente los factores Va, VIIIa y disminuye la síntesis de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (IAP 1). En contraste en la sepsis se ven alterados todos estos mecanismos, hay aumento de la síntesis de IAP 1, disminuye los niveles de proteína C, proteína S, antitrombina III y del inhibidor del factor tisular. El lipopolisacárido y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por un lado disminuyen la síntesis de la trombomodulina y los receptores endoteliales de la proteína C, disminuyendo así la activación de la proteína C y por otro incrementan los niveles de IAP-1 de manera que la fibrinólisis se inhibe. Los cambios que se producen durante la sepsis los podemos ver manifestados clínicamente como coagulación intravascular diseminada y disfunción orgánica múltiple (17).

## 2.6 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA SEPSIS NEONATAL

Los signos y síntomas en los recién nacidos varían según la edad gestacional y la gravedad de la infección. En relación con la temperatura es mucho más común que presenten hipotermia, rara vez fiebre, siendo más frecuente si tienen el antecedente de madre con fiebre ya sea durante el parto o inmediatamente después de este. Los síntomas generales incluyen hipoglucemia (<40 mg / dl, el 22%), hipotermia (<36.5 C, 20%), seguido por la hiperglucemia (> 140 mg / dl, 19%) y apnea (18%), letargo, problemas en la alimentación, y los signos no específicos pueden incluir anuria y acidosis. La hipotensión puede ser encontrada con más frecuencia en niños con sepsis, mientras que la irritabilidad, convulsiones y abultamiento o total fontanela se encuentra en los afectados con meningitis. Sin embargo, la ausencia de alguno de los signos mencionados anteriormente no excluye infección del sistema nervioso central (SNC). Además, se sugiere evaluar

los bebés para varios focos infecciosos como la otitis media aguda, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica e infecciones de la piel y de tejidos blandos (1,2). Como la neumonía es a menudo una forma de presentación clínica de infección, los síntomas respiratorios son comunes, pueden incluir apnea, taquipnea, aleteo nasal y retracciones intercostales. Los síntomas cardíacos pueden incluir cianosis, desaturación, bradicardia, inadecuada perfusión, llenado capilar alterado e hipotensión.

Es importante tener en cuenta que los cambios sutiles en la función de respiratoria, la inestabilidad de la temperatura o los problemas en la alimentación pueden ser los primeros signos de una infección potencialmente mortal (1).

Los RNPT a menudo presentan apnea, bradicardia y cianosis (65,8%) como el primer signo de infección y se describe alta frecuencia del aumento del esfuerzo respiratorio en un 43%(1).

La mayoría de casos (80% a 90%) de sepsis temprana se presentarán en las primeras 24 a 48 h de vida. Al evaluar a un RN en quien se sospecha sepsis se debe hacer una revisión exhaustiva de los factores de riesgo prenatal. La evaluación del RN exige reconocer los signos y síntomas de la enfermedad ya que puede variar desde no específica a falla orgánica múltiple(1).

La presencia de la erupción, convulsiones, meningoencefalitis, y disfunción hepática o infarto debería conducir a la sospecha de una infección viral, incluyendo VHS, enterovirus y parechovirus(1).

Desafortunadamente, con la excepción de la miocarditis, que es más frecuentemente asociada con las infecciones por enterovirus, no es posible distinguir mediante síntomas o signos la etiología por un virus en particular (1).

La lesión de la materia blanca puede ser visualizada en la ecografía cerebral o resonancia magnética nuclear cerebral (RMNC) con el aumento de la ecogenicidad de la materia blanca periventricular en los RN con encefalitis por parechovirus, similar a las lesiones observadas, aunque con menor frecuencia al ser producida por enterovirus. En contraste, la encefalitis por HSV-2 tiende a ser difusa, puede comprometer sustancia blanca y gris o estar limitada a los lóbulos temporales, tronco cerebral o el cerebelo. Está asociada a hemorragia en más de la mitad de los pacientes en la RMNC o tomografía computarizada (TC)(1).

Enfermedades por enterovirus neonatales tienden a ocurrir en el verano y el otoño, son con frecuencia (60%) asociadas con enfermedad materna reciente y la ausencia de otros problemas perinatales (81%)(1).

## 2.7 DIAGNÓSTICO DE SEPSIS NEONATAL

El diagnóstico de sepsis neonatal es uno de los principales retos para los especialistas en neonatología debido a síntomas poco específicos que pueden simular otras condiciones no infecciosas y a la ausencia de una prueba diagnóstica eficaz que realice una detección en fases tempranas de la enfermedad (18,19).

A diferencia de los pacientes mayores, los RN tienen presentaciones muy sutiles y otras muchas condiciones que se asemejan a sepsis neonatal. Las pruebas auxiliares como hemograma, PCR, procalcitonina y biomarcadores, son de suma importancia para apoyar este diagnóstico, aunque cuentan con algunas desventajas como su difícil interpretación debido a la baja sensibilidad y rangos de normalidad variables, además el acceso a estas pruebas en los países en desarrollo es limitado. Los hemocultivos también carecen de la suficiente sensibilidad debido a las características específicas de la población neonatal (20).

El examen físico anormal es útil, pero la infección puede presentarse sin la alterar los hallazgos del examen y con ausencia de síntomas clínicos. Las pruebas de diagnóstico más disponibles y generalmente usadas no brindan un adecuado apoyo para el inicio de la terapia antimicrobiana empírica y son más útiles en la decisión de suspender el tratamiento antibiótico (19). Para ello se han creado escalas y test donde se agrupan variables clínicas y para clínicas que apoyan el diagnóstico y el inicio de esquema antibiótico, como la presentada en tabla 2-2.

En el periodo neonatal cuando hay signos de infección, la interpretación del hemograma es difícil, ya que los valores varían significativamente según los días de vida y la edad gestacional. Valores bajos de leucocitos, el conteo absoluto de neutrófilos y valores altos de la relación de neutrófilos inmaduros / totales (I/T) se asocian con sepsis de aparición temprana, aunque se aclara que el recuento total de leucocitos tienen un pobre valor predictivo positivo (VPP) para la sepsis(1). Un único valor de la relación I:T (0,3) tiene un alto valor predictivo negativo (VPN) (99%), pero un bajo valor predictivo positivo (VPP) (25%) para la sepsis neonatal. Además los recién nacidos pueden cursar con infecciones de etiología

viral por el virus del herpes simple 1 y 2, parechovirus humano y enterovirus que pueden cursar con valores normales de leucocitos o presentar leucopenia (1,19).

A pesar de su asociación con la infección, todos estos resultados tienen bajas sensibilidades. El conteo de plaquetas no es muy sensible ni específico para el diagnóstico de sepsis neonatal, además no es útil en el seguimiento de la respuesta a la terapia(1,19).

El estándar de oro para el diagnóstico de la sepsis neonatal continúa siendo el hemocultivo, aunque los agentes patógenos solo se aíslan en aproximadamente el 25% de los casos (21).

La tasa de positividad se ve afectada por múltiples factores como el volumen de sangre inoculado, el uso de antibióticos prenatales, el bajo grado de bacteriemia y la técnica de laboratorio usada(20). Varios expertos recomiendan que 1ml de sangre debe ser el volumen mínimo para el cultivo ya que cantidades menores pueden estar relacionadas con falsos negativos. Deben tomarse muestras en condiciones estrictamente estériles de sitios de venopunción frescos para evitar la contaminación y los falsos positivos(1,20). Múltiples cultivos podrían ayudar a aumentar el rendimiento de esta prueba, pero los estudios en el período neonatal no han demostrado resultados satisfactorios, además siempre deben ser realizados antes del inicio de la terapia antibiótica, estos análisis requieren de mucho tiempo y pueden retrasar los procedimientos y el manejo antibiótico provocando resultados desfavorables. Actualmente se cuenta también con sistemas de hemocultivos avanzados que ofrecen resultados de forma más temprana, pero no están disponibles en todos los centros de atención de recién nacidos (19,20). En el caso de sepsis neonatal tardía el uso de análisis de orina para cultivo también es útil en el diagnóstico de infección de tracto urinario en los recién nacidos (19).

2.7.1 PCR y Procalcitonina en el diagnóstico de sepsis neonatal. La PCR y procalcitonina son los dos reactantes de fase aguda con mayor frecuencia estudiados en la sepsis neonatal (1).

La proteína C reactiva es la proteína de fase aguda más ampliamente estudiada en sepsis neonatal temprana. Está presente en múltiples estructuras como las membranas celulares bacterianas, membranas biológicas y lipopolisacáridos, siendo la fosfocolina su principal ligando. Sus inductores de producción después de la infección bacteriana son principalmente la IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias que estimulan su síntesis hepática (pico a 48 h), seguido por la

activación del sistema del complemento, aumento de la fagocitosis, activación de los macrófagos, monocitos y una alta producción de citoquinas proinflamatorias (22).

Los niveles de PCR aumentan dentro de las 6 a 8 horas de la infección y el pico a las 48 h(23). Un valor de 10 mg/litro es el punto de corte más comúnmente utilizado en la mayoría de estudios publicados(1,20). Ésta tiene su mejor valor predictivo si se mide dentro de 24 a 48 h del inicio de la infección. Un nivel de PCR en aumento es mejor predictor que los valores individuales. Dos determinaciones normales de PCR (8 a 24 h después del nacimiento y 24 h posteriores) han demostrado tener un valor predictivo negativo (VPN) del 99,7% para la sepsis neonatal comprobada. Por lo tanto, valores normales repetidamente de PCR son fuerte evidencia en contra de la sepsis bacteriana y permiten suspender de forma segura el manejo antibiótico(1).

A causa de un retraso en la inducción de su síntesis hepática la PCR tiene una inaceptable baja sensibilidad como utilidad en el diagnóstico de sepsis neonatal en una etapa temprana. Las mediciones seriadas, 24 a 48h después de la aparición de la infección, están asociadas con mejor sensibilidad (74-98 %) y especificidad (71-94 %) , y se utilizan para guiar el tratamiento antibiótico en la sepsis neonatal (22) . Su limitación consiste en una tardía aparición y persistencia por un período relativamente más largo (24).

La procalcitonina (PCT) es producida principalmente por los hepatocitos y los monocitos. Es un péptido prohormona de 116 -aminoácido de la calcitonina. En los recién nacidos sanos o sépticos la procalcitonina se caracteriza por un aumento marcado después del nacimiento, lo cual limita su utilidad para diagnóstico de procesos infecciosos en los primeros 2 a 4 días de vida y establece la necesidad de valores de corte específicos para ese periodo (22).

Se ha comprobado aumento rápido de 3 a 4 horas en infección bacteriana o fúngica, no viral, en la concentración de PCT sérica en comparación con la PCR, alcanzando niveles en 18 a 24 horas después de la aparición de la infección, los cuales permanecen elevados al menos durante 24 a 48 horas. Las infecciones bacterianas se asocian con un aumento de las concentraciones séricas de PCT de hasta 1.000 mg / L, que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y mayor mortalidad (22). Tiene la capacidad de la detección precoz de la sepsis y la reducción rápida en sus niveles en respuesta a la terapia apropiada (24) . Esta también puede verse elevada por causas no infecciosas como: síndrome de dificultad respiratoria, asfixia perinatal, hemorragia intracraneal, inestabilidad hemodinámica, neumotórax, reanimación y sufrimiento fetal, por lo cual su

precisión en la sepsis neonatal de aparición temprana sigue siendo un tema de controversia (22,25).

La PCT se eleva significativamente durante infecciones en los RN, niños y adultos. La vida media es aproximadamente 24 h en sangre periférica. El nivel normal para los RN a las 72h de edad generalmente es 0.1 ng/ml. En general, la procalcitonina es más sensible para la detección temprana de la sepsis que la PCR (1). Su sensibilidad global es 81% y la especificidad es del 79%, pero los valores de muestras tomadas inmediatamente posterior al nacimiento tienen una sensibilidad del 49%. En la sepsis de aparición tardía, la procalcitonina es más sensible que la PCR, logrando una sensibilidad del 82-90%. La mayoría de los estudios han utilizado un punto de corte entre 0.3 y 2 ng/ml. Sin embargo, como la PCR y la procalcitonina se ven afectadas significativamente por el día de vida y edad gestacional, estos factores deben tenerse en cuenta para interpretar sus valores (20). La elevación de los niveles de PCT es más probable en infecciones bacterianas que en las virales y disminuye rápidamente con la terapia apropiada. Sin embargo, un aumento fisiológico en la concentración de la PCT se produce dentro de las primeras 24 horas del nacimiento y niveles elevados en suero pueden ocurrir bajo condiciones no infecciosas, por ejemplo, los RN con síndrome de dificultad respiratoria, inestabilidad hemodinámica e hijos de madres diabéticas(1).

Tabla 2. Variables clínicas y de laboratorio usadas para el diagnóstico de sepsis en recién nacidos.

Variable clínica	Inestabilidad de temperatura
	Frecuencia cardíaca > 1DS por encima de lo normal para la edad ( $\geq 180$ latidos/min, $\leq 100$ latidos/min)
	Frecuencia respiratoria (>60 respiraciones/min) más quejido o desaturación
	Letargia o alteración del estado mental
	Intolerancia a la glucosa (glucosa en sangre > 10mmol/L)
	Intolerancia alimentaria
Variable hemodinámica	Presión arterial 2DS por debajo de lo normal para la edad
	Presión sistólica < 50mm Hg (recién nacido día 1)
	Presión sistólica < 65mm Hg (infantes $\leq 1$ mes)
Variable de	Llenado capilar > 3 segundos

perfusión tisular	Lactato en plasma > 3 mmol/L
Variable inflamatoria	Leucocitosis (Leucocitos > 34,000 × 10 <sup>9</sup> /L)
	Leucopenia (Leucocitos < 5,000 × 10 <sup>9</sup> /L)
	Neutrófilos inmaduros > 10% **
	Tasa de neutrófilos inmaduros/totales > 0.2 †
	Trombocitopenia < 100,000 × 10 <sup>9</sup> /L
	Proteína C-reactiva (PCR) >10 mg/dL o >2DS por encima del valor normal‡
	Procalcitonina > 8.1 mg/dL o 2DS por encima del valor normal

Fuente : FuenTomado de Alonso Zea-Vera, 2015(26)

\*\*neutrófilos inmaduros: Metamielocitos, mielocitos y abastionados

†neutrófilos inmaduros/totales: (Metamielocitos, mielocitos y abastionados)/Neutrófilos totales

‡Notar que las unidades están en mg/dL, no mg/L, se debe hacer la conversión; DS: desviación estándar.

