



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

*“EVALUACIÓN DEL VOLUMEN MEDIO NEUTROFÍLICO COMO
MARCADOR DE SEPSIS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL INP”*

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

P R E S E N T A:

QBP. LUIS ANGEL SOLTERO TERÁN

ASESOR:

EBC. LINA TERESA ROMERO GUZMÁN



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: EBC. Lina T. Romero Guzmán (INP)

Vocal: M. en C. Julio Lara Riegos (FQ)

Secretario: M. en C. Isela Montufar Robles (Hospital Juárez) (FQ)

Primer Suplente: M. en C. Julio César Martínez Álvarez (CMN SXXI)

Segundo Suplente: M. en C. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre (FQ)

Instituto Nacional de Pediatría

Departamento de Análisis Clínicos y Estudios Especiales

Laboratorio de Hemato-Oncología.

Asesor del Tema:

EBC. Lina Teresa Romero Guzmán.

Sustentante:

QBP. Luis Angel Soltero Terán.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes participaron de diversas formas en la realización de este proyecto, primero y más importante, brindo mi homenaje y gratitud a la *EBC. Lina Romero, EHP. Fabiola Mujica, QFB. Verónica Romero y M. en C. Froylan Mendoza* por darme la oportunidad de trabajar con ellos y haber cumplido con el objetivo primordial de este trabajo, así como también al personal químico y técnico del Laboratorio de Hemato-Oncología del INP.

A mí jurado por su dedicación y tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme continuar con mi crecimiento académico.

DEDICATORIAS

A mis padres (*Estela y Raymundo*) y abuela (*Lita*) por darme las herramientas necesarias para enfrentarme a la vida y el apoyo incondicional que me han ofrecido para lograr mis metas profesionales.

Gracias por su amor y apoyo.

A mis amigos (*Angel, Cande y Ana*) y compañeros de la especialidad (*Antonio e Isidro*); quienes siempre me han brindado su apoyo y dado consejos ante situaciones que existen en la vida, favoreciendo así con mi crecimiento profesional.

ÍNDICE:

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Sepsis	2
2.2 Manifestaciones clínicas	4
2.3 Etiología	5
2.4 Epidemiología	5
2.5 Fisiopatología	6
2.6 Neutrófilos	10
2.6.1 Función	11
2.6.2 Cambios morfológicos	11
2.7 Pruebas diagnósticas de sepsis	13
2.7.1 Hemocultivo	14
2.7.2 Citometría hemática	15
2.7.3 Frotis de sangre periférica	15
2.7.4 Proteína C reactiva	16
2.7.5 Procalcitonina	17
2.7.6 Citometría de flujo	18
2.8 Tratamiento	21

2.9	Tecnología Volumen-Conductividad-Dispersión (VCS)	22
2.10	Volumen Medio Neutrofílico	23
III.	JUSTIFICACIÓN	25
IV.	HIPÓTESIS	26
V.	OBJETIVOS	27
5.1	Objetivo general	27
5.2	Objetivos particulares	27
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1	Muestras biológicas	28
5.2	Equipos	28
5.3	Muestra de estudio	28
5.4	Criterios de inclusión	29
5.5	Criterios de exclusión	29
VII.	RESULTADOS	30
VIII.	DISCUSIÓN	38
IX.	CONCLUSIÓN	40
X.	ANEXOS	41
XI.	BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Glosario de términos de procesos relacionados con sepsis	4
Tabla 2: Preparación de muestra para análisis de CD64	33

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Transcripción de citocinas y mediadores en sepsis	7
2	Afección de la coagulación	8
3	Falla orgánica	9
4	Cambios morfológicos de los neutrófilos	13
5	Distribución por género	30
6	Relación VMN y edad	31
7	Relación VMN y género	31
8	Relación VMN y servicio hospitalario	32
9	Distribución normal del VMN	33
10	Histogramas de identificación de poblaciones celulares, caso control	34
11	Histograma de fluorescencia y estadística, caso control	35
12	Histogramas de identificación de poblaciones celulares, caso séptico	36
13	Histograma de fluorescencia y estadística, caso séptico	37
14	Mezcla de fluorescencia negativa con positiva	37

ABREVIATURAS:

EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
IL	Interleucina
INP	Instituto Nacional de Pediatría
MODS	Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple
NF kB	Factor Nuclear kB
OMS	Organización Mundial de la Salud
pCr	proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
RIS	Respuesta Inflamatoria Sistémica
SRIS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
VCS	Volumen Conductividad Dispersión
VMN	Volumen Medio Neutrófilico

I. RESUMEN

El término sepsis es el concepto que se utiliza como sinónimo de septicemia, que es la afección generalizada que se produce por la presencia de microorganismos patógenos o de sus toxinas en la sangre, esto produce una respuesta sistémica del organismo huésped ante la infección, con finalidad eminentemente defensiva. Se ha demostrado que en periodos de infección tales como la sepsis hay incremento y cambio morfológico de los neutrófilos, siendo el Volumen Medio Neutrófilico (VMN) un parámetro capaz de detectar la variabilidad de estos, es importante hacer uso de él como un indicador diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad y confiabilidad del VMN como prueba de escrutinio para la detección de sepsis. Esta evaluación se realizó en dos fases, en la primera se analizaron 282 muestras de pacientes control para obtener el intervalo de referencia del VMN (132 – 162 fL), así como identificar la relación de este parámetro con la edad, el género y el servicio hospitalario. La segunda fase del estudio consistió en correlacionar el VMN con el frotis de sangre periférica y la expresión de CD64 en neutrófilos por citometría de flujo, para lo cual se diseñó un protocolo estratégico que determinara la expresión de CD64, y así analizar un caso clínico control y uno séptico.

Con base en los resultados obtenidos se sugiere que el VMN es un parámetro confiable para ser utilizado como herramienta de uso diagnóstico en el laboratorio clínico.

II. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta el Servicio de Pediatría es la sepsis, cuya fisiopatología es compleja y rápidamente progresiva que puede conducir a la muerte. En épocas anteriores existió gran confusión terminológica sobre los conceptos de infección bacteriana, sepsis, septicemia, síndrome séptico y estado de choque séptico. La falta de una definición precisa para estos términos creó gran dificultad para valorar la gravedad de los procesos infecciosos y poder diferenciar las etapas clínicas producidas por estos.¹

2.1 Sepsis

En agosto de 1991 los miembros del *American Collage of Chest Physicians* (ACCP) celebraron, en Estados Unidos, una conferencia de consenso donde delinearon los objetivos y acuerdos para una conceptualización uniforme que pudiera ser aplicada a la sepsis y sus trastornos relacionados. En el marco de dicha conferencia, se resumió en diferentes etapas evolutivas y con criterios clínicos simples, la relación sepsis-choque séptico, la que quedó estratificada en los siguientes estadios: 1) Infección; 2) Liberación de endotoxinas y productos microbianos; 3) Liberación de mediadores de la inflamación; 4) Sepsis; 5) Síndrome séptico con disfunción multiorgánica o sin esta; 6) Choque séptico con disfunción multiorgánica o sin esta; 7) Recuperación o muerte como estado final. Todos ellos constituyen distintas fases en el curso de un mismo proceso y en este contexto se debe valorar, tanto desde el punto de vista fisiopatológico y diagnóstico, como desde las acciones terapéuticas que cabe proponer ante una situación determinada.^{2,3}

De acuerdo con lo anterior, la sepsis y el estado de choque séptico se incluyen entre las condiciones fatales más frecuentemente encontradas en los hospitales pediátricos del mundo. Casi una tercera parte de los niños atendidos en las unidades de terapia intensiva son admitidos con el diagnóstico de sepsis y de 20 a 40 % de estos presentan choque séptico. A pesar de los avances tecnológicos logrados en el cuidado especializado de estos pacientes y del advenimiento de una gran cantidad de fármacos antimicrobianos potentes, la letalidad atribuida a estas infecciones sistémicas severas no ha sido reducida de forma sustancial, oscilan entre 20 y 60 % de los niños afectados.^{4,5}

La sepsis representa un conjunto de manifestaciones sistémicas causadas por la respuesta inmune que presenta el huésped a la infección, la cual está destinada en un principio, a favorecer su defensa. El reconocimiento del diagnóstico de esta entidad clínica en el niño ha transitado por un largo camino que comenzó hace más de dos décadas en relación con una terminología unificada para designar los procesos relacionados con el síndrome séptico (Tabla 1).⁶

Tabla 1: Glosario de términos de procesos relacionados con sepsis.⁶

TÉRMINO	DEFINICIÓN
Infeción	Respuesta del huésped a la presencia de patógenos.
Bacteriemia	Presencia de bacterias viables en la sangre.
SRIS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistemática (SRIS) de origen multifactorial. Presenta dos o más de los hallazgos siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fiebre o hipotermia. ➤ Taquicardia. ➤ Taquipnea. ➤ Leucocitosis. ➤ Leucopenia. ➤ Neutrofilia o bandemia.
Sepsis	SRIS debido a una infección.
Sepsis severa	Sepsis con hipovolemia, acidosis láctica, oliguria, hipoxemia, pulsos distales débiles, pobre llenado capilar, frialdad distal, alteración neurológica aguda e hipotensión arterial.
Choque séptico	Sepsis severa que no responde rápidamente a la reposición de volumen y requiere del uso de drogas vasoactivas o inotrópicas.
MODS	Síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS). Es un fallo progresivo de tres o más sistemas orgánicos básicos.

2.2 Manifestaciones clínicas

El diagnóstico temprano y oportuno de sepsis neonatal no es fácil porque las manifestaciones clínicas son inespecíficas y pueden avanzar rápidamente a estadios más avanzados. Los signos de alarma identificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) son: convulsiones, anorexia, dificultad respiratoria, hipoactividad y polipnea.⁷ Algunos otros son: distermias, ictericia, apneas (con más frecuencia en prematuros), distensión abdominal, hepatomegalia, letargia, sangrados, palidez, oliguria, cianosis, piel marmórea, crisis convulsivas, irritabilidad, esplenomegalia, vómito, diarrea, hipotensión arterial, petequias o equimosis, trombocitopenia y acidosis.^{8,9}

2.3 Etiología

La sepsis puede ser causada por diferentes agentes infecciosos. Entre los más frecuentes predominan las bacterias; gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella sp.*, de los microorganismos gram positivos, el estreptococo del grupo B (principalmente en Estados Unidos y Europa), *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativo y *Listeria monocytogenes* seguidas por los virus (*adenovirus* y *citomegalovirus*), parásitos (*Toxoplasma gondii*) y, con menor frecuencias, los hongos (*Candida sp.*), entre otros, de acuerdo con las características del huésped, la edad y el lugar de la adquisición de la infección.¹⁰⁻¹²

2.4 Epidemiología

La sepsis, a escala mundial, es la principal causa de muerte en niños y consumidora de sustanciales recursos de salud, anualmente se notifica que 1,6 millones de neonatos mueren por infección y 60 % de este total corresponden a enfermedades notificables en países en desarrollo. El panorama mundial en relación con la sepsis no es homogéneo, en los países desarrollados como Estados Unidos, las vacunas redujeron 99 % de las muertes a causa de las enfermedades que previene; mientras que la problemática de los países en desarrollo es otra, lo cual está en relación con la no aplicación de intervenciones relativamente simples que han demostrado ser efectivas en la disminución de la sepsis.¹³

Parafraseando lo señalado por la OMS, la mayoría de las muertes de menores de 5 años sigue siendo provocada por una pequeña cantidad de afecciones, entre ellas:

neumonía, enfermedad diarreica aguda, malaria y sarampión; asimismo, 80% de las defunciones por esas causas podría atribuirse a sepsis. El problema adquiere suma importancia cuando se considera que un gran número de esos niños vive en diferentes partes del planeta, sobre todo en países subdesarrollados, donde la disponibilidad de recursos para proporcionarles un tratamiento eficaz es muy limitada.¹⁴ La mortalidad incrementa de 5% en SRIS al 55% en choque séptico. Cada hora que el niño permanece en choque aumenta en doble la mortalidad.¹⁵

En México no se conoce su incidencia, prevalencia ni impacto clínico, por lo que es subestimada por las autoridades sanitarias, lo que refleja una falta de políticas sanitarias, guías de diagnóstico y manejo, así como la asignación de recursos para el tratamiento e investigación.¹⁶

Como puede apreciarse, el proceso séptico constituye un verdadero problema de salud a escala mundial y a él contribuyen diferentes factores, entre los más importantes se encuentran: la poca accesibilidad a los servicios de asistencia médica, el aumento de la supervivencia de los pacientes debilitados crónicos e inmunodeprimidos, la mayor resistencia de los microorganismos patógenos a los agentes antimicrobianos empleados, el uso de procedimientos de diagnóstico y tratamientos más agresivos y la poca voluntad política de algunos gobiernos para mejorar las condiciones que perpetúan este fenómeno.¹⁷

2.5 Fisiopatología

La fisiopatología de la sepsis puede ser iniciada por el componente de la membrana externa de microorganismos gramnegativos (lipopolisacárido, lípido A, endotoxina) o

los microorganismos grampositivos (ácido lipoteicoico, peptidoglicano), así como componentes de virus, parásitos y hongos. La señalización por estos mediadores se produce a través de una familia de receptores transmembrana conocidos como receptores tipo Toll. Dentro del monocito, se activa el factor nuclear kB (NF-kB), que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias; el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1). El TNF- α y la IL-1 conducen a la producción de mediadores tóxicos, incluyendo las prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas, y la fosfolipasa A2. Estos mediadores dañan el revestimiento endotelial, lo que conduce a un aumento de la fuga capilar. Además, estas citocinas conducen a la producción de moléculas de adhesión en las células endoteliales y neutrófilos. La interacción endotelial con los neutrófilos conduce a una mayor lesión endotelial a través de la liberación de óxido nítrico, un potente vasodilatador que conduce a un choque séptico (Figura 1).¹⁸

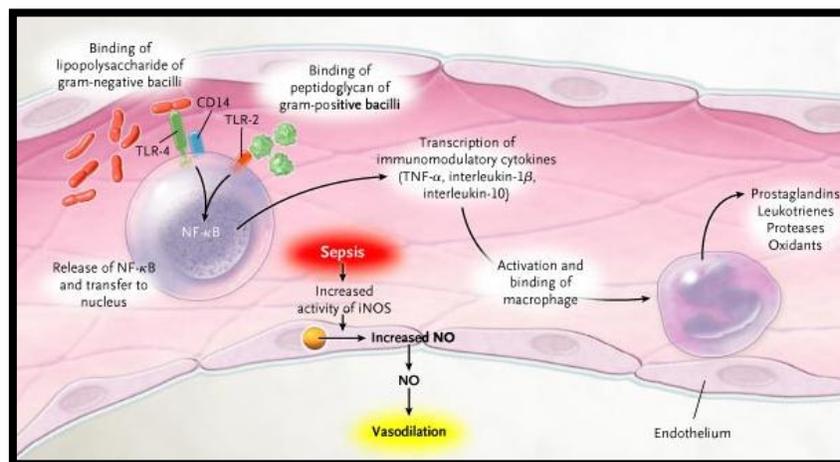


Figura 1. Transcripción de citocinas y mediadores en sepsis.¹⁸

Por otro lado el TNF- α y la IL-1 también tienen efectos directos sobre las vías de coagulación, viéndose activado el factor tisular, primer paso en la vía extrínseca de

dicho proceso, que se expresa sobre las superficies del endotelio y de los monocitos. Al estar activado el factor tisular conduce a la producción de trombina, formando coágulos de fibrina en la microvasculatura. La fibrinólisis, proceso por el cual se regula la actividad coagulante, también se ve afectada ya que el TNF- α y la IL-1 conducen a la producción de inhibidor-1 del activador de plasminógeno, un potente inhibidor de la fibrinólisis (Figura 2).¹⁹ Las citocinas proinflamatorias también perturban moduladores de origen natural del cuerpo de la coagulación y la inflamación, la proteína C activada y antitrombina. La proteína C circula como un zimógeno inactivo que en presencia de trombina y trombomodulina, proteína unida a la superficie endotelial, se convierte a la proteína C activada.²⁰ La proteína C activada y su cofactor proteína S desactiva la producción de trombina mediante la escisión de los factores Va y VIIIa. La antitrombina es el segundo regulador endotelial de origen natural afectado durante la sepsis. La antitrombina inhibe la producción de trombina en múltiples pasos en la fase fluida de la hemostasia, así como mediante la unión y la inhibición de la trombina directamente.²¹

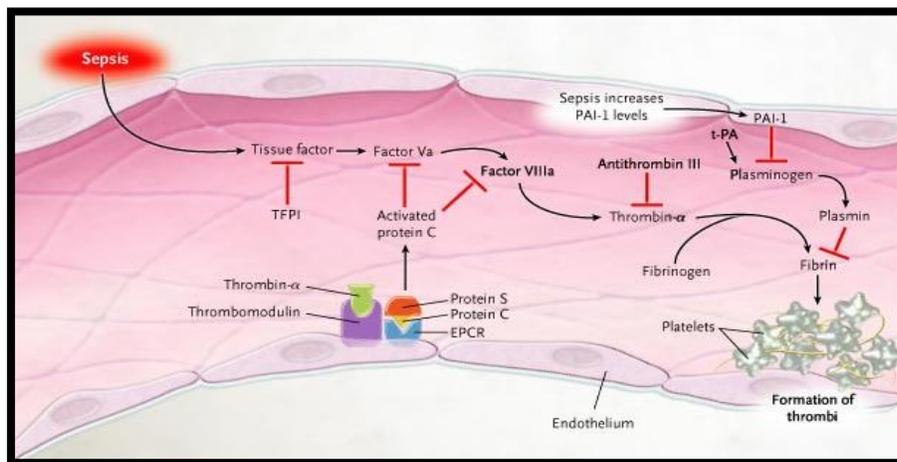


Figura 2. Afección de la coagulación.¹⁹

Como resultado del ciclo de inflamación y coagulación se crea la diseminación de estos coágulos formados sin regulación que al llegar a vasos de calibre pequeño provocan taponamiento dando lugar a hipoxia del tejido y con ello infarto. Los órganos principalmente afectados son los pulmones, el hígado y los riñones. El fallo múltiple de estos órganos se produce y a menudo conducen a la muerte (Figura 3).²²

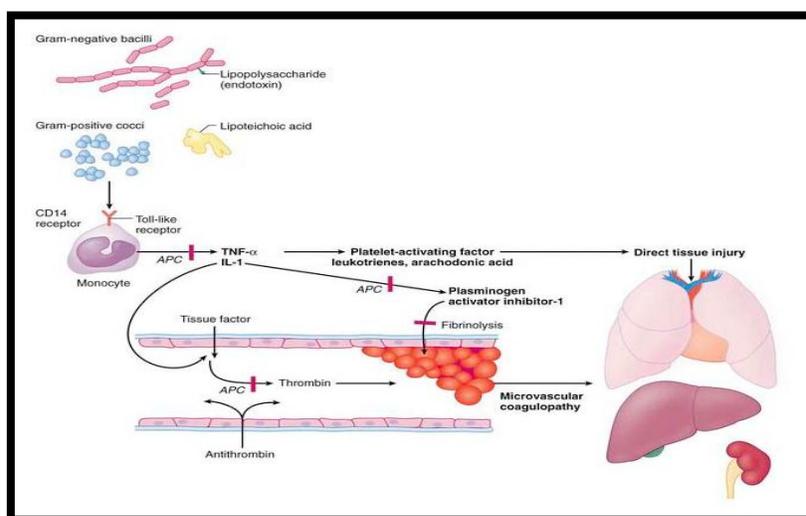


Figura 3. Falla orgánica.²²

Asimismo, las citocinas proinflamatorias son detectadas en el plasma en las primeras 24 horas de su emisión. Desde el punto de vista clínico, existe un período silente que dura de 4 a 6 horas a partir del cual comienzan los síntomas y signos sutiles de la respuesta inflamatoria sistémica (RIS): cambios en la frecuencia cardíaca y respiratoria, aparente estado gripal y alteración de la temperatura.^{23, 24}