También se encuentran cambios sanguíneos en los niveles de interleuquinas que se producen rápidamente en el escenario de la sepsis neonatal, incluso antes de la de reactantes de fase aguda. Varias citoquinas como la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), la interleucina-8 (IL-8), receptor soluble de interleucina-2 (RSIL2) y del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) han demostrado un aumento temprano en respuesta a la infección bacteriana en los RN. Así las citoquinas proinflamatorias se convierten en biomarcadores para la sepsis neonatal, se ha demostrado que sustancias con TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y la IL-8 aumentan rápidamente sus niveles durante un proceso de sepsis neonatal (27). El aumento se produce antes de que el recién nacido desarrolle signos o síntomas de sepsis e incluso, antes de que las pruebas de laboratorio descritos anteriormente se convierten en positivas. Las citoquinas no cruzan la barrera placentaria, un nivel elevado de estas en la sangre del cordón umbilical sugiere la posibilidad de desarrollar sepsis en primeras horas de vida. Además, el análisis de citoquinas puede ser útil para predecir infección de inicio tardío(28).

La aparición secuencial y desaparición de los biomarcadores durante la sepsis puede permitir que sean usados para detectar infecciones neonatales, independientemente de la etapa. Un estudio realizado por Celik et al. demostraron que la combinación de IL-6 y la PCR fue superior al uso de cada uno de ellos individualmente para la detección precoz de la sepsis neonatal. Del mismo modo, Abdollahi et al. mostró que la combinación de IL-6, CRP, y PCT es altamente predictiva para el diagnóstico de sepsis de aparición temprana. Mientras que los

costos de cada uno de estos biomarcadores son significativos en relación con el costo de antibióticos, su utilidad potencial en la reducción de la hospitalización hace que su uso sea más atractivo(1).

2.7.2 Biomarcadores inflamatorios en el Diagnóstico de sepsis. El aislamiento microbiológico en la infección neonatal no se logra antes de 36 – 48 horas, por lo cual se requieren análisis de laboratorio exactos que descarten la infección prontamente y eviten el uso innecesario de antibióticos. La medición de citoquinas y marcadores bioquímicos como PCR y TNF-  $\alpha$  han surgido como alternativas a este problema(18).

Al momento no hay un único marcador que tenga una ventaja significativa sobre los demás para el diagnóstico de sepsis neonatal. Por lo cual muchos neonatos con sospecha de sepsis neonatal son expuestos a terapia antibiótica hasta que excluya el diagnóstico de sepsis o se encuentre patógeno causante y se defina manejo, lo cual ocurre en una pequeña proporción de pacientes (21,29).

Las citoquinas son mensajeros polipeptídicos de bajo peso molecular producto de macrófagos y linfocitos en respuesta a estimulaciones antigénicas o productos de inflamación que a ser medidas son útiles en el diagnóstico de sepsis neonatal. En estudios se ha demostrado la elevación de la citoquinas proinflamatorias en procesos de sepsis neonatal temprana y tardía, proyectándolos como una herramienta potencial costo – efectiva para diagnóstico rápido y preciso (18,19,27).

Las utilidades de diagnóstico (sensibilidad, especificidad, VPP Y VPN) determinan la utilidad de un test clínico, el cual debe poseer una aceptable sensibilidad ( $\pm$  80%), una excelente sensibilidad y un VPN de  $\pm$  100 %. Un biomarcador ideal debería aumentar rápidamente y tener una buena ventana de diagnóstico (22). A pesar de la inmadurez del sistema inmune del neonato, éste reacciona a la infección por varias vías, produce biomarcadores usados como indicadores potenciales para fines de diagnóstico y pronóstico, que según su aparición se pueden clasificar en tres grupos: fase temprana (IL-6, IL-8, CD64, sICAM, TNF-a e IFN-g), fase media (PCT) y la fase tardía (PCR) (24,30) .

Marcadores más nuevos como sICAM y CD64 también tienen el potencial de detectar casos de sepsis en la etapa temprana de la enfermedad, con una alta sensibilidad, pero menor especificidad (24).

2.7.3 Interleuquina 6 en el diagnóstico de sepsis neonatal. La IL- 6 es un marcador sensible en la fase temprana de la infección. Sin embargo, no se puede utilizar como un marcador confiable en etapas posteriores de la enfermedad, debido a su corta vida media (31).

En sujetos saludables las concentraciones de IL-6 pueden ser bajas como en rango de pg/ml pero en un episodio inflamatorio la IL- 6 es altamente producida y los niveles circulantes se pueden elevar desde 1-5 pg/ml a varios microgramos/ml en casos extremos. por tal razón, la IL- 6 es uno de los mediadores más altamente expresados en la inflamación (32) . Se han encontrado asociaciones entre altos niveles de IL-6 en líquido amniótico y parto pretérmino, en su mayoría cuando hay infección asociada, además también se han encontrado valores más altos de IL- 6 en sangre de cordón en recién nacidos de parto vaginal, que podrían ser debido a las contracciones uterinas y el músculo esquelético (32,33).

Su vida media es aproximadamente de 2h y ante la exposición a un proceso infeccioso se libera a las 1 – 2 horas con valores pico hacia las 3 horas y valores basales a las 8 horas. Además, sus niveles caen rápidamente ante la instauración de manejo antibiótico (34).

Estudios demuestran que el nivel sérico de IL- 6 es más alto en los casos con sepsis en comparación con lactantes sanos de control, además la IL-6 parece ser el mejor marcador para sepsis y mortalidad en comparación a IL- 8 e IL- 10 (31).

Resultados de diferentes estudios exponen una sensibilidad y especificidad máximas para IL -6 en comparación con otros marcadores como PCR. Además, se encontró que valor de IL - 6 aumenta en pacientes con sepsis y es proporcional a la gravedad de la infección. Los valores promedio de IL6 en los estudios mostraron que una IL6 por encima de 68 pg / ml tiene un 85% de sensibilidad y un 80% de especificidad(18). Otro meta-análisis reporta que la IL-6 tiene una sensibilidad del 80.0%, una especificidad del 75.0% y un AUC de 0.868 para la detección de sepsis o sepsis temprana (35).

También se han usado valores de IL – 6 obtenidos de sangre de cordón umbilical, que reportan 87-100% de sensibilidad con 93-100% de valor predictivo negativo en casos de sepsis neonatal temprana(19).

## 2.8 TRATAMIENTO

Los antibióticos hacen parte de las medicaciones más usadas en las unidades de cuidados intensivos y de todos los neonatos que reciben manejo antibiótico, solo el 5% tendrán un cultivo positivo. La mayoría se dan de forma empírica generalmente por 72 horas con el alto riesgo de uso inapropiado y aumentar el desarrollo de gérmenes resistentes (36).

La ampicilina y gentamicina siguen siendo la piedra angular del régimen antimicrobiano de primera línea para la sepsis neonatal temprana. La combinación de estos antibióticos de amplio espectro cubre la causa más común de sepsis temprana (GBS y E coli en más de 70%), además que esta combinación posee la ventaja de tener actividad sinérgica (contra GBS y *Listeria monocytogenes*). El régimen de dosificación para la ampicilina puede cambiar con el tiempo en función de la edad cronológica del infante y el peso(2,36).

En sepsis de inicio tardío se recomienda el uso empírico de algún antibiótico antiestafilococo más un aminoglucósido y limitar el uso de vancomicina para casos confirmados de resistencia a meticilina.

Cefalosporinas de tercera generación pueden ser usadas cuidadosamente. Existe asociación significativa entre el uso de cefalosporinas de tercera generación y la candidiasis invasiva en niños. La cefotaxima tiene una excelente penetración al LCR y su uso terapéutico debe limitarse a la meningitis por Gram-negativos(2).

En caso de riesgo de sepsis por *Candida* como acceso venoso central, intubación orotraqueal, trombocitopenia, exposición a carbapenem y cefalosporinas el recién nacido debe recibir manejo antifúngico empírico (36).

La duración de la terapia antibiótica: Los recién nacidos con hallazgos radiológicos pulmonares como infiltrados dentro de los primeros 3 días de vida en ausencia de factores de riesgo adicionales incluyendo corioamnionitis, bacteriemia, requerimiento de O<sub>2</sub> > 8 horas y que permanezca asintomático a las 48 horas de tratamiento, la duración puede ser 4 días, sepsis leve o sospecha 5 o 7 días, la bacteriemia 10 días. meningitis y otras bacterias gram-positivas 14-21 días. Meningitis por Gram-negativos 21 ó 14 días después de un cultivo de líquido cefalorraquídeo negativo. Si presenta hemocultivos negativos y está clínicamente estable, se puede suspender en las 48 – 72 horas de su inicio(2,36).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la precisión diagnóstica de la interleuquina (IL)-6 como marcador de infección en neonatos con sospecha de sepsis.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir las características sociodemográficas y clínicas de los neonatos con y sin sospecha de infección, hospitalizados en UCIN y UCBN del HUHMP de Neiva.

Medir el rendimiento operativo (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) de la IL 6 en sepsis neonatal.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de casos y controles para evaluar la utilidad de una prueba diagnóstica.

### 4.2 HIPÓTESIS OPERATIVA

H<sub>0</sub>: Niveles de IL 6 en los casos =Niveles de IL 6 en los controles.

H<sub>a</sub>: Niveles de IL 6 en los casos ≠Niveles de IL 6 en los controles.

### 4.3 POBLACIÓN

4.3.1 Criterios de inclusión. Definición de caso: Recién nacidos con sospecha y/o diagnóstico de sepsis según el consenso internacional de sepsis pediátrica, que ingresen a la UCIN y UCBN del HUHMP de Neiva durante el periodo del estudio.

Se define sepsis como(37):

- Sepsis neonatal temprana: ocurre dentro de las primeras 72 horas de vida y es causada por transmisión vertical.
- La sepsis neonatal tardía: Ocurre luego de las 72 horas de vida y se debe principalmente a patógenos adquiridos en el periodo postnatal.
- Sepsis confirmada: Los episodios en los que hay signos clínicos de infección y un hemocultivo positivo.
- Sepsis probable: Si el paciente tiene al menos 2 resultados de laboratorio alterados.
- Sepsis posible: Alteración clínica, incertidumbre en el diagnóstico que tampoco puede ser descartado.

- Definición de control: Recién nacidos Hospitalizados por causas no infecciosas en la UCIN y UCBN del HUHMP de Neiva durante el periodo del estudio.

#### 4.3.2 Criterios de exclusión

Recién nacidos que por su condición no requieran extracción de sangre durante su hospitalización.

Recién nacidos cuyo representante legal no acceda a firmar consentimiento informado.

Inestabilidad hemodinámica, infecciones TORSCH y malformaciones congénitas mayores.

#### 4.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para conocer el tamaño muestral inicialmente usaron los registros de la UCIN del total que mostraron que durante el año 2015 de 392 pacientes. Para una frecuencia esperada de sepsis del 20% y con límites de confianza del 5%, se calculó una muestra de 78 casos de sepsis con relación 1:2 a los controles con un nivel de confianza del 95% para un total de 156 pacientes (38).

#### 4.5 MUESTREO

Se realizó un muestreo no probabilístico, consecutivo de recién nacidos con sospecha y/ o diagnóstico de sepsis neonatal que ingresen a la UCIN y UCBN del HUHMP entre mayo de 2016 a mayo de 2017. Como criterios de sepsis se aplicaron los del consenso internacional de sepsis pediátrica: definiciones de sepsis y disfunción de órganos en pediatría(39). Como grupo de comparación, se incluyeron neonatos de similares características que se encontraban hospitalizados en la UCIN y UCBN por causas no infecciosas, a una relación de 1:2.

#### 4.6 PROCEDIMIENTO

Una única muestra de sangre fue tomada por personal entrenado de la UCIN a todos los neonatos que cumplan los criterios de inclusión. Esta muestra

consistente en 1 ml, que fue recolectado en un tubo con anticoagulante EDTA (tapa lila) y transportado al laboratorio de Infección e Inmunidad de la *Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana*. La muestra fue centrifugada a 200 x g y el plasma será colectado y congelado a -70°C hasta el momento de su análisis. De notar, ningún procedimiento adicional al que amerita el paciente por su indicación médica fue realizado.

Para la detección de IL-6 en plasma por ELISA se empleó el estuche comercial Human IL-6 DuoSet ELISA (R&D, Minneapolis, Cat: DY206), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El límite de detección del ensayo es de 1.5pg/mL. Las muestras se analizaron por duplicado y en diluciones seriadas a un factor de dilución de 2. Una curva estándar fue creada con IL-6 humana recombinante proveída por el fabricante.