A pesar del uso de antibióticos cada vez más potentes y efectivos y de la introducción de amplios avances tecnológicos que sostienen el estado hemodinámico y las funciones orgánicas, la tasa de mortalidad por sepsis no ha cambiado

significativamente en los últimos 30 años. Ello significa que aún utilizando las mejores terapéuticas disponibles, muchos pacientes con sepsis morirán y solo el diagnóstico y tratamiento oportuno podrán asegurar una mayor supervivencia, estos últimos constituyen los pilares esenciales de una nueva estrategia. Comenzar las acciones terapéuticas más enérgicas en etapas iniciales del fenómeno, con vistas a evitar o minimizar las lesiones orgánicas.^{25, 26}

La clave del éxito para la identificación temprana de la sepsis radica en la búsqueda exhaustiva de los signos de RIS. Según el análisis efectuado sobre la fisiopatología e independientemente de la existencia de patrones fulminantes y de progresión muy diferentes de un paciente a otro, la posibilidad de que un individuo pase de un estado de total normalidad a la gravedad extrema es realmente excepcional.²⁷

2.6 Neutrófilos

El neutrófilo se origina a partir de la célula progenitora pluripotencial la cual se diferencia en unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritroides, monocitos y megacariocitos (UFC-GEMM), bajo estimulación específica de factores de crecimiento y ciertas interleucinas (IL-3, IL-6). Después dicha célula es estimulada para diferenciarse hacia la unidad formadora de colonias de granulocitos y monocitos (UFC-GM) por los factores de crecimiento FEC-GM e IL-3, para promover de manera selectiva la proliferación, diferenciación y maduración de los neutrófilos. El neutrófilo pasa por seis etapas morfológicamente identificables en el proceso de maduración: 1) mieloblasto, 2) promielocito, 3) mielocito, 4) metamielocito, 5) banda y 6) segmentado o neutrófilo polimorfonuclear (PMN). Los neutrófilos constituyen la

mayor parte de los leucocitos circulantes, su número absoluto varía entre 2.0 y $7.0 \times 10^9/L$. Con frecuencia, las alteraciones de la concentración en la sangre periférica son el signo de una patología de fondo. La disminución de neutrófilos denota neutropenia y el paciente se encuentra en alto riesgo de desarrollar una infección si no se aísla del ambiente normal, en cambio si la concentración de neutrófilos se encuentra elevada indica neutrofilia, con mayor frecuencia este padecimiento es el resultado de la respuesta reactiva del cuerpo a la infección bacteriana, intoxicación metabólica, intoxicación por fármacos o necrosis tisular.²⁸

2.6.1 Función

Los neutrófilos abandonan los vasos y migran a áreas de lesión o infección tisular, lo que se realiza gracias a la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales de la pared del vaso sanguíneo y a la migración subsecuente al interior del tejido; una vez en éste el neutrófilo fagocita y elimina los microorganismos invasores.²⁸

2.6.2 Cambios morfológicos

Las anormalidades morfológicas de los neutrófilos pueden ser identificadas mediante la observación de las células en frotis teñidos de sangre, las anormalidades citoplasmáticas son más comunes que las nucleares. La mayor parte de estos cambios citoplasmáticos (cuerpos de Döhle, granulación tóxica y vacuolas) son cambios transitorios relativos que acompañan a estados infecciosos (Figura 4).²⁸

2.6.2.1 Cuerpos de Döhle

Los cuerpos de Döhle se desarrollan en el citoplasma de los granulocitos de pacientes con infecciones o cuadros de estrés, son esféricos u ovalados, tienen alrededor de 1-5 μ de diámetro y están compuestos de cadenas paralelas de ARN ribosómico. Su color varía de gris a celeste con la tinción. Aparecen inmediatamente después del estrés lo que sugiere que afectan los depósitos celulares. Si bien se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual se producen, se asocian con una gran variedad de lesiones químicas y físicas como quemaduras, infecciones, cirugía y embarazo.²⁹

2.6.2.2 Gránulos tóxicos

La granulación tóxica es la presencia adquirida de gránulos primarios anormalmente grandes o dominantes y es una respuesta al estrés causado por un cuadro infeccioso o inflamatorio. La estimulación celular, sobre todo en las células más jóvenes puede provocar alteraciones en la membrana, que a su vez es la responsable de que los gránulos se observen más grandes y más oscuros con los procedimientos de tinción habituales. La granulación tóxica tiene importancia clínica porque refleja un pronóstico ominoso. Un cuadro importante en el que la granulación tóxica no implica muy mal pronóstico es el que se observa en los casos típicos en pacientes medicados con FE-CGM. En este caso se cree que el exceso de estimulación acentúa los cambios del desarrollo y que acorta el tiempo de transición de la médula, lo que provoca la aparición de células más jóvenes y tóxicas con la tinción pero que aun así presentan una función normal.³⁰

2.6.2.3 Vacuolas citoplásmicas

Las vacuolas citoplásmicas se presentan como áreas claras no teñidas en el citoplasma. Estas pueden representar la etapa terminal de la digestión del material fagocitado o grasa u otras sustancias almacenadas. Aunque no son específicas, las vacuolas citoplásmicas en los neutrófilos son un parámetro sumamente sensible de presencia de septicemia, suelen verse en los mismos trastornos que la granulación tóxica y los cuerpos de Döhle.²⁸

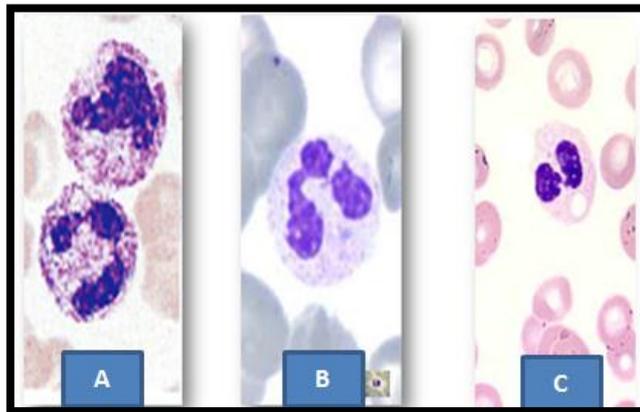


Figura 4: Cambios morfológicos de los neutrófilos.²⁸

A) Granulación tóxica, B) Cuerpos de Döhle y C) Vacuolas citoplásmicas.

2.7 Pruebas diagnósticas de sepsis

En la práctica clínica los estudios más utilizados para el diagnóstico de sepsis son: el hemocultivo, la citometría hemática, la identificación morfológica de células en frotis de sangre periférica, la determinación de los niveles de la proteína C reactiva (pCr), niveles de procalcitonina (PCT) y la expresión de CD64 en leucocitos de sangre periférica por citometría de flujo.³¹

2.7.1 Hemocultivo

El hemocultivo constituye uno de los procedimientos más importantes que se realizan en el laboratorio de microbiología clínica. El factor más importante que determina el éxito de un hemocultivo es el volumen de sangre procesada. Por ejemplo, se produce un incremento del 40% en la tasa de cultivos positivos para microorganismos cuando se cultivan 20 mL de sangre en lugar de 10 mL debido a que más de la mitad de los pacientes septicémicos portan menos de un microorganismo por mililitro de sangre. Por eso se debe recolectar aproximadamente 20 mL de sangre para cada hemocultivo en un adulto, y volúmenes proporcionalmente menores en los niños y en los neonatos. La desinfección cuidadosa de la piel es un aspecto de gran importancia, ya que muchos pacientes hospitalizados son susceptibles a infecciones con microorganismos que colonizan su piel. Los signos clínicos de septicemia (p. ej., fiebre, escalofríos e hipotensión) aparecen como respuesta a la liberación de toxinas por parte de los microorganismos, estos signos se manifiestan hasta una hora después de que los microorganismos hayan pasado a sangre. Por tanto, es posible que existan pocos o ningún microorganismo en sangre cuando el paciente se torna febril. En consecuencia, se recomienda recoger dos o tres muestras de sangre de forma aleatoria durante un período de 24 horas. La mayor parte de las muestras de sangre se inoculan en frascos rellenos de caldos de cultivo enriquecidos, estos se incuban a 37°C y se inspeccionan a intervalos regulares para observar el crecimiento bacteriano. Cuando se detecta crecimiento, los caldos son subcultivados con el propósito de aislar el microorganismo para su identificación y las pruebas de

sensibilidad a antimicrobianos. La mayor parte de los aislamientos con significación clínica se detectan en los 2 primeros días de incubación; sin embargo, todos los cultivos se deben incubar a lo largo de un período mínimo comprendido entre 5 y 7 días. Debido a la pequeña cantidad de microorganismos que están presentes en la sangre de un paciente séptico, no merece la pena teñir las extensiones con tinción de Gram para su observación al microscopio.³²

2.7.2 Citometría hemática

El término citometría hemática se usa para referirse a la medición de las células de la sangre (*bitos* = célula, *metros* = medida, *haema*, *haematos* = sangre). Dicho estudio informa sobre el número y las características de las células de la sangre, los datos se dividen en tres grandes grupos: datos de la serie roja, de la serie blanca y de la serie trombocítica. Los principales hallazgos en periodos de infección como la sepsis es un incremento de la cuenta total de los leucocitos (leucocitosis), así como una cifra elevada de neutrófilos (>70%).³³