#### 4.7 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Nivel de medición	Definición operativa
Edad gestacional	Tiempo de gestación en semanas al momento del nacimiento, definido por capurro, ballard o ecografía gestacional del primer trimestre.	Numérica continua	Semanas
Tiempo de ruptura prematura de membranas	tiempo transcurrido en horas desde la solución de continuidad espontánea de las membranas corioamnióticas desde las 22 semanas de gestación hasta antes del inicio del trabajo de parto.	Numérica continua	Horas

Valores de APGAR al minuto	Escala rápida para evaluar la condición y el pronóstico del recién nacido propuesta por Virginia Apgar en 1952. Evalúa 5 características: frecuencia cardíaca, esfuerzo respiratorio, tono muscular, irritabilidad y color.	ordinal	0. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.
Valores de APGAR a los 5 minutos	Escala rápida para evaluar la condición y el pronóstico del recién nacido propuesta por Virginia Apgar en 1952. Evalúa 5 características: frecuencia cardíaca, esfuerzo respiratorio, tono muscular, irritabilidad y color.	ordinal	0. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.
Peso al nacer	Peso en gramos del recién nacido inmediatamente después de su nacimiento	Numérica continua	Gramos (gr)
Temperatura: Fiebre/hipotermia	Temperatura corporal medida con termómetro	Numérica continua	Grados Celsius (C°)
Numero de leucocitos (diferencial)	Cantidad de leucocitos en sangre medido en el primer hemograma	Numérica continua	millones /mm <sup>3</sup>
Numero de plaquetas	Cantidad de plaquetas en sangre medido en el primer hemograma	Numérica continua	millones /mm <sup>3</sup>
Valor de PCR	Nivel plasmático de proteína C reactiva, que se eleva en respuesta a la inflamación	Numérica continua	mg/dl
Valor de procalcitonina	Niveles plasmáticos de la procalcitonina usado como marcador de infección que ayuda a distinguir la	Numérica continua	ng/ml

	sepsis de otras causas de SRIS.		
Niveles de Interleuquina 6	Niveles plasmáticos de interleuquina 6. Esta citoquina inflamatoria es usada como marcador sensible en la fase temprana de infección.	Numérica continua	pg/ml
Hemocultivos positivos	numero de hemocultivos positivos	Ordinal	número
Parto vaginal	Nacimiento por vía vaginal	Nominal dicotómica	0. No 1. Si
Parto instrumentado	El parto instrumentado es aquel que en el momento del expulsivo requiere de la utilización de un instrumento, ya sea ventosa, espátula o fórceps.	Nominal dicotómica	0. No 1. Si
Cesárea	Nacimiento mediante intervención quirúrgica cuando el parto vaginal podría conducir a complicaciones médicas.	Nominal dicotómica	0. No 1. Si
Uso esteroide preparto	Uso de corticoesteroides en el embarazo con el fin de reducir la insuficiencia respiratoria del recién nacido.	Nominal dicotómica	0. No 1. Si
Corioamnionitis	Inflamación aguda de las membranas placentarias (amnios y corion), de origen infeccioso que se acompaña de la infección del contenido amniótico, esto es, feto, cordón y líquido amniótico.	Nominal dicotómica	0. No 1. Si

Sexo	Conjunto de características biológicas, físicas, fisiológicas y anatómicas que definen a los seres humanos como hombre y mujer.	Nominal dicotómica	0. femenino 1. masculino
Requirió reanimación	Resucitación cardiopulmonar al nacer.	Nominal dicotómica	0. No 1. Si
Líquido meconiado	Cuando el meconio es expulsado al líquido amniótico antes del nacimiento o durante el parto.	Nominal dicotómica	0. No 1. Si
Controles prenatales	La atención médica durante el embarazo que incluye controles regulares y análisis prenatales. Adecuado: mayor o igual a 6. Deficiente: menor que 6.	Nominal dicotómica	0. Adecuado 1. Deficiente

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 5.1 CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN

Los resultados recolectados para el estudio se tabularon y almacenaron en Microsoft Excel® 2016 y se utilizó un sistema numérico de codificación de las variables cualitativas para facilitar su análisis estadístico (Categorización).

Los datos fueron analizados con el software Stata versión 12, para su análisis descriptivo, bivariado, multivariado y de rendimiento diagnóstico.

### 5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se desarrolló el análisis bivariado con el objetivo de evidenciar la relación de las variables disponibles de acuerdo con los objetivos definidos para este estudio. Se realizaron contrastes o comparaciones de proporciones para las variables cualitativas mediante los test de chi cuadrado o exacto de Fisher, según la presencia de distribución normal o no de los datos, respectivamente. Para las variables cuantitativas, se determinó inicialmente su patrón de distribución mediante métodos gráficos y el test de shapiro wilks, al tratarse de variables de distribución no normal en su totalidad, se calcularon medianas con sus respectivos rangos intercuartílicos y se realizaron pruebas de contraste de hipótesis con Mann-Withney-Wilcoxon test para diferencias de rangos.

Se realizó luego un análisis multivariado mediante el modelamiento estadístico a través de regresión logística, con el objetivo de controlar potenciales variables de confusión o interacción, además del cálculo de los respectivos ORs (Odds ratio); se incluyeron las variables estadística y clínicamente significativas, estableciendo la independencia de los respectivos factores de riesgo o protectores. Se realizaron además pruebas estadísticas adicionales para determinar la validez y el desempeño de los modelos estadísticos.

Se efectuó finalmente un análisis de rendimiento diagnóstico mediante el cálculo en tablas de contingencia de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo; como el estudio se realizó bajo una prevalencia manipulada por la recolección de los datos, se hizo necesario el cálculo de las respectivas razones de verosimilitud para realizar el debido ajuste de los valores predictivos

post-test. Se analizó también el poder de discriminación diagnóstica a través del ROC test.

Se ejecutaron además pruebas estadísticas adicionales para determinar la validez y el desempeño de los modelos estadísticos. Todas las pruebas estadísticas calculadas tuvieron un valor de significancia ( $p$ ) inferior a 0.05. Finalmente, todos los resultados fueron presentados mediante tablas y graficas según el caso respectivo.

## 6. CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO

### 6.1 SITIO DE INVESTIGACIÓN

Universidad Surcolombiana, Laboratorio de Infección & Inmunidad, Programa de Medicina, Facultad de Salud. Neiva, Colombia.

Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo. Neiva, Colombia.

### 6.2 ARCHIVO DE DATOS Y SISTEMATIZACIÓN

Se diligencio una ficha en físico de recolección de datos que contiene información clínica y epidemiológica de importancia para el estudio. Los datos se tomaron de los registros de historia clínica por parte de los investigadores y se completó la información faltante de una entrevista al representante legal del recién nacido. La transcripción de la ficha se hizo con doble digitación por dos personas diferentes a una base de datos en Excel que contiene las variables de interés. Todos los archivos pertenecientes al estudio fueron archivados en una carpeta digital con el nombre de “Estudio sepsis” y las subcarpetas y archivos con el mismo nombre y un sufijo que nombró el tipo de archivo para facilitar su búsqueda. Por ejemplo “estudio sepsis-protocolo”. Esta carpeta digital fue subida a nube digital de la cuenta de las dos coinvestigadoras para evitar pérdida de cualquier documento.

### 6.3 CONFIDENCIALIDAD

Para garantizar la protección de los datos de carácter personal de los participantes del estudio, sólo los investigadores tuvieron acceso a la información. Se entiende por datos de carácter personal cualquier información numérica, alfabética, gráfica, fotográfica, acústica o de cualquier otro tipo concerniente a personas físicas identificadas o identificables.

## 7. RESULTADOS

Según lo calculado para el tamaño de la muestra, se recolectaron en total 182 pacientes, 64 casos y 118 controles, aproximándose a una relación 1:2; sin embargo, dado algunas dificultades en el proceso de toma, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras, no se contó con el análisis serológico de 15 pacientes en el grupo de los controles; por lo cual tuvieron que ser excluidos del análisis. Resultando así un grupo de 64 casos y 103 controles para una muestra total de 167 pacientes, lo cual se aproxima al número plantado de en el cálculo del tamaño muestral, obteniendo finalmente una proporción de 1.6 controles por cada caso.

### 7.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Se documentó una edad cronológica con mediana de 2 días de nacido y un rango intercuartílico (RIC) entre 1 y 7 días, encontrando la mayoría de pacientes del sexo masculino: 59.88%. La edad gestacional mediana al nacimiento fue de 35 semanas, siendo al menos una cuarta parte de la muestra neonatos a término; un 53.29% se consideraron pretérmino (menores de 37 semanas); y tras la exclusión de los tardíos, solo el 30.54% se consideraron pretérmino menores de 34 semanas. El peso al nacer presentó una mediana de 2450 gramos con un RIC de 1825 a 3100 y solo el 13.17% presentó un peso bajo para la edad gestacional (Tabla 3).

El APGAR a los 1,5 y 10 minutos presentó mediana de 8,9 y 10 puntos respectivamente (Figura 5), requiriendo maniobras de reanimación cardiopulmonar (RCP) en el 17.37%. La mitad de los nacimientos fueron por cesárea y solo el 12.12% requirieron parto instrumentado. El 41.32% de las maternas presentaron controles prenatales deficientes, un 13.17% presentaron un diagnóstico de pre-eclampsia y el 17.39% documentó una ruptura prematura de membranas con un tiempo mediano de 8 horas, con un 42.86% de las rupturas mayor de 12 horas y un 7.19% de corioamnionitis en la muestra total. El 6.59% de los neonatos fueron producto de gesta múltiples y el 16.36% recibió esteroide prenatal (Tabla 1).

Tabla 3. Análisis descriptivo y bivariado de los antecedentes perinatales.

VARIABLES	GENERAL n=167	CASOS n=64 (38.32)	CONTROLES n=103 (61.68)	<i>p</i>
Edad Cronológica (Días) ‡	2 (1-7)	3 (1-17)	1 (1-4)	0.000*
Sexo Masculino†	100 (59.88)	36 (56.25)	64 (62.14)	0.451
Edad Gestacional (Sem) ‡	35 (33-38)	37 (30-38)	35 (33-38)	0.788
Pretérmino < 37 sem †	89 (53.29)	30 (46.88)	59 (57.28)	0.190
Pretérmino < 34 sem†	51 (30.54)	23 (35.94)	28 (27.18)	0.232
Peso al Nacer (gr)‡	2450 (1,825-3,100)	2703 (1,585-3,205)	2365 (1,930-2,990)	0.671
BPEG†	22 (13.17)	7 (10.94)	15 (14.56)	0.501
APGAR 1‡	8 (8-8)	8 (7-8)	8 (8-8)	0.355
APGAR 5‡	9 (9-9)	9 (8-9)	9 (9-9)	0.241
APGAR 10‡	10 (10-10)	10 (9-10)	10 (10-10)	0.090
RCP†	29 (17.37)	16 (25.00)	13 (12.62)	0.040*
Cesárea†	83 (49.70)	29 (45.31)	54 (52.43)	0.371
Parto Instrumentado†	20 (12.12)	9 (14.06)	11 (10.89)	0.543
CPN Deficientes†	69 (41.32)	27 (42.19)	42 (40.78)	0.857
Sustancias Psicoactivas†	3 (1.80)	1 (1.56)	2 (2.08)	0.812
Pre-eclampsia†	22 (13.17)	4 (6.25)	18 (17.48)	0.058
Corioamnionitis†	12 (7.19)	10 (15.62)	2 (1.94)	0.001*
RPM†	28 (17.39)	14 (23.33)	14 (13.86)	0.125
Tiempo RPM (H) ‡	8 (4-24)	24 (8-72)	5 (4-8)	0.003*
RPM > 12h†	12 (42.86)	10 (71.43)	2 (14.29)	0.006*
Meconio†	8 (4.82)	5 (7.81)	3 (2.91)	0.263
Gesta Múltiple†	11 (6.59)	2 (3.12)	9 (8.74)	0.207
Esteroides Prenatales†	27 (16.36)	8 (12.50)	19 (18.81)	0.286

Fuente: † Variable cualitativa: frecuencia absoluta (n), frecuencia relativa (%); ‡ Variable cuantitativa: mediana (m), rango intercuartílico (RIC); \* Significancia estadística ( $p < 0.05$ ). BPEG: bajo peso para edad gestacional, RCP: reanimación cardiopulmonar, CPN: controles prenatales, RPM: ruptura prematura de membranas.

El 67.07% de los pacientes presentaron al menos un acceso venoso al momento del ingreso al estudio, con una mediana de 1 día y al menos un 25% ya tenía más de 2 días de canalización del mismo. El 26.95% de los neonatos se encontraron con requerimiento de ventilación mecánica en algún momento, el 13.17% de manera invasiva y el 16.77% no invasiva. La vía enteral de alimentación permaneció patente en el 91.02% de los pacientes, el 35.94% recibió lactancia materna, el 14.06% leche de fórmula y el 33.94% alimentación mixta; el 28.74% requirió una vía parenteral de nutrición (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis descriptivo y bivariado de los datos de hospitalización.

VARIABLES		GENERAL n=167	CASOS n=64 (38.32)	CONTROLES n=103 (61.68)	p
Acceso Venoso†		112 (67.07)	55 (85.94)	57 (55.34)	0.000*
Días Acceso Venoso‡		1 (1-2)	1 (1-5)	1 (1-2)	0.015*
Ruptura Barrera†		5 (2.99)	2 (3.12)	3 (2.91)	0.938
Enterocolitis Necrotizante†		2 (1.20)	2 (3.12)	0 (0.00)	0.145
Protección Gástrica†		1 (0.60)	0 (0.00)	1 (0.97)	1.000
Ventilación Mecánica (VM) †		45 (26.95)	23 (35.94)	22 (21.36)	0.039*
VM Invasiva†		22 (13.17)	14 (21.88)	8 (7.77)	0.009*
VM no Invasiva †		28 (16.77)	12 (18.75)	16 (15.53)	0.589
Alimentación Enteral†		152 (91.02)	55 (85.94)	97 (94.17)	0.070
Tipo Alimentación Enteral†	LM	23 (35.94)	65 (38.92)	42 (40.78)	0.337
	LF	9 (14.06)	26 (15.57)	17 (16.50)	
	Mixta	23 (35.94)	61 (36.53)	38 (36.89)	
Nutrición parenteral†		48 (28.74)	29 (45.31)	19 (18.45)	0.000*

e

Fuente: Variable cualitativa: frecuencia absoluta (n), frecuencia relativa (%); ‡ Variable cuantitativa: mediana (m), rango intercuartílico (RIC); \* Significancia estadística (p<0.05). LM: lactancia materna, LF: leche de fórmula.

La frecuencia cardíaca presentó una mediana de 141 latidos por minuto al momento del registro en el estudio, con una frecuencia respiratoria mediana de 45 respiraciones por minuto. El conteo leucocitario documentó una mediana de 11,500 cel/ml con un 52% de neutrófilos y un 30% de linfocitos, y el conteo plaquetario varió de 203000 a 371000 en el RIC; los niveles serológicos de

proteína C reactiva y procalcitonina presentaron medianas de 0.29 mg/dl y 1.05 ng/ml respectivamente. Hemocultivos se realizaron en el 89.06% de los casos y tan solo el 14.04% fueron positivos . (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis descriptivo y bivariado de los registros clínicos y paraclínicos.

VARIABLES	GENERAL n=167	CASOS n=64 (38.32)	CONTROLES n=103 (61.68)	<i>p</i>
Frecuencia Cardiaca‡	141 (132-154)	147 (135-158)	140 (130-149)	0.001*
Frecuencia Respiratoria‡	45 (40-49)	45 (40-49)	44 (41-49)	0.589
Hipotensión†	1 (0.60)	0 (0.00)	1 (0.97)	1.000
Alteración Perfusión†	3 (1.80)	2 (3.12)	1 (0.97)	0.559
Cambio Mental†	5 (2.99)	3 (4.69)	2 (1.94)	0.372
Leucocitos‡	11500 (8500-15750)	11800 (8300-16700)	11400 (9100-14200)	0.758
Neutrófilos (%)‡	52 (44-64)	59 (47-64)	49 (41-63)	0.055
Neutrófilos‡	5537 (4182-8500)	6450 (4200-10200)	5094 (4100-8000)	0.154
Linfocitos (%)‡	30 (21-41)	25 (19-36)	32 (23-43)	0.051
Linfocitos‡	3650 (2350-5250)	3600 (1900-5800)	3700 (2400-5200)	0.953
Plaquetas‡	280 (203-371)	274 (220-395)	284 (198-349)	0.662
PCR (mg/dl)‡	0.29 (0.15-1.46)	0.71 (0.14-4.22)	0.21 (0.15-0.46)	0.012*
Procalcitonina (ng/ml)‡	1.05 (0.32-4.1)	1.05 (0.32-4.17)	1.23 (0.28-4.02)	0.612
Urocultivo†	1 (16.67)	1 (33.33)	0 (0.00)	1.000
Hemocultivo†	8 (14.04)	8 (14.04)	-	-

Fuente: Variable cualitativa: frecuencia absoluta (n), frecuencia relativa (%); ‡ Variable cuantitativa: mediana (m), rango intercuartílico (RIC); \* Significancia estadística ( $p < 0.05$ ). PCR: proteína C reactiva.

Finalmente, el 38.32% de los pacientes presentaron un diagnóstico de sepsis y se documentó una mediana de 3.80 pg/ml para los niveles séricos de interleucina 6, con una positividad del 25.75%(Tabla 6), tomada a partir de 18.4 pg/ml según el análisis de rendimiento diagnóstico que se expondrá en adelante.

Tabla 6. Análisis descriptivo y bivariado de sepsis e Interleucina 6.

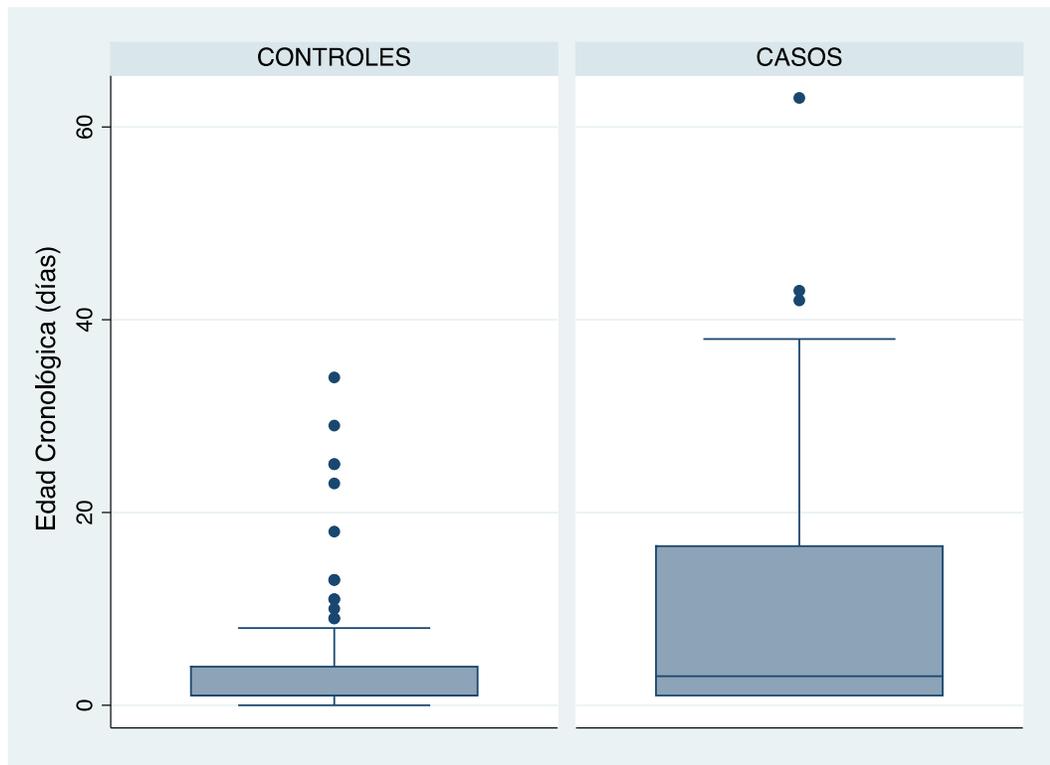
VARIABLES	GENERAL n=167	CASOS n=64 (38.32)	CONTROLES n=103 (61.68)	<i>p</i>
Sepsis†	64 (38.32)	64 (100.00)	0 (0.00)	0.000*
IL-6 Positiva (>18.4pg/ml)†	43 (25.75)	23 (35.94)	20 (19.42)	0.018*
IL-6 (pg/ml)‡	3.80 (2.3-20.22)	6.48 (2.3-47.81)	2.42 (2.3-14.64)	0.008*

Fuente: Variable cualitativa: frecuencia absoluta (n), frecuencia relativa (%); ‡ Variable cuantitativa: mediana (m), rango intercuartílico (RIC); \* Significancia estadística ( $p < 0.05$ ). IL-6: Interleucina 6, pg: picogramos

## 7.2 ANÁLISIS BIVARIADO

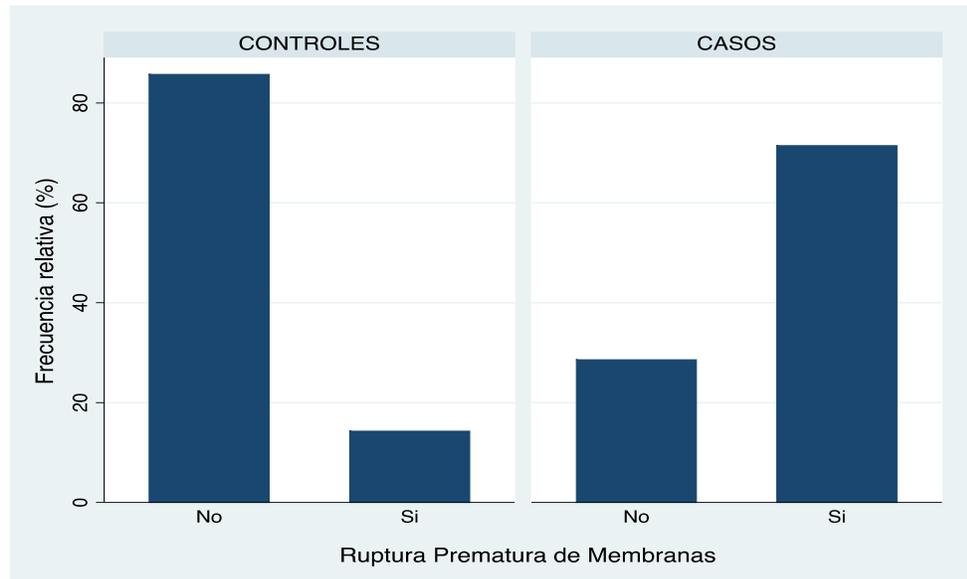
En general los grupos de casos y controles se encuentran aceptablemente balanceados, siendo comparables en la mayoría de las variables del estudio; sin embargo, y como es de esperarse, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en algunas variables las cuales pueden estar asociadas como posibles factores de riesgo o protectores, o pueden simplemente ser potenciales variables de confusión o interacción.

Figura 3. Distribución de la edad cronológica en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana de la edad y los rangos intercuartílicos son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable.



La edad cronológica en días al momento de la inclusión al estudio fue significativamente mayor en el grupo de los casos (Figura 3), sin diferencias en sexo, edad gestacional, peso al nacer ni en la escala de APGAR. La proporción de pacientes que requirió maniobras de reanimación fue también mayor en los casos, acompañada de la proporción con ruptura prematura de membranas mayor de 12 horas (Grafica 1) y corioamnionitis (Grafica 2), además de una mediana de tiempo de ruptura también mayor en el mismo grupo (Figura 4); todas estas con significancia estadística. No se encontraron diferencias en el resto de variables de los antecedentes perinatales (Tabla 1).

Grafica 1. Distribución de ruptura prematura de membranas en los controles y en los casos. Diagrama de barras, se aprecia una mayor proporción en el grupo de los casos.



Grafica 2. Distribución de corioamnionitis en los controles y en los casos. Diagrama de barras, se aprecia una mayor proporción en el grupo de los casos.

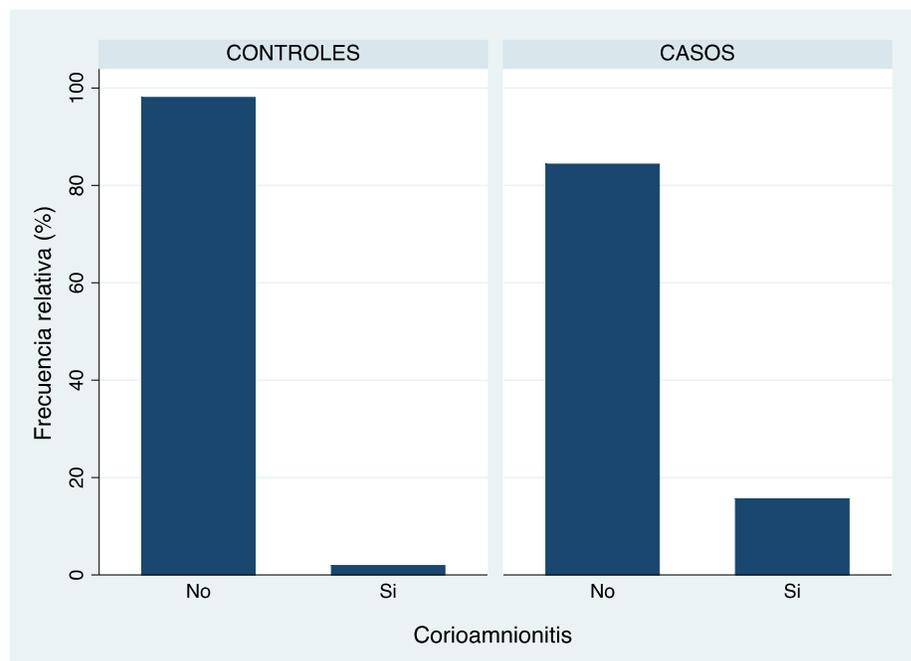


Figura 4. Distribución del tiempo de ruptura prematura de membranas en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana y los rangos intercuartílicos del tiempo en horas son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable.