2.7.3 Frotis de sangre periférica

Un extendido de sangre sirve para evaluar la morfología de las tres líneas celulares en busca de anomalías. La técnica recomendada para realizar el extendido requiere de dos portaobjetos, en uno de ellos se colocara una gota de sangre de alrededor de 2 milímetros de diámetro, el segundo portaobjeto se sostiene con firmeza con la mano dominante a un ángulo de 30° a 45° y se lleva hacia atrás hasta tocar la gota de sangre, dejando que esta se esparza en todo el ancho del portaobjeto, entonces se empuja con rapidez y suavidad hacia adelante hasta el final del portaobjeto y se

crea un extendido. Para teñir los extendidos de sangre periférica se usa la tinción pura de Wright o Wright-Giemsa. Estas coloraciones se consideran policromáticas porque contienen eosina y azul de metileno, el metanol presente en las coloraciones fija las células al portaobjeto. El teñido real de las células o de los componentes no tiene lugar hasta que se agrega el buffer. El azul de metileno oxidado y la eosina forman un complejo tiazina-eosinato que tiñe los componentes neutros. El buffer que se agrega a la tinción debe ser fosfato de sodio 0.05 M (pH 6.4) o agua destilada (pH 6.4 – 6.8). El azul de metileno libre es básico y tiñe los componentes celulares ácidos (o basófilos), como el ARN, la eosina libre es ácida y tiñe los componentes básicos (o eosinófilos), como la hemoglobina o los gránulos eosinófilos. Los neutrófilos se denominan así porque tienen gránulos citoplasmáticos con pH neutro y toman algunas características de tinción de ambas coloraciones. El examen del extendido se evalúa por microscopia de inmersión en aceite 100x, con este aumento los neutrófilos segmentados pueden diferenciarse con facilidad de las formas en banda o cayado, así como los cambios morfológicos que pueden sufrir estas células como: granulaciones tóxicas, cuerpos de Döhle y vacuolas citoplásmicas, siendo los principales hallazgos durante procesos infecciosos como la sepsis.³⁴

2.7.4 Proteína C reactiva

La proteína C reactiva es un reactante de fase aguda, proteína perteneciente a la familia de las pentraxinas, sintetizada por el hígado bajo la regulación de citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y TNF- α en respuesta a un proceso inflamatorio. Tiene una vida media de 19 horas y su valor asciende precozmente

dentro de las primeras 24 horas en el proceso inflamatorio que acompaña a la sepsis a niveles máximos y se mantiene aumentada por varios días aún después de finalizado el proceso infeccioso.³⁵

2.7.5 Procalcitonina

La procalcitonina es la pro-hormona de la calcitonina; sin embargo, la PCT y la calcitonina son proteínas diferentes. La calcitonina es producida exclusivamente por las células C de la tiroides después de un proceso específico de proteólisis intracelular de la pro-hormona PCT como respuesta a los estímulos hormonales normales, mientras que la PCT puede ser producida además por células de diferentes tipos y por diversos órganos como respuesta a los estímulos pro-inflamatorios, particularmente por productos bacterianos. Sin embargo, en infecciones bacterianas severas y sepsis, la PCT está constituida de 116 aminoácidos precursora de la calcitonina (hormona peptídica de 32 aminoácidos). *In vivo* es muy estable con un tiempo de vida media cerca de 24 horas. Las concentraciones en personas sanas debe ser menor de 0,05 ng/mL y estas pueden aumentar hasta 1000 ng/mL en pacientes con fiebre séptica. Generalmente se interpretan las concentraciones mayores de 0,5 ng/mL como valores anormales que sugieren un síndrome séptico. Los valores entre 0,5 y 2 ng/mL constituyen una zona “gris” e incierta en lo que se refiere al diagnóstico de la fiebre de origen bacteriano. En estos casos se recomienda repetir la medición entre las 6 y 24 horas siguientes hasta identificar un diagnóstico específico. Los niveles por arriba de 2 ng/mL constituyen una alta probabilidad de un proceso infeccioso con consecuencias

sistémicas, las concentraciones sobre 10 ng/mL se encuentran casi exclusivamente en pacientes afectados de fiebre de origen bacteriano grave o de choque séptico. En pacientes que presentan SIRS no bacteriana, se ha comprobado que los niveles de PCT se encuentran generalmente en la franja de valores bajos (<1 ng/mL). No obstante, después de un trauma múltiple o de una intervención quirúrgica mayor o bien si se trata de quemaduras graves o de recién nacidos los niveles pueden aumentar independientemente de un proceso infeccioso. Generalmente, el retorno a los niveles normales es rápido y un segundo aumento puede interpretarse en estos casos como el desarrollo del episodio de fiebre séptica. Las infecciones virales, la colonización bacteriana, las infecciones localizadas, los trastornos alérgicos, las afecciones de autoinmunidad y el rechazo de trasplantes normalmente no inducen una respuesta significativa de PCT (<0,5 ng/mL).³⁶

2.7.6 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método automatizado multiparamétrico y cuantitativo que analiza las señales dispersadas y fluorescentes producidas por una célula al pasar por un haz de luz, estas medidas son realizadas mientras las células pasan en fila por una celda de flujo a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo. La citometría permite obtener información sobre la fisiología, morfología, genética y diversidad de microorganismos, animales y plantas. La citometría es una tecnología de rápido crecimiento y desarrollo que permite examinar muchas propiedades de un gran número de células en poco tiempo. Algunos autores, definen a la citometría de flujo como una tecnología analítica que permite la medición simultánea de varias

características de muestras biológicas. El principio se basa en que las células suspendidas en un líquido pasan individualmente al frente de una fuente de luz intensa (generalmente un láser) y los datos de la luz reflejada y de la fluorescencia son recogidos y organizados en un archivo. Los análisis posteriores de las poblaciones y subpoblaciones se producen mediante el uso de programas de cómputo especializados lo cual permite obtener información valiosa para el investigador o el clínico.

Este proceso físico-químico que ocurre con la muestra se logra por intermedio de los tres componentes principales de un citómetro de flujo:

- Sistema hidráulico: Controles neumático y fluidos para establecer un flujo laminar que permita a la suspensión celular atravesar la cámara de flujo.
- Sistema óptico: Una fuente de excitación y un sistema de colección para generar y recoger las señales luminosas. El sistema de excitación consiste en un láser de argón con luz monocromática de 488nm, lentes y prismas para dirigir un rayo. El sistema de colección consiste en espejos ópticos y filtros para encaminar determinadas longitudes de onda hacia detectores ópticos determinados.
- Sistema electrónico: Convierte la luz dispersa en señales eléctricas y las procesa para su análisis.

En términos técnicos la citometría de flujo indica tres cosas fundamentales sobre una muestra en un experimento: 1) el tamaño relativo de las partículas o células a lo cual se le denomina Forward Scatter (FS), esto no es más que la luz que la partícula o

célula no deja transmitir de forma frontal y está relacionado con su tamaño, el instrumento transforma la señal que es recolectada en el detector FS. 2) la complejidad relativa interna o granularidad es la luz dispersada a un ángulo de 90° de la luz incidente del láser a Side Scatter (SS). Este parámetro está asociado con la rugosidad de la superficie celular y la cantidad de organelos dentro de la célula, a mayor cantidad de organelos o elementos en el interior de la célula mayor será la complejidad registrada en el detector SS. 3) la intensidad de la fluorescencia de manera relativa (cuando la muestra ha sido teñida con anticuerpos marcados con fluorocromos o con algún tipo de molécula fluorescente) indicando marcadores en la célula contra los cuales los anticuerpos usados o los fluorocromos han sido dirigidos. La fluorescencia ocurre cuando los fotones de una luz incidente chocan contra una molécula (un fluorocromo) permitiendo que los electrones de los dobles enlaces pasen a un nivel energético más alto (excitado). El retorno de la molécula a un estado de energía más bajo está acompañado por la emisión luz (la fluorescencia) y a la pérdida de energía. Los métodos de tinción con fluorescencia generalmente son rápidos y facilitan la visualización de las células en mezclas complejas de acuerdo a sus características bioquímicas, fisiológicas o propiedades taxonómicas. También representa componentes específicos de las células como organelos, enzimas o marcadores de superficie.³⁷

Recientemente, se ha prestado atención a los antígenos de superficie de la célula leucocitaria como marcadores diagnósticos de la sepsis. El antígeno CD64 de la superficie de neutrófilos, es regulado cuantitativamente al alza durante la infección y la sepsis bajo la influencia de las citocinas inflamatorias. Este aumento de la

densidad de superficie se produce de una manera escalonada en función de la intensidad del estímulo de las citocinas y de si la expresión de CD64 es estable durante más de 24 horas. Los progresos tecnológicos en citometría de flujo han hecho posible cuantificar rápidamente con precisión el antígeno CD64 expresado en los neutrófilos.³⁸