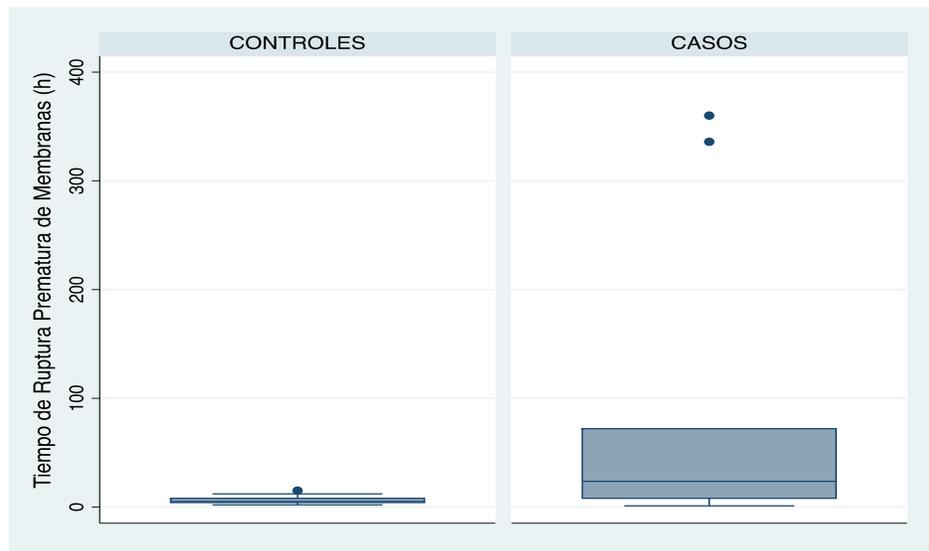
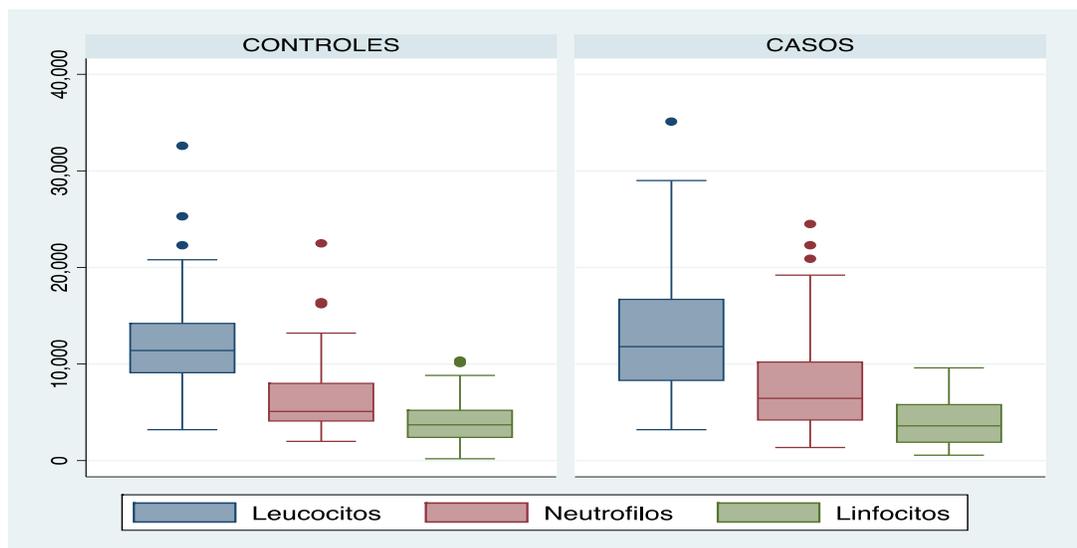


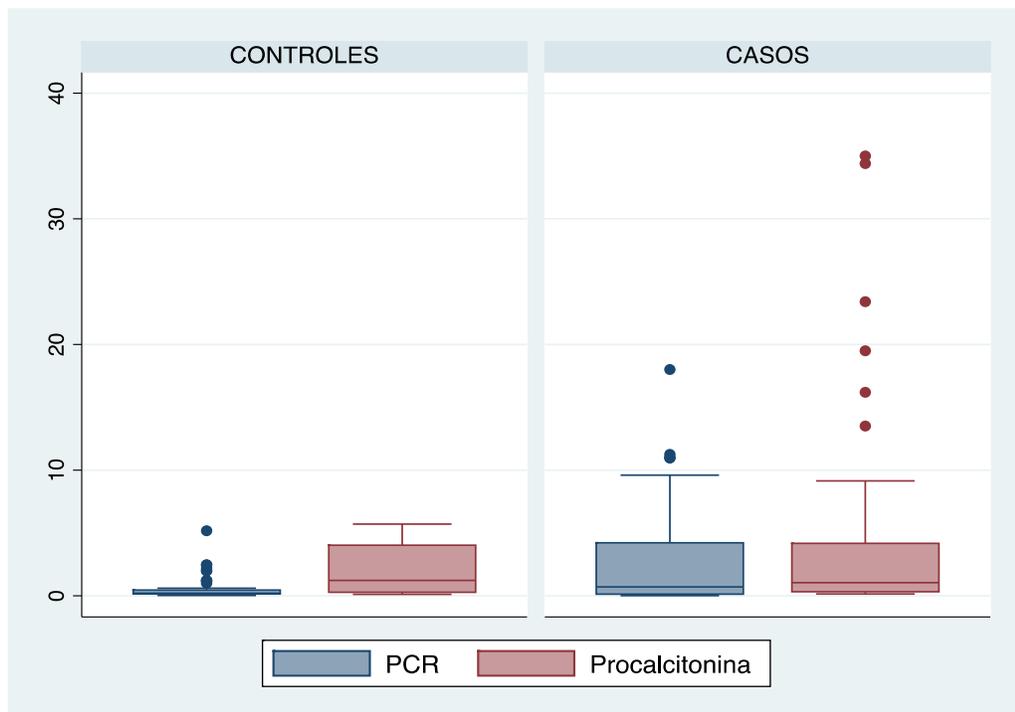
Figura 5. Distribución del conteo leucocitario en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana y los rangos intercuartílicos del conteo leucocitario, neutrófilos y linfocitos son relativamente menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de las variables.



Dentro de las variables de hospitalización (Tabla 2), se documentó diferencia estadísticamente significativa en relación con la canalización de acceso venoso, el tiempo del mismo, el requerimiento de ventilación mecánica, principalmente invasiva, y el soporte nutricional parenteral, siendo todas, proporcionalmente mayores en el grupo de los pacientes con sepsis, es decir, los casos.

Por otro lado, dentro de las variables clínicas y paraclínicas (Tabla 3), la frecuencia cardíaca y los niveles séricos de proteína c reactiva e interleucina 6 fueron significativamente mayores en el grupo de los casos (Figuras 5, Grafica 3); sin diferencias destacadas en el conteo leucocitario (Figura 6 ni de plaquetas, al igual que en los niveles de procalcitonina (Figura 7). Se detectó adicionalmente una diferencia entre los valores de Interleucina 6 por positividad de hemocultivos, sin embargo, esta no fue estadísticamente significativa (Figura 8).

Figura 6. Distribución de los reactantes de fase aguda en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana y los rangos intercuartílicos de PCR y procalcitonina son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable.



Grafica 3. Distribución de interleucina 6 positiva (>18.4 pg/dl) en los controles y en los casos. Diagrama de barras, se aprecia una mayor proporción en el grupo de los casos.

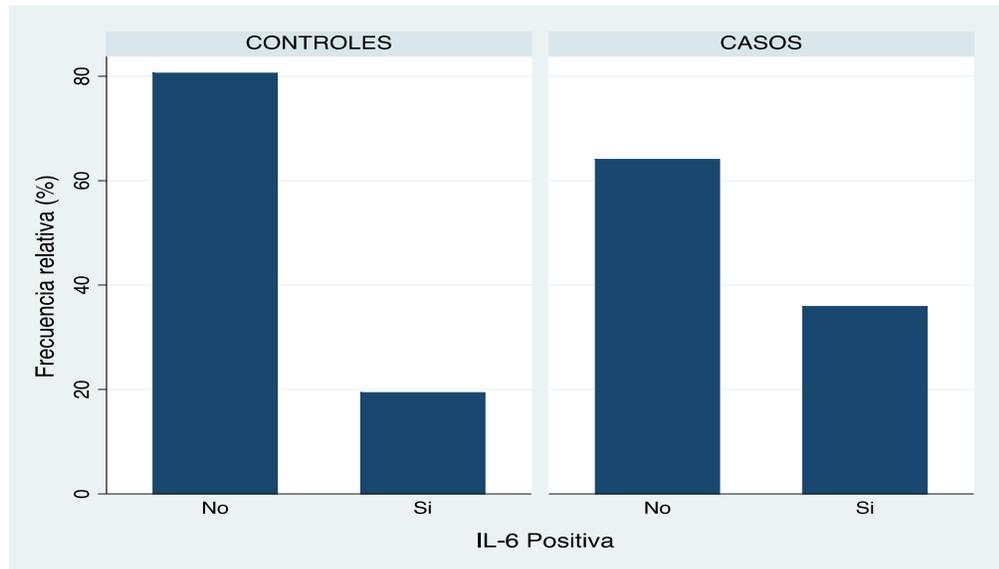


Figura 7. Distribución de la interleucina 6 en los controles y en los casos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana de la concentración sérica de interleucina 6 y los rangos intercuartílicos son menores en el grupo de los controles, además se sugiere una distribución no normal de la variable.

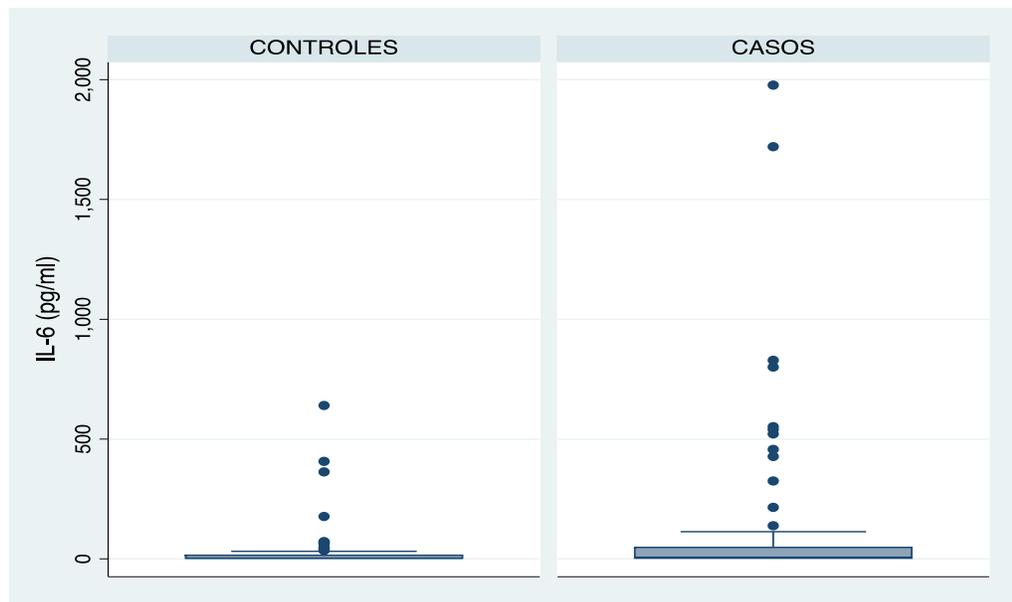
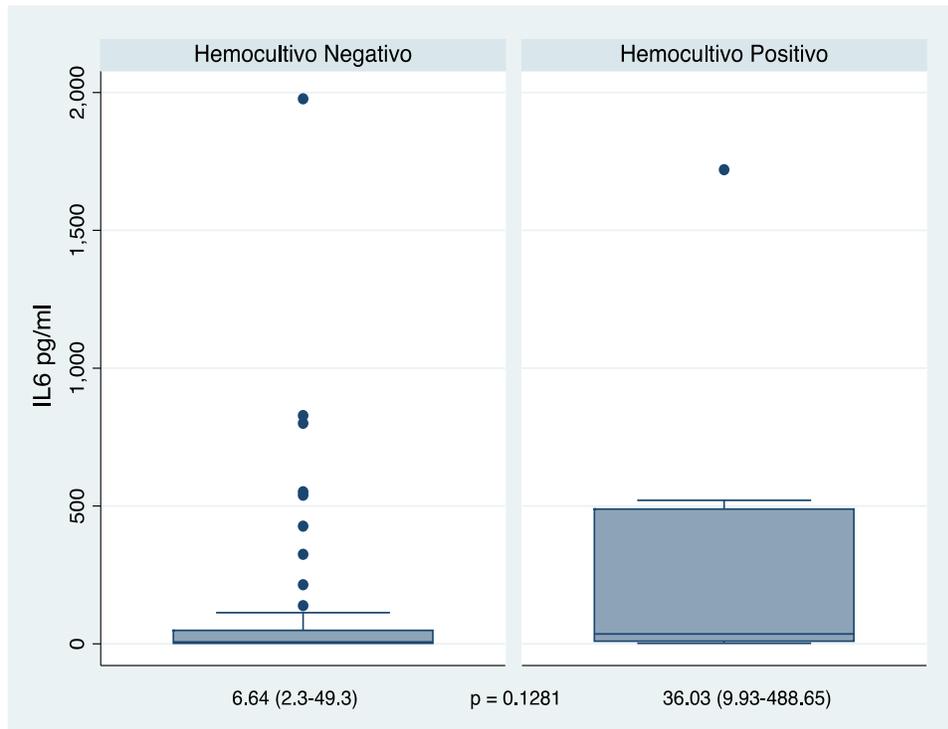


Figura 8. Distribución de la interleucina 6 por positividad de hemocultivos. Esquema de cajas y bigotes, se observa como la mediana de la concentración sérica de interleucina 6 y los rangos intercuartílicos son menores en el grupo de los hemocultivos negativos que en los positivos, además se sugiere una distribución no normal de la variable.



### 7.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Se descartó una correlación directa entre los niveles plasmáticos de interleucina 6 con la edad cronológica (Figura 9), la edad gestacional (Figura 10), y con los niveles plasmáticos de proteína c reactiva (Figura 11), dados por una Rho de Spearman muy bajo y sin significancia estadística ( $p > 0.05$ ); sin embargo, este último presentó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de interleucina 6 y de procalcitonina (Figura 12), pero con una relevancia clínica baja dada por un índice de correlación débil del 36.71%.

Figura 9. Correlación entre edad cronológica e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde no se aprecia ninguna correlación.