2.8 Tratamiento

El manejo empírico inicial de antibióticos debe hacerse con base en la experiencia de cada hospital, siempre teniendo en cuenta el patrón de resistencia y sensibilidad. En sepsis neonatal temprana el tratamiento debe iniciarse con ampicilina y un aminoglucósido (gentamicina ó amikacina), en ocasiones especiales se puede sustituir el aminoglucósido por cefotaxima. En recién nacidos con sepsis tardía adquirida en la comunidad es posible utilizar el mismo esquema; sin embargo, en sepsis nosocomial el tratamiento debe estar orientado a combatir los microorganismos presentes en cada institución. Se debe evitar el uso empírico de antimicrobianos de amplio espectro; sin embargo, en situaciones especiales, se requiere el empleo de cefalosporinas de tercera o cuarta generación ó inclusive carbapenems (cepas multiresistentes productoras de betalactamasas de espectro extendido [BLEE]). Debido a la alta prevalencia de infecciones por estafilococo coagulasa negativo, de manera empírica se puede utilizar vancomicina en sospecha de sepsis nosocomial pero si los cultivos se reportan negativos en 48 horas esta se debe suspender. El uso de pentoxifilina como adyuvante en el manejo de sepsis reduce la mortalidad en neonatos pretérmino; sin embargo, debido a debilidades

metodológicas de los estudios al respecto no es adecuado utilizarlo de manera rutinaria hasta la obtención de mejor evidencia. Dependiendo de las condiciones clínicas del paciente en el caso de sepsis grave o choque séptico se deberá proporcionar apoyo ventilatorio, suministro de líquidos, aminas e incluso corticoesteroides en el caso de hipotensión refractaria a las mismas o en caso de sospecha de insuficiencia suprarrenal. Es indispensable realizar la corrección del equilibrio ácido-base y proporcionar apoyo calórico y nutricional ya sea por vía enteral o parenteral según sea el caso.³⁹

2.9 Tecnología Volumen-Conductividad-Dispersión (VCS)

La tecnología VCS es la herramienta más potente disponible para el análisis de células sanguíneas, (por sus siglas en inglés corresponde al acrónimo de volumen, conductividad y dispersión) esta tecnología patentada ofrece la mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia de cualquier sistema de análisis de células disponibles en la actualidad. El análisis comienza con una muestra preparada adecuadamente usando una combinación de reactivos y agitación física en una cámara de mezcla orbital, los eritrocitos se lisan suavemente mientras que los leucocitos se mantienen lo más posible en su estado nativo. El módulo analítico VCS del LH 780 Coulter se basa en el principio de la citometría de flujo modificado para proporcionar más información sobre las células no teñidas.

- Volumen: Mide el volumen de los leucocitos, utilizando corriente directa que no penetra la célula pero hace variar la impedancia, estimando el tamaño de cada célula que se desplaza en un diluyente isotónico.

- Conductividad: Mediante una corriente de alta frecuencia penetra la célula y describe las características internas, incluida la composición química y el volumen nuclear.
- Dispersión: Cuando una célula pasa por la luz del rayo láser, la luz dispersada se extiende en todas las direcciones. Esta dispersión define características de superficie, forma de la célula y granularidad.

VCS es el único análisis de un solo canal que utiliza 3 fuentes de energía independientes para sondear aproximadamente 8192 células en su estado nativo. Como cada uno de los más de 8000 leucocitos o 32000 eritrocitos son analizados por VCS, se les asigna una coordenada X, Y y Z en una matriz de 3 dimensiones. Las células con características similares forman grupos distintos en esta gama de más de 16.7 millones de puntos de datos y con un sofisticado software se analizan estos grupos para obtener la cantidad (expresada como un porcentaje de cada tipo de célula), posición (un indicador de la morfología), y la densidad (útil en la detección de sub-poblaciones dentro de la clasificación principal de células).^{40, 41}

2.10 Volumen Medio Neutrófilico

En la actualidad los autoanalizadores hematológicos cuentan con nuevos parámetros que han proporcionado grandes ventajas al alertar la existencia de anomalías presentes en la muestra analizada. El Coulter LH 780 es capaz de evaluar el tamaño de la célula (volumen), la composición interna (conductividad), la granularidad citoplasmática y el tamaño del núcleo celular (dispersión). Con base a esta evaluación proporcionada por la tecnología VCS es posible determinar el Volumen

Medio Neutrófilico (VMN), éste es un parámetro capaz de detectar la variabilidad de los cambios morfológicos en los neutrófilos, principalmente el tamaño y la granularidad durante una infección aguda por lo que dicho parámetro puede ser utilizado como una herramienta en el diagnóstico oportuno de una infección sistémica como es el caso de la sepsis.^{42, 43}

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que durante periodos agudos de infección como es el caso de la sepsis, hay incremento y cambio morfológico de los neutrófilos siendo el VMN un parámetro capaz de detectar la variabilidad de estos mediante la tecnología VCS del autoanalizador hematológico LH 780 proporcionado simultáneamente en la citometría hemática, es importante hacer uso de él e implementarlo en el laboratorio clínico como un parámetro de uso diagnóstico.

IV. HIPÓTESIS

El incremento del parámetro VMN, obtenido a partir de la citometría hemática será un indicador primario en el diagnóstico de sepsis en pacientes pediátricos.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la utilidad del VMN como indicador primario de sepsis en el laboratorio clínico.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el intervalo de referencia del VMN como marcador de sepsis en pacientes pediátricos.
- Diseñar un protocolo estratégico para determinar la expresión de CD64 en neutrófilos por citometría de flujo.
- Evidenciar la utilidad del VMN en relación con el frotis de sangre periférica y la expresión de CD64 en neutrófilos mediante el estudio de casos clínicos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras biológicas

Sangre periférica anticoagulada con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) obtenida en tubo al vacío, para la obtención de sangre total.

5.2 Equipos

- Autoanalizador hematológico; LH 780 Beckman Coulter.
- Microscopio; Carl ZEISS.
- Citómetro de flujo; FC 500 Beckman Coulter.

5.3 Muestra de estudio

Pacientes pediátricos de 0 a 18 años de edad atendidos en el INP.

- Primera fase del estudio: 282 muestras control para obtener el intervalo de referencia del VMN.
- Segunda fase del estudio: Un caso clínico control y uno séptico para correlacionar el VMN con frotis de sangre periférica y expresión de CD64.

5.4 Criterios de inclusión

Primera fase del estudio:

- Pacientes control: sin alteración en la citometría hemática.

Segunda fase del estudio:

- Caso control: paciente sin alteración en la citometría hemática.
- Caso séptico: paciente con alteración en la citometría hemática y diagnóstico de sepsis.

5.5 Criterios de exclusión

Para ambas fases del estudio se excluyeron pacientes provenientes del servicio de hemato-oncología o que cursen con alguna patología crónica.

VII. RESULTADOS

- Primera fase del estudio:

En esta fase del estudio se evaluaron 282 muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA de pacientes control sin alteración en la citometría hemática examinadas en el autoanalizador hematológico LH 780 Beckman Coulter en el cual se determina el valor del VMN, con el fin de obtener el intervalo de referencia. El 56% de las muestras evaluadas corresponden al género masculino y el 44% al femenino (Figura 5).

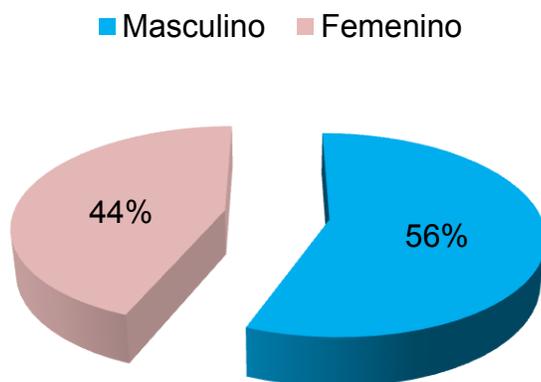


Figura 5: Distribución por género.

El intervalo de referencia para el VMN se estableció con el rango de valores obtenidos que se encuentran dentro del 95% de la población sana estudiada, definida por más/menos dos desviaciones estándar, dicho intervalo que se obtuvo es de 132 – 162 fL. Además se observó que la distribución del VMN es homogénea en relación con la edad de la población examinada (Figura 6). Estos datos sugieren que la edad no es un parámetro que influya en los valores del VMN.

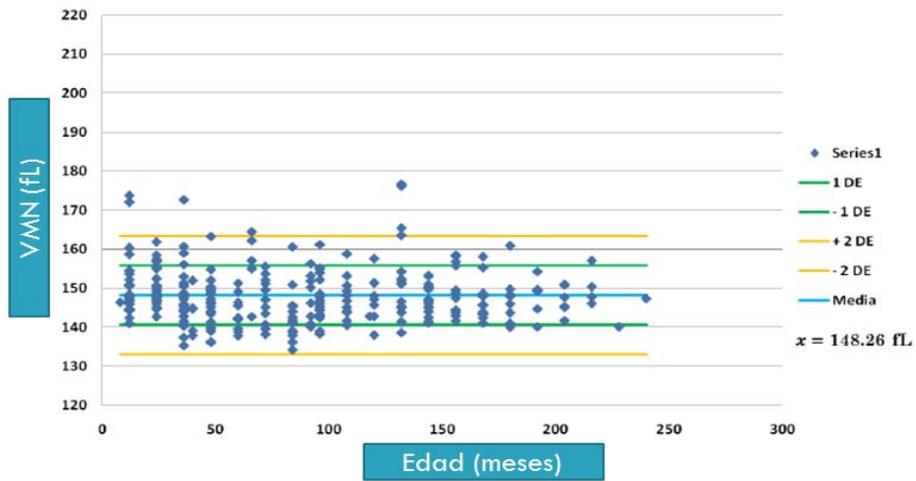


Figura 6: Relación VMN y edad.

En el análisis de los datos se puede observar que no hay diferencia entre géneros, así que el VMN no condiciona entre los individuos de cada género, (Figura 7).

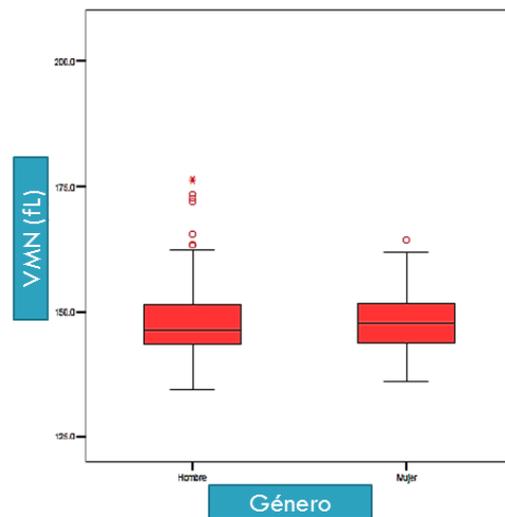


Figura 7: Relación VMN y género.