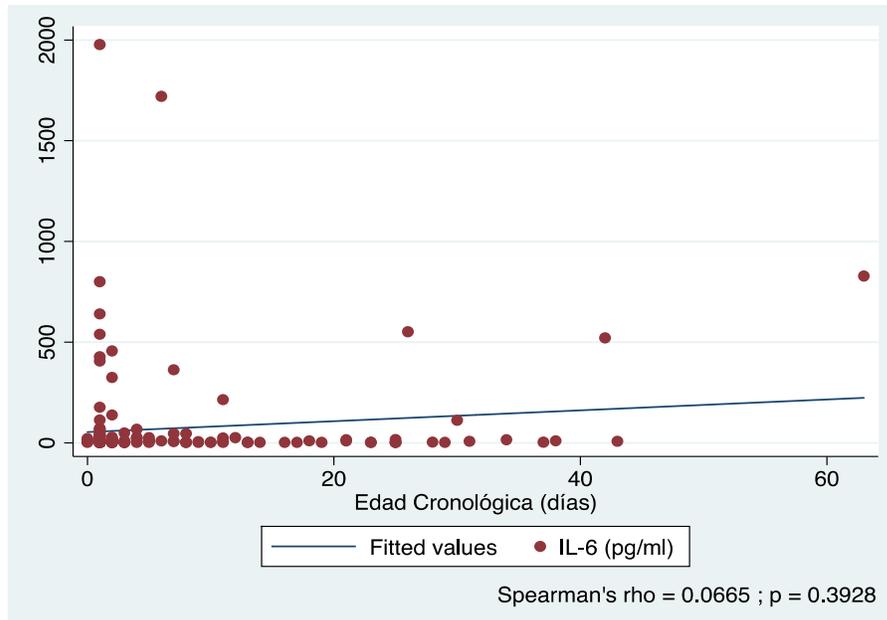


Figura 10. Correlación entre edad gestacional e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde no se aprecia ninguna correlación.

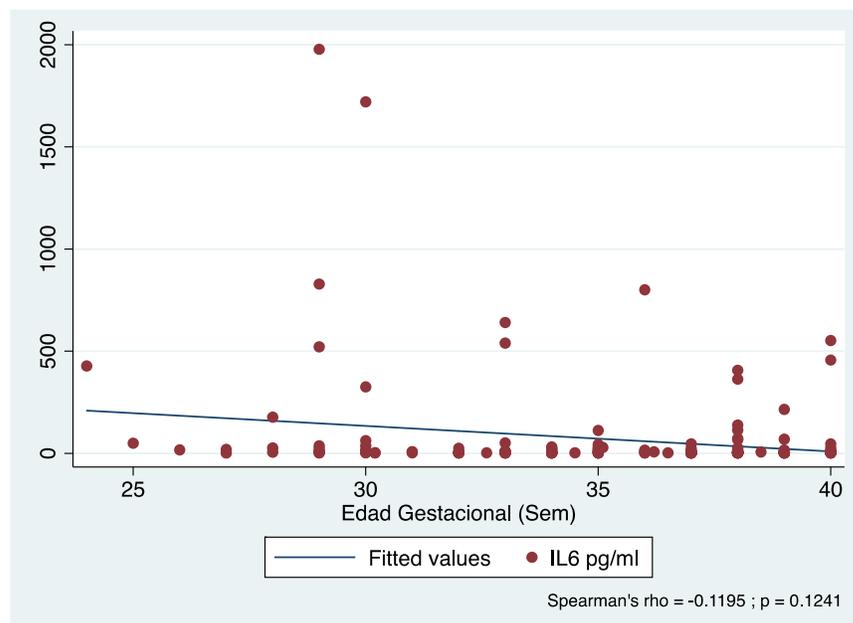


Figura 11. Correlación entre PCR e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde no se aprecia ninguna correlación.

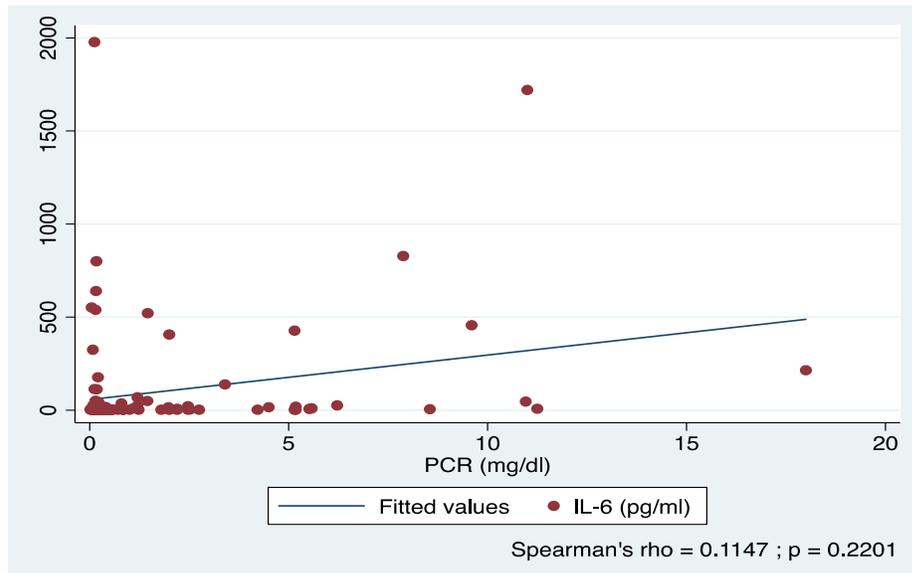
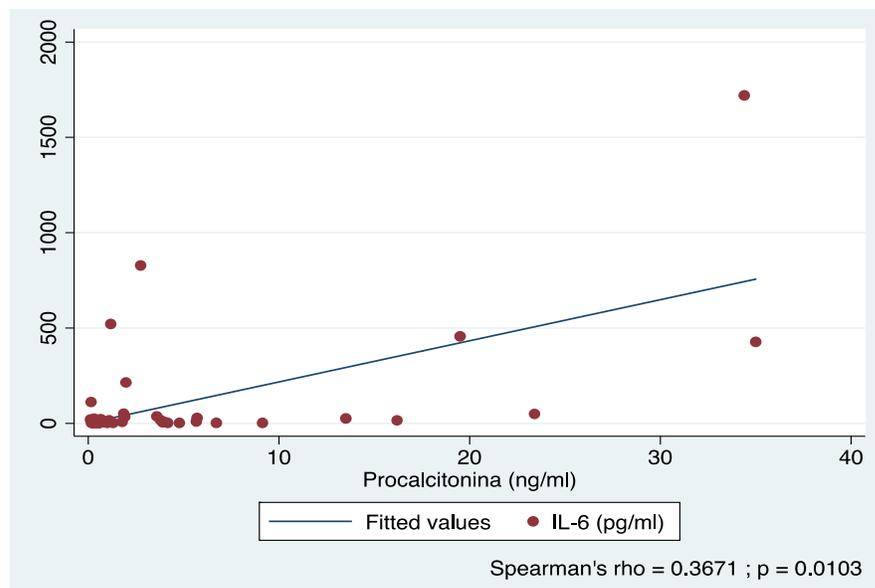


Figura 12. Correlación entre procalcitonina e interleucina 6. Encontramos en puntos rojos las observaciones de los niveles de IL6 y la línea azul representa los valores ajustados, donde se aprecia una correlación del 36.71%.



## 7.4 ANÁLISIS MULTIVARIADO

Luego de modelar estadísticamente mediante regresión logística todas las variables con significancia estadística y relevancia clínica, controlando la interacción y la confusión; se hallaron diferentes factores de riesgo independientes para el desarrollo de sepsis neonatal, tales como la edad cronológica al momento del ingreso, el requerimiento de maniobras de reanimación, la corioamnionitis, la ruptura prematura de membranas, el tiempo de dicha ruptura, la presencia de acceso venoso, el requerimiento de ventilación mecánica invasiva y nutrición parenteral, así como la taquicardia, la neutrofilia relativa y los niveles plasmáticos de proteína C reactiva e interleucina 6. Todos con ORs importantes, llegando a ser considerablemente altos para el caso de la corioamnionitis, la RPM, el acceso venoso, y las medidas de ventilación y nutrición invasivas. Por otro lado, se documentó la cesárea como factor protector independiente para el desarrollo de sepsis neonatal en nuestra población, con un OR de 0.34 que representa una reducción del riesgo en un 194% (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis multivariado para factores de asociación independientes mediante modelamiento estadístico por regresión logística.

VARIABLE	OR	IC	<i>p</i>
Edad Cronológica (Días)	1.08	( 1.03 - 1.12 )	0.014
RCP	2.31	( 1.03 - 5.19 )	0.022
Cesárea	0.34	( 0.12 - 0.98 )	0.045
Corioamnionitis	9.35	( 1.98 - 44.23 )	0.015
RPM > 12h	4.46	( 2.26 - 15.64 )	0.005
Tiempo RPM (H)	1.19	( 1.01 - 1.41 )	0.029
Acceso Venoso	4.93	( 2.21 - 11.03 )	0.016
VM Invasiva	3.33	( 1.31 - 8.46 )	0.012
Nutrición parenteral	3.66	( 1.82 - 7.38 )	0.006
FC (10 lpm)	1.52	( 1.21 - 1.92 )	0.024
Neutrófilos (10%)	1.15	( 1.06 - 1.24 )	0.035
PCR (mg/dl)	1.63	( 1.18 - 2.24 )	0.003
IL-6 (10 pg/ml)	1.25	( 1.04 - 1.50 )	0.017
IL-6 Positiva (>18.4 pg/ml)	2.33	( 1.15 - 4.72 )	0.029

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, RCP: reanimación cardiopulmonar, RMP: ruptura prematura de membranas, VM: ventilación mecánica, FC: frecuencia cardiaca, lpm: latidos por minuto, PCR: proteína C reactiva, IL-6: interleucina 6, pg: picogramos.

## 7.5 ANÁLISIS DE RENDIMIENTO DIAGNOSTICO

Tabla 8. Análisis de rendimiento diagnóstico para IL-6 con punto de corte > 4.6 pg/ml.

		Sepsis		167
		(+)	(-)	
IL-6	(+)	36	45	81
	(-)	28	58	86
		64	103	167

Sensibilidad	0.56	56%
Especificidad	0.56	56%
VPP (pre)	0.44	44%
VPN (pre)	0.67	67%
LRP	1.29	
LRN	0.78	
Prevalencia Real	0.20	20%
Odds pre	0.25	
Odss post (+)	0.32	
Odds post (-)	0.19	
VPP (post)	0.24	24%
VPN (post)	0.84	84%

Fuente: IL-6: interleucina 6, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, LRP: razón de verosimilitud positiva, LRN: razón de verosimilitud negativa.

Se evaluó en primera medida el punto de corte para positividad de la prueba, con aumentos progresivos por duplicación del mismo (Tablas 6 a 8), hasta lograr significancia en términos de sensibilidad y/o especificidad, además de una diferencia estadística entre los grupos comparados; determinando así como positividad optima de la prueba niveles plasmáticos mayores a 18.4 pg/ml (Tabla

8), con una especificidad aceptable a pesar de una muy baja sensibilidad y unas razones de verosimilitud poco significativas, con unos valores predictivos ajustados por la prevalencia real adecuados. Entendiendo que a este punto de corte la prueba logra una adecuada especificidad y valor predictivo negativo post-test, sacrificando la sensibilidad; por lo que se considera una prueba altamente específica y no sensible.

Tabla 9. Análisis de rendimiento diagnóstico para IL-6 con punto de corte > 9.2 pg/ml.

		Sepsis		167
		(+)	(-)	
IL-6	(+)	28	34	62
	(-)	36	69	105
		64	103	167

Sensibilidad	0.44	44%
Especificidad	0.67	67%
VPP (pre)	0.45	45%
VPN (pre)	0.66	66%
LRP	1.33	
LRN	0.84	
Prevalencia Real	0.20	20%
Odds pre	0.25	
Odss post (+)	0.33	
Odds post (-)	0.21	
VPP (post)	0.25	25%
VPN (post)	0.83	83%

IL-6: interleucina 6, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, LRP: razón de verosimilitud positiva, LRN: razón de verosimilitud negativa.

Finalmente se analizó el poder de discriminación diagnóstica de la prueba mediante el uso de curvas ROC (Figura 11), encontrando un área bajo la curva del 61.73% con un porcentaje de correcta clasificación del 66.47%, valores que son aceptables, pero no óptimos para una prueba que planea aplicarse como tamizaje;

pero que pudiere funcionar adecuadamente, teniendo en cuenta estos valores aunados a los de especificidad y valor predictivo negativo, como una prueba confirmatoria o de segunda generación.

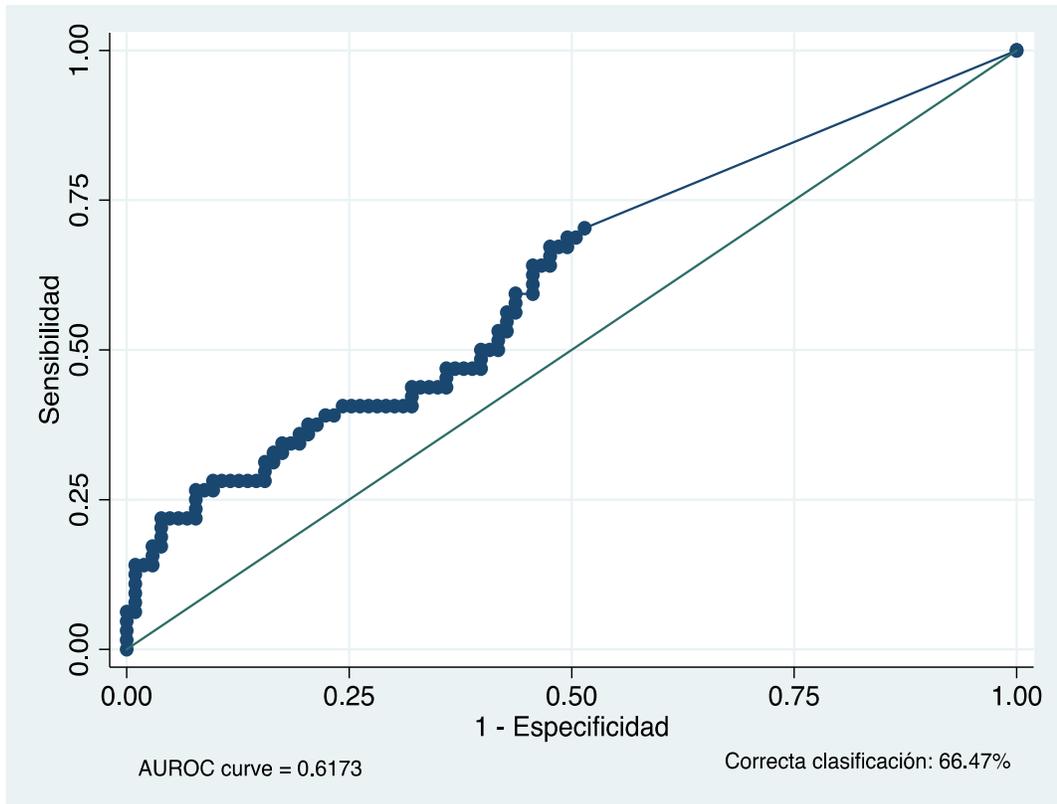
Tabla 10. Análisis de rendimiento diagnóstico para IL-6 con punto de corte > 18.4 pg/ml.