La población examinada corresponde a los servicios hospitalarios considerados de bajo riesgo (gastroenterología, gastronutrición, estomatología, oftalmología, ortopedia y otorrinolaringología) debido al origen de patologías no críticas atendidas en dichas áreas. Se observó que no existen diferencias significativas entre los valores del VMN y los servicios hospitalarios estudiados, (Figura 8). Por lo tanto se sugiere que estos servicios pueden ser considerados como grupo control.

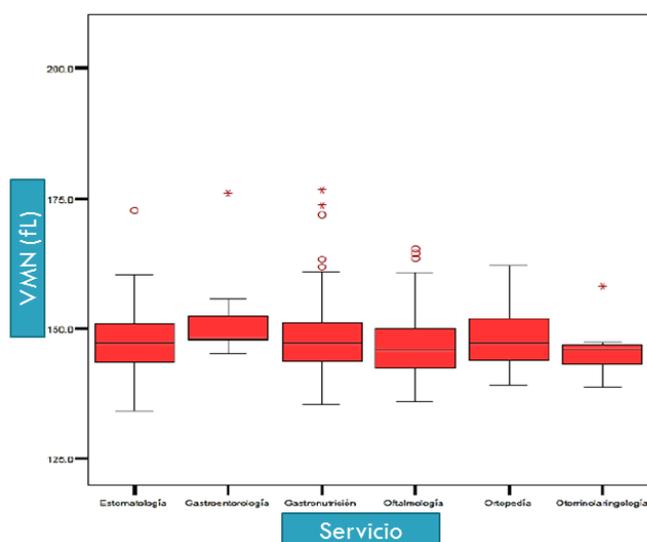


Figura 8: Relación VMN y servicio hospitalario.

Por último se observó que los valores obtenidos del VMN presentan una distribución normal, (Figura 9). Este hallazgo permitió establecer que los datos obtenidos se pueden contrastar contra el grupo de muestras de pacientes con probable presencia de infección, siendo esto la segunda parte de este estudio.

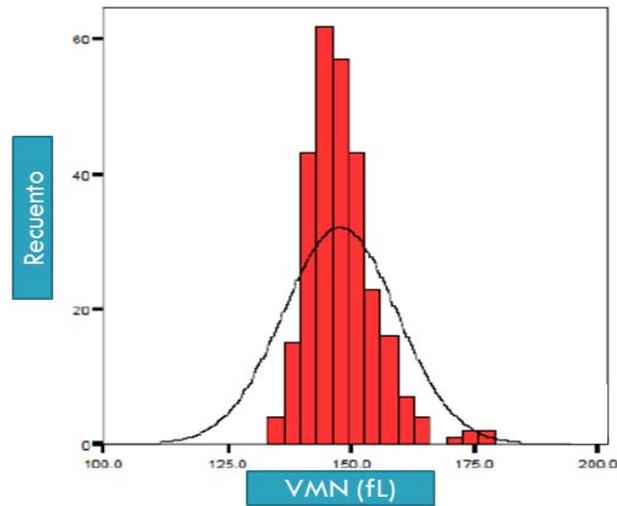


Figura 9: Distribución normal del VMN.

- Segunda fase del estudio:

En esta fase del estudio se diseñó un protocolo estratégico para determinar la expresión de CD64 en el citómetro de flujo FC 500 Beckman Coulter, en el cual se establecieron los parámetros que se deseaban analizar, así como la verificación del mismo (Anexo 1). El protocolo de análisis diseñado establece el uso de 3 alícuotas de la muestra (Tabla 2). La primera es para evidenciar la autofluorescencia de la muestra sin ningún fluorocromo, en la segunda se seleccionan las células CD45 (leucocitos) y CD24 (linfocitos y neutrófilos) y la tercera contiene CD64 para reflejar la presencia de neutrófilos activados.

Tabla 2: Preparación de muestra para análisis de CD64.		
Alícuota 1	Alícuota 2	Alícuota 3
100 µL de muestra	100 µL de muestra + 20 µL CD45 + 10 µL CD24	100 µL de muestra + 20 µL CD45 + 10 µL CD24 + 10 µL CD64

El caso control analizado corresponde a un paciente de género femenino de 4 años de edad atendida en el servicio de consulta externa, los resultados de la citometría hemática se encuentran dentro del intervalo de referencia; leucocitos $5.8 \cdot 10^3/uL$ (4.50–13.50), neutrófilos 52.5% (36.3–75.5) y el VMN 138.9 fL (132–162), en el conteo diferencial manual no se observaron células atípicas y en la citometría de flujo, (Figura 10), el primer histograma identifica las poblaciones celulares totales SS vs FS (A), en el siguiente CD45 (B) y en el último CD24 (C) con el cual se separan las poblaciones celulares correspondientes a linfocitos y neutrófilos, con ello se posiciono la ventana en función de la región de los neutrófilos.

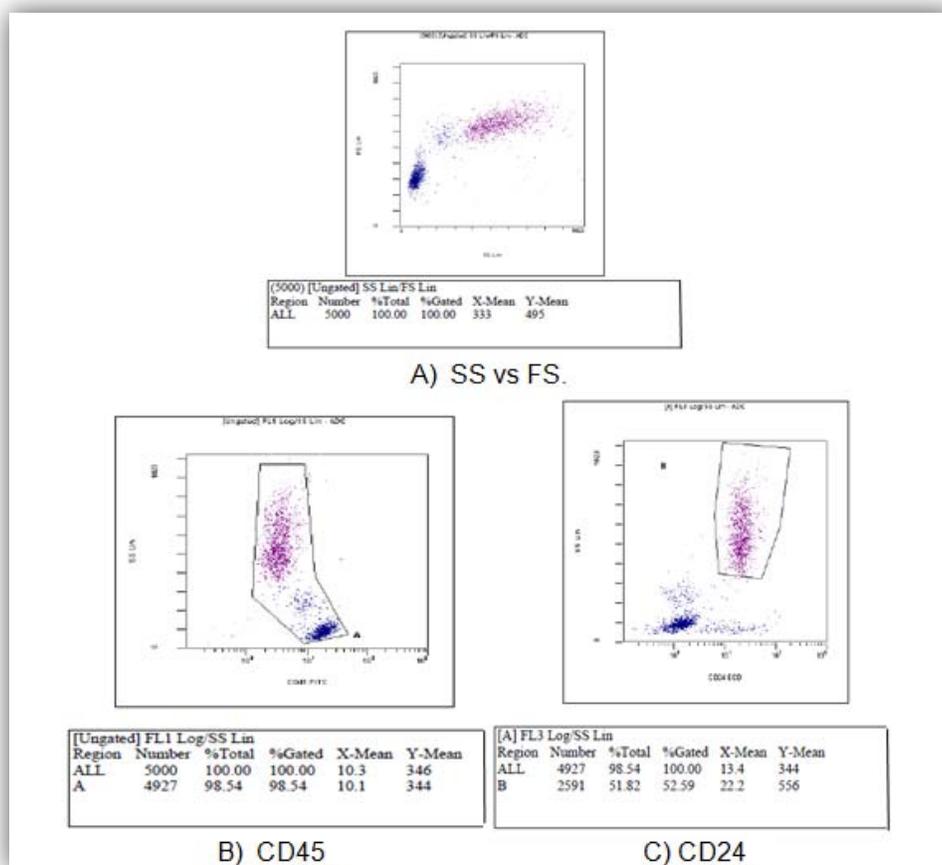


Figura 10: Histogramas de identificación de poblaciones celulares, caso control.

En el histograma de fluorescencia para CD64 se encuentra en la década 10^0 (región negativa) lo que indica que no hay neutrófilos activados (A), así como también se muestra en el histograma de cuadrantes CD24 vs CD64 la región D4 identifica al 100% que no hay neutrófilos activados (B), (Figura 11).

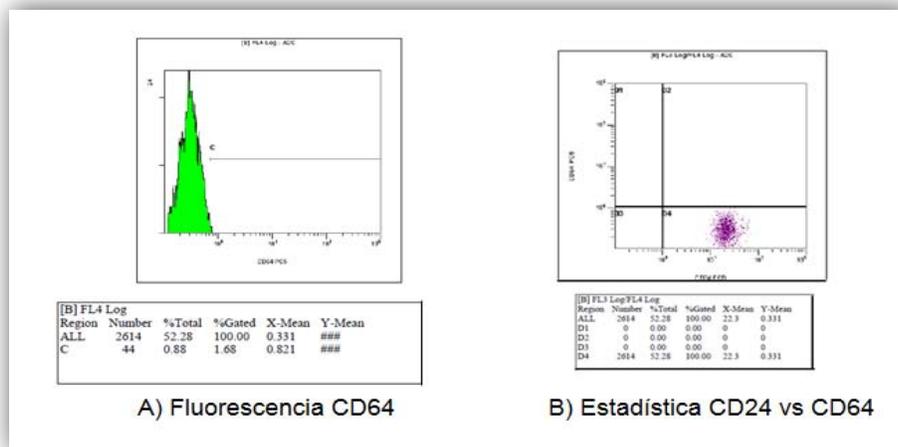


Figura 11: Histograma de fluorescencia y estadística, caso control.

El caso séptico analizado corresponde a un paciente de género masculino recién nacido, atendido en el servicio de neonatos, los resultados de la citometría hemática se encuentran fuera de los rangos de referencia; leucocitos $24.4 \times 10^3/uL$ (4.50–13.50), neutrófilos 83.5% (36.3–75.5) y el VMN 198.7 fL (132–162), en el conteo diferencial manual se observaron neutrófilos con presencia de granulación tóxica y vacuolas citoplásmicas. La concentración sérica de la pCr fue de 17.4 mg/dL (0.001–0.35) y en el hemocultivo se identificó *Staphylococcus epidermidis*. En la citometría de flujo, (figura 12) el primer histograma identifica las poblaciones celulares totales SS vs FS (A), en el siguiente CD45 (B) y en el último CD24 (C), con el cual se

separan las poblaciones celulares correspondientes a linfocitos y neutrófilos, con ello se posiciono la ventana en función a la región de los neutrófilos.