		Sepsis		167
		(+)	(-)	
IL-6	(+)	23	20	43
	(-)	41	83	124
		64	103	167

Sensibilidad	0.36	36%
Especificidad	0.81	81%
VPP (pre)	0.53	53%
VPN (pre)	0.67	67%
LRP	1.85	
LRN	0.79	
Prevalencia Real	0.20	20%
Odds pre	0.25	
Odss post (+)	0.46	
Odds post (-)	0.20	
VPP (post)	0.32	32%
VPN (post)	0.83	83%

IL-6: interleucina 6, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, LRP: razón de verosimilitud positiva, LRN: razón de verosimilitud negativa.

Figura 13. Análisis de construcción de curva ROC para IL-6. Encontrando un área bajo la curva del 61.73%.



## 8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con la Ley 23 de 1981, donde se dictan las normas en materia de la ética médica, y los principios establecidos en la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, se clasifica en investigación con riesgo mínimo, dado que se usarán muestras de sangre obtenidas de los neonatos, por profesional entrenado y corresponde a menos de 2% de la volemia. Este estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- Explicar brevemente los principios éticos que justifican la investigación de acuerdo a una normatividad a nivel internacional y a nivel nacional.
- Revelar que el conocimiento que se pretende producir no puede obtenerse por otro medio idóneo (fórmulas matemáticas, investigación en animales).
- Expresar claramente los riesgos y las garantías de seguridad que se brinda a los participantes.
- Contar con el consentimiento Informado y por escrito del responsable legal del paciente.
- Establecer que la investigación se llevará a cabo cuando se obtenga la autorización del representante legal de la institución en donde se realice la investigación; el consentimiento informado de los participantes y la aprobación del proyecto por parte del comité de ética.
- Las hojas de instrumento de recolección de datos quedaran bajo custodia exclusiva del investigador, bajo absoluta confidencialidad y reserva del secreto profesional. Igualmente se tendrán en cuenta los principios básicos que guían la conducta investigativa biomédica a nivel internacional y los principios de la bioética.
- El diagnóstico precoz y tratamiento de la sepsis neonatal son un reto, en este contexto, se han realizado estudios sobre diversos marcadores diagnósticos como los índices hematológicos, reactantes de fase aguda, PCR, PCT, citoquinas y

marcadores de superficie celular entre otros. Sin embargo, aún existe una amplia brecha de investigación en la búsqueda de biomarcadores con alta precisión diagnóstica y validez, este estudio se realiza con la finalidad de evaluar una herramienta promisorio (IL6) en la aproximación diagnóstica temprana e inicio de antibioticoterapia oportuna y racional, de esta manera disminuir el uso generalizado, prolongado de antibióticos en muchas ocasiones innecesario y mejorar el resultado de los desenlaces en este proceso infeccioso.

La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. Los investigadores cumplirán con la confidencialidad de los datos que obtengan, la información que se recoja se utilizará solamente para este estudio. Para la participación de los neonatos se contará con un consentimiento informado que será plenamente explicado a sus representantes legales. La participación o retiro del estudio es completamente voluntaria.

## 9. DISCUSIÓN

La sepsis neonatal es un problema mayor en las unidades de cuidado intensivo neonatal alrededor del mundo(40), especialmente para neonatos pretérmino(34). Aunque su diagnóstico y tratamiento temprano es muy importante para prevenir mortalidad y morbilidad (41), previos estudios han documentado la dificultad que conlleva obtener un diagnóstico preciso basado en un único marcador (42).

Dado que los síntomas son los mismos, es difícil determinar si los pacientes tienen una infección bacteriana o viral. Al contrario de las infecciones de etiología viral, las bacterianas pueden ser potencialmente mortales si no se las trata(43).

En la actualidad, existen muchos marcadores para diferenciar entre las infecciones bacterianas y virales, pero los más frecuentes son el recuento de leucocitos, el recuento absoluto de neutrófilos, la VSG, la proteína C-reactiva y la procalcitonina en muestras seriadas (43).

Dado que la sepsis es una respuesta inflamatoria sistémica a la infección, el hemocultivo todavía se considera el método estándar de oro para su diagnóstico (44), sin embargo, sus resultados pueden tardar hasta 72 horas y frecuentemente el tratamiento antibiótico se inicia antes de que sus resultados sean conocidos(34).

Además la profilaxis antibiótica intra parto y la pequeña cantidad de volumen de sangre recolectada de los neonatos han sido consideradas como razones para la falta de credibilidad en resultados negativos (44). Por esta razón múltiples biomarcadores han sido investigados en sepsis, con resultados controversiales acerca de su uso diagnóstico(35).

En los últimos 25 años, las proteínas de fase aguda, componentes del complemento, citoquinas, moléculas de adhesión y marcadores de la superficie celular, se han investigado para el diagnóstico temprano de sepsis neonatal(45). Actualmente los marcadores más comúnmente usados para su diagnóstico son la proteína C reactiva, la procalcitonina, la IL 6 y una combinación de los anteriores (40).

La IL 6 es un potente mediador inflamatorio y uno de los más estudiados debido a su potencial como marcador infeccioso en sepsis neonatal (40). Previos estudios

han demostrado que su concentración plasmática aumenta de forma significativa durante la sepsis (35).

Teniendo en cuenta estos resultados el objetivo de este estudio fue evaluar los niveles plasmáticos de IL-6 en recién nacidos con sospecha de sepsis y analizar su la utilidad de la aproximación diagnóstica en la sepsis neonatal.

En este estudio de 167 neonatos de los cuales 64 presentaban clínica de sepsis y 103 estaban hospitalizados por causas no infecciosas se encontró una proporción similar de neonatos de sexo femenino/masculino con sospecha de sepsis neonatal, hallazgo que concuerda con la literatura en la que se evidencia que ambos grupos son similares(41).

La edad cronológica en días al momento de la inclusión al estudio fue significativamente mayor en el grupo de los casos (3 días) sin diferencias en sexo, edad gestacional, peso al nacer ni en la escala de APGAR, sin embargo, en otros estudios reportan edad cronológica para sospecha de sepsis entre 15 y 30 días(42), por lo cual se debe considerar que nuestros hallazgos pueden ser validos en la sospecha de sepsis neonatal temprana mas no tardía.

Los resultados de leucocitos y niveles de plaquetas fueron evaluados sin encontrar ninguna diferencia estadística entre los grupos, hallazgo que difiere de la literatura que reporta que valores bajos de leucocitos, el conteo absoluto de neutrófilos y valores altos de la relación de neutrófilos inmaduros / totales (I/T) se asocian con sepsis de aparición temprana, aunque se aclara que el recuento total de leucocitos tienen un pobre valor predictivo positivo (VPP) para la sepsis (1). Esto puede ser explicado por la prematurez de los neonatos incluidos en este estudio de los cuales el 53.29% eran prematuros, 30 casos y 59 controles. En la prematuridad, como principal factor de riesgo, se encuentra asociada la inmadurez del sistema inmune, esto incluye: 1) bajos niveles de inmunoglobulina relacionados con la disminución de la transferencia transplacentaria de IgG materna; 2) disminución de la función de los neutrófilos y monocitos que se manifiesta con la alteración de la función de quimiotaxis, opsonización y fagocitosis bacteriana y 3) una función de barrera de la piel y las membranas mucosas disminuida(46).

El hemocultivo se realizó en el 89.06% de los casos y tan solo en el 14.04% se reportó positivo, con lo cual se corrobora lo reportado en estudios previos de una alta tasa de falsos negativos y rangos tan amplios de positividad desde el 8 al 73% (41). El germen aislado más frecuente fue *Staphylococcus epidermidis*. El resto de los gérmenes hallados en proporciones similares fueron: *klebsiella pneumoniae*,

*pseudomona aeruginosa*, *serratia marcescens*, *staphylococcus warneri*, *salmonella spp*, resultados comparables con otros estudios donde el germen aislado más frecuente fue *klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis*(41).

En cuanto a la relación de hemocultivos positivos y la IL 6 no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.128$ ) entre la mediana de los niveles de IL 6 de los neonatos con hemocultivo positivo y negativo.

Cuando la alta morbi-mortalidad causada por la sepsis neonatal es tomada en consideración es deseable que el marcador diagnóstico ideal tenga una buena sensibilidad, para minimizar el uso innecesario de antibióticos en casos de falsos positivos. Adicionalmente un marcador diagnóstico competente debe tener una especificidad razonable y un buen valor predictivo positivo (41).

Los resultados de la IL 6 como prueba diagnóstica en sepsis varían de acuerdo con el tamaño de la muestra, diseño y desenlace. Su punto de corte, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo han sido determinados como: 3.6–32.0 pg/mL, 65–96.2%, 43–89.7%, 67.4–95% and 42–96.1%, respectivamente (40). Los resultados de nuestro estudio muestran más baja sensibilidad (36%) y especificidad (81%); y según esto la IL 6 puede no ser el marcador más fuerte en tamizaje de sepsis neonatal, sin embargo, puede ser usado como prueba confirmatoria dada su especificidad aceptable de 81%.

Con respecto al punto de corte encontramos que el mejor rendimiento operativo de la IL 6 se encuentra en 18.4 pg/ml, concordante con estudios previos que reportan un punto de corte entre 10 y 30 pg/ml. Onal et al. Reportaron un punto de corte de 20 pg/ml en 14 pacientes con sepsis probada y 20 pacientes con clínica de sepsis con 91% de sensibilidad, 74% de especificidad, 78% de valor predictivo positivo y 89% de valor predictivo negativo (41).

Además de la IL 6, otros reactantes de fase aguda evaluados en este estudio fueron la PCR y la procalcitonina, siendo significativamente más altos los valores de PCR en los casos, pero sin significancia estadística en los valores de procalcitonina. Esto puede explicarse por los resultados de recientes estudios los cuales han demostrado que las concentraciones de procalcitonina pueden utilizarse como indicador de sepsis tardía neonatal y sus niveles se relacionan con el tipo de germen. Debido a que la mediana de edad de los neonatos incluidos en este estudio fue 3 días, no se puede extrapolar estos resultados a los encontrados en la literatura de la eficacia de la procalcitonina como marcador de sepsis

neonatal(47). *Celik et al.* Mostraron que el punto de corte ideal de la PCR para el diagnóstico de sepsis era 0.58 mg/dl con una sensibilidad del 71% y especificidad del 97%, sin embargo en este estudio no se midió el rendimiento de la PCR como prueba diagnóstica en sepsis neonatal (40).

Otra posibilidad para mejorar el rendimiento diagnóstico podría ser la combinación de los resultados de IL 6 simultáneamente con los resultados de PCR y procalcitonina, ya que la IL 6 aparece en estados tempranos de la infección y tiene una vida media más corta que la PCR (40). El argumento previo concuerda con lo encontrado por Dollner et al. Quienes mostraron que la IL-6 en combinación con la PCR es un muy buen parámetro diagnóstico en sepsis neonatal comparado con otros reactantes de fase aguda (48). En este caso se debe tener en cuenta el momento de toma de la muestra sanguínea, ya que los niveles de IL6 y los de PCR tienen una cinética diferente en la circulación sanguínea. Estos picos de IL 6 y PCR en diferentes momentos podrían sugerir que medidas seriales podrían ser más exactas para usar los reactantes de fase aguda para el diagnóstico de sepsis neonatal (41). Los resultados aquí mostrados pueden ser debidos a que los niveles de IL 6 y PCR se hicieron en una única toma.

Un estudio reciente mostró que la combinación de IL 6 y TNF- $\alpha$  era un buen marcador diagnóstico de sepsis en neonatos a término sin la necesidad de combinarla con PCR, sin embargo, previos estudios de IL 6 y TNF- $\alpha$  han mostrado valores predictivos variados, aunque en general se ha encontrado la IL 6 ser ligeramente mejor predictor de sepsis que TNF- $\alpha$  (42).

En las limitaciones de este estudio se encuentran el poco tiempo de seguimiento y la falta de toma de laboratorios posteriores a los iniciales y el seguimiento en el tiempo a los pacientes, sin embargo, tomamos ventaja del amplio tamaño de la muestra al compararlo con otros estudios.

Considerando que ningún marcador de por sí solo parece proveer todas las características necesarias para un diagnóstico ideal, nuestra recomendación apunta a una combinación de marcadores inflamatorios como parte del trabajo diagnóstico de la sepsis neonatal. Sin embargo, dicha combinación requiere más evidencia para que sea ampliamente aplicable en la práctica clínica.