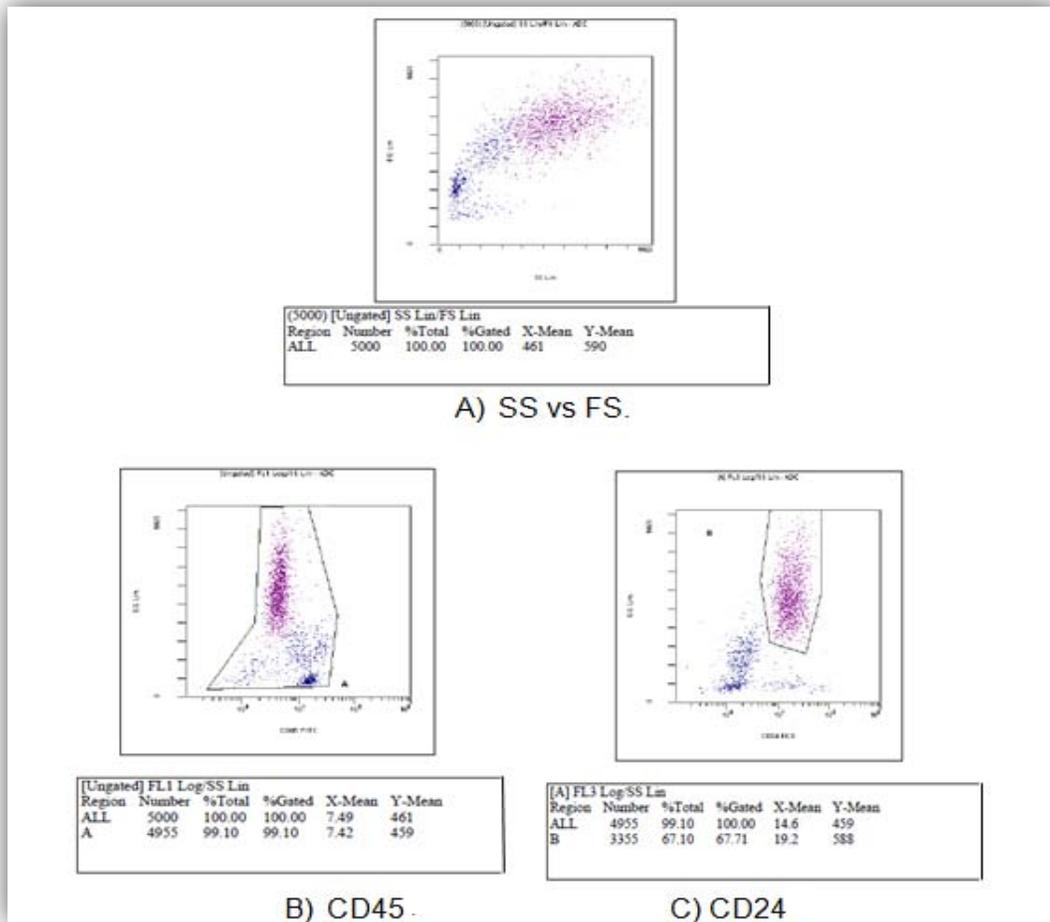


Figura 12: Histogramas de identificación de poblaciones celulares, caso séptico.

En el histograma de fluorescencia para CD64 se encuentra en la década 10^1 (región positiva) lo que indica que hay un desplazamiento positivo y determina la presencia de neutrófilos activados en un 96.6% CD64 (A), así como también en el histograma de cuadrantes CD24 vs CD64, la región D2 identifica 95.5% de neutrófilos activados CD64 (B).

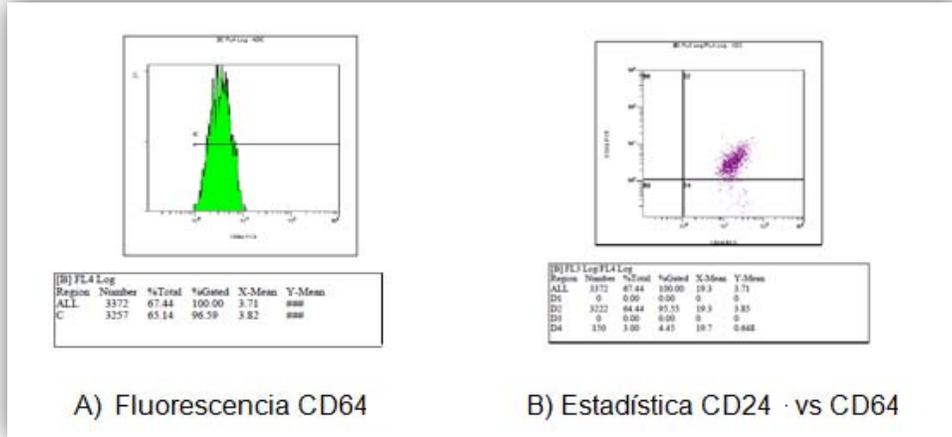


Figura 13: Histograma de fluorescencia y estadística, caso séptico.

Después se realizó una mezcla de alícuotas entre la alícuota 2 que solo contiene marcador CD45 y CD24 con la 3 que además de CD45 y CD24 contiene también CD64, esto con el fin de evidenciar el desplazamiento de fluorescencia de las décadas 10^0 a 10^1 , lo que nos refleja la diferencia de posición de una muestra negativa a una positiva (Figura 14).

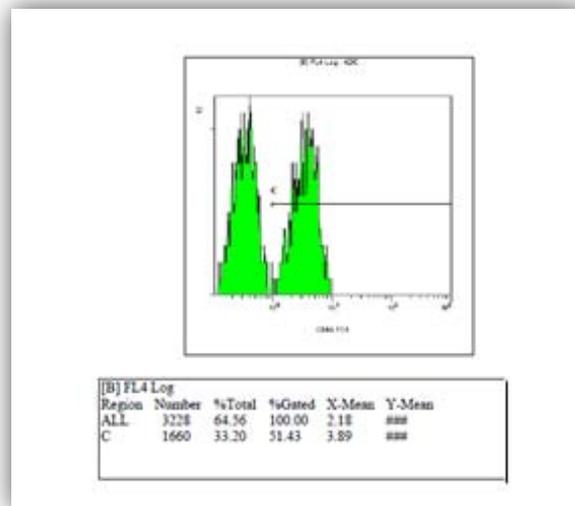


Figura 14: Mezcla de fluorescencia negativa con positiva.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que la determinación del parámetro VMN es una prueba que debe considerarse en el diagnóstico de sepsis a la par de las demás pruebas empleadas habitualmente.

El uso de analizadores hematológicos automatizados ha revolucionado la forma en que la práctica de laboratorio es capaz de examinar rápidamente un gran número de células para proporcionar parámetros de utilidad clínica. La tecnología VCS del LH 780 Beckman Coulter, puede evaluar de forma automática más de 8000 glóbulos blancos usando mucho menos tiempo para el análisis diferencial y clasificación en comparación con el recuento de diferencial manual.^{40, 41}

En este estudio, se logró demostrar que los cambios morfológicos observados en los neutrófilos reactivos durante un episodio de infección bacteriana podrían medirse cuantitativamente utilizando el analizador LH 780 Beckman Coulter. Se identificó que el VMN fue significativamente elevado en el caso séptico analizado (>162 fL), con hemocultivo positivo, mayor recuento de glóbulos blancos, neutrofilia y pCr elevada. Bajo el mismo comportamiento quedan los resultados obtenidos por Chaves y cols.⁴³ en su estudio el grupo séptico analizado presenta el VMN alrededor de 156 +/- 13.5 fL, además también concluyen que el VMN es un hallazgo fortuito y es probable que sea una medición fiable para la detección de sepsis.

Bagdasaryan y cols.³¹ demostraron que aunque la evaluación de la expresión de CD64 en leucocitos recientemente mejora la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de infección bacteriana, el parámetro VMN que determina el LH 780 ofrece más rapidez y es menos costoso. Sin duda, la precisión diagnóstica mejora si se combinan ambos.

Así mismo comparando nuestros resultados respecto al grupo de pacientes analizados por Mardi y cols.⁴⁴ que obtuvieron un punto medio de referencia de 150 fL muy similar al nuestro 148.26 fL; sin embargo, la evaluación de ellos fue realizada en población adulta y no hay reportes en infantes. Además determinaron que el VMN es el parámetro más predictivo frente a la proteína C reactiva.

IX. CONCLUSIÓN

El VMN es un parámetro fácil de obtener rápido y de bajo costo que nos proporciona un valor muy predictivo en el diagnóstico de sepsis y sugerimos que es confiable como indicador primario para la detección de infección aguda.

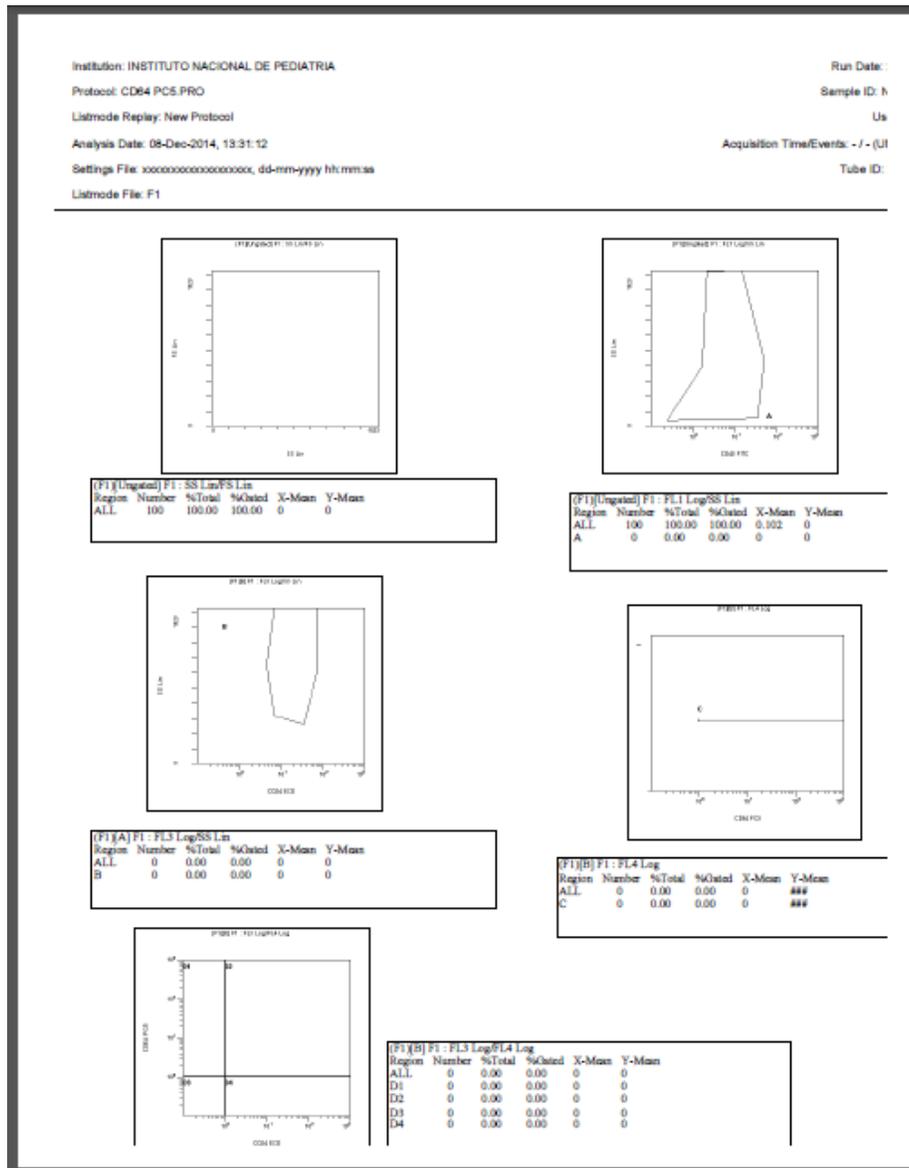
Es de suma importancia resaltar que el valor del VMN se reporta en la citometría hemática, una de las pruebas de rutina mayormente solicitada en el laboratorio clínico por lo que se recomienda hacer uso de él como prueba diagnóstica. Además de que no implica un costo extra, tiempo ni la adición de más reactivos. Lo que es un gran beneficio para el paciente y el laboratorio como soporte de diagnóstico clínico.

El VMN se añadiría al perfil de hallazgos de laboratorio en sepsis, además de la presencia de las manifestaciones clínicas que involucran esta patología, lo que quiere decir que no sustituye ninguna de las pruebas que conforma dicho perfil, sin embargo puede considerarse como prueba de escrutinio que colaborara con una mejor toma de decisiones y un diagnóstico oportuno.

La expresión de CD64 en neutrófilos por citometría de flujo tiene una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de sepsis, por lo tanto se recomienda a futuras investigaciones ampliar la población de estudio para que sea estadísticamente representativa la correlación con el VMN, ya que el presente trabajo se limitó a evidenciar un solo caso séptico.

X. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de estudio para identificación de la expresión de CD64 en neutrófilos en el citómetro de flujo FC 500 Beckman Coulter.



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Levy, M., Fink, J., Marshall, J., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. Crit Care Med. 2003; 31: 1250-6.
2. Goldstein, B., Giroir, B. y Randolph, A. International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005; 6(1):2-8.
3. Roca, R., Smith, V., Paz E., Losada, J., Serret, B. y Llamas, N. Temas de medicina interna. 4 ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002, t3. págs. 538-50.
4. Meneghello, J., Fanta, E., Paris, E. y Puga, F. Pediatría. T1. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997. págs. 647-9.
5. Fischer, J. y Fanconi, S. Systemic inflammatory response syndrome (SRIS). Crit Care Med. 1997; (24):239-54.
6. Fiser, R. y Darville, T. Systemic inflammatory response syndrome. En: Levin DL. Essential of pediatric intensive care. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1997. p. 266-79.
7. David, G., Sweet, V. y Gorn, G. European Consensus Guidelines on the Management of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants- 2010 Update; Neonatology 2010; 97; 402-417.
8. American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care: part 13; Neonatal Resuscitation Guidelines. Circulation 2005; 112: IV – 188- IV 195.
9. Lorenz, J. Fluid and electrolyte therapy in the newborn infant. In Pediatric Therapy. Philadelphia, Saunders; 2002; 11; 23-28.
10. McGuire, W., Henderson, G., Fowlie, P. ABC of preterm birt, feeding the preterm infant, BMJ 2004; 329; 27-29
11. Goldstein, B., Giroir, B., Randolph, A., and the members of the International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005;6 (1):2-6.
12. Nelson, W., Behrman, R., Kliegman, R., Arvin, A. Tratado de pediatría. 15 ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 1997. Págs. 4-18.

13. Paganini, H. Tratamiento de la sepsis en pediatría: ¿qué debemos hacer? Arch Argent Pediatr. 2003; 101(5):406-14.
14. World Health Organization. The World Health report 2004. Geneva: WHO; 2004.
15. Paganini, H. The World Health report 2006. Geneva: WHO; 2006.
16. Carrillo, R., Carrillo, J., Carrillo, L. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas Cir Ciruj 2009; 77:301-308
17. Fariñas, A. y Dáger, A. Sepsis y trastornos relacionados. MEDISAN vol.16 no.6 Santiago de Cuba jun. 2012
18. La Rosa, S. Sepsis: Menu of new approaches replaces one therapy for all. CleveClin J Med. 2002, 69: 65-73.
19. Vervloet, M., Thijs, L., Hack, C. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. Semin. Thromb Haemost. 1998, 24: 33-44.
20. Boehme, M., Deng, Y., Raeth, U., et al: Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: In vivo and in vitro studies. Immunology. 1996, 87: 134-140.
21. Rosenberg, R. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. Am J Med. 1989, 87: 2S-9S.
22. Parrillo, J., Parker, M., Natanson, C., et al: Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Intern Med. 1990, 113: 227-242
23. Vincent, J., Yasser, S., Sprung, C., et al: Sepsis in Europeans intensive care units: Results of the SOAP study. Crit Care Med. 2006, 34: 344-353.
24. National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. N Engl J Med. 2006, 354: 2564-2575.
25. Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2000, 342: 1301-1308.

26. Brower, R., Lanken, P., MacIntyre, N., et al: National Heart, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network: Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Med.* 2004, 351: 327-336.
27. Grinnell, B., Hermann, R., Yan, S. Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology.* 1994, 4: 221-225.
28. McKenzie, B. *Hematología Clínica.* 2ª edición. Editorial El Manual Moderno. México. 2000. Páginas: 71-81,
29. Schmitz, L., McClure, J., Litz, C., et al: Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. *Am J Clin Pathol* 1994;101:67-75.
30. Stockman, J., Ezekowitz, R. Hematologic manifestations of systemic diseases. Nathan and Oski's *Hematology of infancy and Childhood*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998:1841-1891.
31. Bagdasaryan, R., Zhou, Z., Tierno, B., Rosenman, D., Xu, D. Neutrophil VCS Parameters Are Superior Indicators for Acute Infection. *Laboratory Hematology* 2007; 13:12-16.
32. Murray, P., Rosenthal, K. *Microbiología médica.* Ed. Mosby. 4ta edición. Madrid. 2002. Páginas 380-386.
33. Ruiz, G. *Fundamentos de Hematología*, 4ª edición, Editorial Panamericana, México. 2011. Páginas 70-78, 103-110.
34. Rodack, C. *Atlas de Hematología Clínica.* 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 2010. Páginas 33-45.
35. Redl, H., Spittler, A., Strohmaier, W. *Markers of sepsis in The Sepsis Test.* Kluwer Academic Publisher. Boston 2002. pag 47-66.
36. Müller, B., et al. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* 2000, 28(4): 977-983
37. *Manual de operaciones del citómetro de flujo FC 500 Beckman Coulter®.* Páginas 5-22.
38. Davis, B., Olsen, S., Ahmad, E., Bigelow, N. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:654-61.

39. Haque, K., Mahan, P. Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. The Cochrane Collaboration. Cochrane Library (ISSN 1464-780X). 2010.
40. Richardson, A. An automated hematology instrument for comprehensive WBC, RBC, and platelet analysis. *Am Clin Lab*. 1990; 9:18-22.
41. Lee, J., Ahern, T., Chaves, F. Utility of hematologic and volume, conductivity, and scatter parameters from umbilical cord blood in predicting chorioamnionitis. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2009.
42. Chaves, F., Tierno. B., Xu, D. Neutrophil Volume Distribution Width A New Automated Hematologic Parameter for Acute Infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006.
43. Chaves, F., Tierno. B., Xu, D. Quantitative Determination of Neutrophil VCS Parameters by the Coulter Automated Hematology Analyzer New and Reliable Indicators for Acute Bacterial Infection. *Am J Clin Pathol* 2005.
44. Mardi, D., Fwity, B., Lobmann, R., Ambrosch, A. Mean cell volume of neutrophils and monocytes compared with C-reactive protein, interleukin-6 and white blood cell count for prediction of sepsis and nonsystemic bacterial infections. 2009.