## 10. CONCLUSIONES

En este estudio se mostró que los neonatos con sepsis temprana tienen niveles significativamente más altos de IL 6 comparado con aquellos neonatos sin sepsis, sin embargo, debido a la falta de consenso en la definición de sepsis y la heterogeneidad de los hallazgos encontrados hasta ahora en los diferentes estudios, se recomienda prestar atención al momento de interpretar los resultados, adicionalmente el hallazgo de una adecuada especificidad y baja sensibilidad de IL 6 sugiere que su uso sería más adecuado como prueba confirmatoria y no de tamizaje como se reporta en otros estudios. Se sugiere la realización de futuros estudios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simonsen K a., Anderson-Berry AL, Delair SF, Dele Davies H. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):21–47.
2. Santos RP, Tristram D. A Practical Guide to the Diagnosis, Treatment, and Prevention of Neonatal Infections. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2015;62(2):491–508. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031395514002557>
3. Mukhopadhyay S, Puopolo KM. Risk Assessment in Neonatal Early Onset Sepsis. *Semin Perinatol.* 2012;36(6):408–15.
4. Tita A, Andrews W. Diagnosis and Management of Clinical Chorioamnionitis. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):339–54.
5. Zapata Ospina JP. Sepsis: La otra cara de la respuesta inmune. *Iatreia.* 2011;24(2):179–90.
6. László I, Trásy D, Molnár Z, Fazakas J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. *J Immunol Res.* 2015;2015.
7. Infecciosas E, Coronell W, Guerrero C, Bustamante H, Infect P, Bocagrande NH. Sepsis neonatal. *Rev Enfermedades Infecc en Pediatr.* 2009;XXIII:57–68.
8. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The Pathogenesis of Sepsis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):19–48.
9. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):36–44.
10. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):517–28.
11. Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and Treatment of Septic Shock in Neonates. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):439–79.
12. Cuenca A, Wynn J. Role of innate immunity in neonatal infection. *Am J ....* 2013;30(2):105–12.
13. Abraham E. Nuclear Factor- $\kappa$ B and Its Role in Sepsis- Associated Organ Failure.
14. Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age.

Nature Reviews Immunology. 2009.

15. Prusakowski MK, Chen AP. Pediatric Sepsis. *Emerg Med Clin North Am* [Internet]. 2017;35(1):123–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2016.08.008>

16. Gomez HG, Rugeles MT, Jaimes FA. Características inmunológicas claves en la fisiopatología de la sepsis. *Infectio* [Internet]. 2015;19(1):40–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.03.001>

17. Howell G. Management of Sepsis. *Surg Clin North Am*. 2006;86(6):1523–39.

18. Boskabadi H, Zakerihamidi M. Evaluate the diagnosis of neonatal sepsis by measuring ILs: A systematic review. *Pediatr Neonatol* [Internet]. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.10.004>

19. Chauhan N, Tiwari S, Jain U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microbial Pathogenesis*. 2017.

20. Frenkel LM. Challenges in the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus encephalitis. *Pediatrics*. 2005;115(3):795–7.

21. Al-Zahrani AK, Ghonaim MM, Hussein YM, Eed EM, Khalifa AS, Dorgham LS. Evaluation of recent methods versus conventional methods for diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2015;9(4):7–12. Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/5950>

22. Delanghe JR, Speeckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898115000534>

23. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS, Pepys MB, Hirschfield GM, et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circulation* [Internet]. 2014;366(8):857–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982116>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24844702>  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2006.01270.x>  
<http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATION.AHA.105.556530>

24. Meem M, Modak JK, Mortuza R, Morshed M, Islam MS, Saha SK. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *J Glob Health* [Internet]. 2011;1(2):201–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3484777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

25. Abdollahi A, Shoar S, Nayyeri F, Shariat M. Diagnostic value of simultaneous measurement of procalcitonin, interleukin-6 and hs-CRP in prediction of early-onset neonatal sepsis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1).
26. McMahon T, Zijl PCM Van, Gilad AA. *NIH Public Access*. 2015;27(3):320–31.
27. Khaertynov KS, Boichuk S V., Khaiboullina SF, Anokhin VA, Andreeva AA, Lombardi VC, et al. Comparative Assessment of Cytokine Pattern in Early and Late Onset of Neonatal Sepsis. *J Immunol Res*. 2017;2017.
28. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence* [Internet]. 2014;5(1):170–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3916371&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Kipfmueller F, Schneider J, Prusseit J, Dimitriou I, Zur B, Franz AR, et al. Role of Neutrophil CD64 Index as a Screening Marker for Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Infants. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(4):e0124634. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124634>
30. Hotoura E, Giapros V, Kostoula a., Spirou P, Andronikou S. Tracking Changes of Lymphocyte Subsets and Pre-inflammatory Mediators in Full-term Neonates with Suspected or Documented Infection. *Scand J Immunol*. 2011;73(3):250–5.
31. Boskabadi H, Maamouri G, Afshari JT, Mafinejad S, Hosseini G, Mostafavi-Toroghi H, et al. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(12):1232–7.
32. Chiesa C, Pacifico L, Natale F, Hofer N, Osborn JF, Resch B. Fetal and early neonatal interleukin-6 response. *Cytokine* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466615001325>
33. Barug D, Goorden S, Herruer M, Müller M, Brohet R, de Winter P. Reference Values for Interleukin-6 and Interleukin-8 in Cord Blood of Healthy Term Neonates and Their Association with Stress-Related Perinatal Factors. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(12):e114109. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114109>
34. Ye Q, Du LZ, Shao WX, Shang SQ. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. *Pediatr Res*. 2017;
35. Hou T, Huang D, Zeng R, Ye Z, Zhang Y. Accuracy of serum interleukin (IL)-6 in sepsis diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;

36. Zea-Vera A, Ochoa TJ. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr*. 2015;61(1):1–13.
37. Manuscript A, Blood W, Count C. NIH Public Access. 2009;49(18):1841–50.
38. Romero-Maldonado S, Ortega-Cruz M, Galván-Contreras R, Reproducción Humana PY. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx) Riesgo de sepsis neonatal temprana en recién nacidos de madre con corioamnionitis. Estudio de casos y controles. 2013;27.
39. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. Internacional pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(1):2–8.
40. Çelik HT, Portakal O, Yiğit Ş, Haşçelik G, Korkmaz A, Yurdakök M. Efficacy of new leukocyte parameters versus serum C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6 in the diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatr Int*. 2016;
41. Celik IH, Demirel FG, Uras N, Oguz SS, Erdeve O, Biyikli Z, et al. What are the cut-off levels for IL-6 and CRP in neonatal sepsis? *J Clin Lab Anal*. 2010;
42. Hotoura E, Giapros V, Kostoula A, Spyrou P, Andronikou S. Pre-inflammatory mediators and lymphocyte subpopulations in preterm neonates with sepsis. *Inflammation*. 2012;
43. Bozlu G, Tanriverdi H, Aslan G, Kuyucu N. El valor de proteínas de fase aguda y la prueba. 2018;116(1):35–41.
44. Al-Zahrani AK, Ghonaim MM, Hussein YM, Eed EM, Khalifa AS, Dorgham LS. Evaluation of recent methods versus conventional methods for diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *J Infect Dev Ctries*. 2015;
45. Celik IH, Demirel FG, Uras N, Oguz SS, Erdeve O, Biyikli Z, et al. What are the cut-off levels for IL-6 and CRP in neonatal sepsis? *J Clin Lab Anal*. 2010;24(6):407–12.
46. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012;23(4):446–57. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864012703358>
47. Roqués V, Fernández C, Gormaz M, Cabezas MA. PROCALCITONINA COMO MARCADOR DE INFECCIÓN NEONATAL.
48. Abdollahi A, Shoar S, Nayyeri F, Autor C, Abdollahi Keshavarz Blvd A.

Diagnostic Value of Simultaneous Measurement of Proc hs-CRP in Prediction of Early. *Mediterr J Hematol Infect Dis Open J Syst Mediterr J Hematol Infect Dis Cit Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2012;4. Available from: <http://www.mjhid.org/article/view/10112>

# ANEXOS

## Anexo A. Consentimiento informado para participantes de investigación

### “INTERLEUQUINA 6: UTILIDAD EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE SEPSIS NEONATAL”

UNIVERSIDAD SUCOLOMBIANA- FACULTAD DE SALUD  
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO

INVESTIGADORES PRINCIPALES: Carlos Fernando Narváez y Carlos Eduardo Fonseca.

SEDE DONDE SE REALIZA EL ESTUDIO: Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo - Neiva

NOMBRE \_\_\_\_\_ DEL  
PACIENTE: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a permitir la participación de su hijo(a) hospitalizado en la UCI neonatal del “Hospital Universitario Hernando Moncaleano” en el estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea permitir la participación de su hijo(a), entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregara una copia firmada y fechada.

**Objetivo del estudio:** Determinar la utilidad y ventaja de la medición de niveles de IL 6 para un diagnóstico oportuno de sepsis neonatal, frente a los marcadores utilizados generalmente en UCI neonatal.

**Justificación del estudio** Este estudio evaluara una aproximación diagnóstica complementaria temprana para sepsis neonatal, que se espera permita mejoría en diagnóstico oportuno e inicio del tratamiento en neonatos con sospecha de sepsis.

**Procedimientos del estudio** Si usted accede a la participación de su hijo(a) en este estudio, se le pedirá acceso a la historia clínica, en algunos casos responder preguntas, se tomara una muestra de sangre venosa de su hijo(a) de aproximadamente 1 a 2 mililitros, en la cual se realizará el análisis mediante la técnica ELISA (técnica de análisis en laboratorio) para cuantificar los niveles de Interleuquina 6. La muestra será tomada por personal entrenado de enfermería de

la UCIN, haciendo parte del mismo procedimiento para la toma de las otras muestras de laboratorio que se realizan generalmente. Se requiere solo una muestra de sangre para la participación en el estudio. Se hará seguimiento a los reportes de laboratorio procesados en el “Hospital Universitario Hernando Moncaleano” y a los resultados de hemocultivos para establecer el diagnóstico final de sepsis. Derivados de la muestra podrían ser conservados y usados en estudios posteriores.

**RIESGOS:** La participación en este estudio representa riesgo mínimo para la salud e integridad de su hijo(a) y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento que pueden incluir dolor mínimo, infecciones, sangrado y/o hematomas (morados).

**Aclaraciones:** Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con la Dra Laura Ximena Fernández Cruz al teléfono 3016096759 y la Dra Emilce Beltran al teléfono 3007515370

Yo, \_\_\_\_\_ c.c N° \_\_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria por el investigador que me entrevisto. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo tanto deseo participar voluntariamente en el proyecto de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombres y Apellidos del Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante.  
C.C N° \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo

\_\_\_\_\_  
Firma Del Testigo.  
C.C N°

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su responsable) He explicado al Sr.(a) \_\_\_\_\_ el propósito de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implican la participación de su hijo. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella (Resolución 8430 de 1993) una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador Principal  
C.C  
Teléfono:

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador Principal  
C.C  
Teléfono:

Anexo B. Instrumento.

INTERLEUQUINA 6: ¿ES ÚTIL EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE SEPSIS NEONATAL?

UNIVERSIDAD SUCOLOMBIANA- FACULTAD DE SALUD  
HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO

Nombre: \_\_\_\_\_ fecha de ingreso \_\_\_\_\_  
Edad: \_\_\_\_ días HC \_\_\_\_\_ RI \_\_\_\_\_  
Sexo: Femenino \_\_\_\_ masculino \_\_\_\_  
Teléfono \_\_\_\_\_

1- EG: \_\_\_\_  
Peso al nacer \_\_\_\_\_  
Apgar: 1 \_\_\_\_ 5 \_\_\_\_  
Requirió RCCP: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

2- Factores de riesgo  
RIESGOS MATERNOS

Antes del parto:

- CPN: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ - CUANTOS \_\_\_\_\_
- Uso de sustancias psicoactivas: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

Durante el parto:

- DESCONOCE
- Corioamnionitis materna: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

○ Definida por: Fiebre materna, leucocitosis (15.000 glóbulos blancos/ mm<sup>3</sup>), taquicardia materna, sensibilidad uterina, líquido amniótico fétido, taquicardia fetal durante el parto.

- Tiempo de ruptura de la membrana: \_\_\_\_ h
- Líquido amniótico teñido de meconio o fétido: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- Gestación múltiple: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- Múltiples cursos de esteroides prenatales o tocolítico agentes: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

FACTORES DE RIESGO NEONATALES

- Prematurez: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
  - Bajo peso: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
  - Parto asistido, instrumentado o con complicaciones SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
  - Acceso venoso: catéter umbilical arterial o venoso, braquial, CVC:  
SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- Días: \_\_\_\_

- Ruptura de barreras naturales (piel y mucosas): SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- ECN: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- Uso de Bloqueador de los receptores H2 o inhibidores de la bomba de protones, esteroides: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- La ventilación mecánica (CPAP o ETT): SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- Ausencia de alimentación enteral: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

VARIABLES CLINICAS AL MOMENTO DEL EVENTO

- Frecuencia cardiaca: \_\_\_\_ ppm
- frecuencia respiratoria: \_\_\_\_ rpm
- Cambios mentales: : SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_
- Intolerancia a la via oral: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

-

VARIABLES INFLAMATORIAS AL MOMENTO DEL EVENTO

- Leucocitos:
- Nt recuento total y %:
- Lt recuento total y %:
- Plaquetas:
- PCT:
- PCR:
- IL6:

-

HEMOCULTIVOS: (reporte)

1. \_\_\_\_\_
2. - \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_

Antibioticoterapia:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

Duración (días):

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
FIRMA RESPONSABLE

FECHA -----