

Identificación de bacterias mediante reacción en cadena de polimerasa en recién nacidos pretérmino con ruptura prematura de membranas[†]

Tte. Cor. M.C. Jorge Mauricio **Acosta-García,***

Tte. Cor. M.C. Esaú **Floriano-Sánchez,**** Mayor M.C. Hilda Beatriz **Gómez-Robledo*****

Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología/Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Escuela Médico Militar/
Escuela de Posgrado del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. El nacimiento pretérmino es la principal causa de morbilidad en el periodo neonatal, siendo la ruptura de membranas responsable de 30% de los nacimientos prematuros. En la mayoría de los casos de RPM y sepsis neonatal temprana, los microorganismos responsables están presentes en el líquido amniótico, pero éstos no siempre son identificados por las técnicas habituales de cultivo por lo que se desconoce a ciencia cierta su prevalencia como agentes patógenos involucrados.

Método. Se realizó un estudio prospectivo, observacional, descriptivo en recién nacidos prematuros con ruptura prematura de membranas a quienes se tomó al nacimiento muestra de sangre de cordón y aspirado gástrico para la detección de bacterias por los métodos de cultivo y PCR, determinación de proteína C reactiva y biometría hemática y se compararon los datos con el hallazgo de corioamnionitis y mortalidad neonatal temprana.

Resultados. Se incluyeron un total de 60 recién nacidos. La media para la edad materna fue de 25.6 años, la RPM se presentó en 80% de los casos en embarazos subsecuentes, el promedio de latencia entre la ruptura y el nacimiento fue de 59.6 h, la media para la edad gestacional en los recién nacidos fue de 33.6 semanas y el peso promedio fue de 1,470 g, se observó corioamnionitis en 15% de los casos todos con un tiempo de ruptura mayor a 96 h y coriofunisitis en 5% en los casos de ruptura mayores a 120 h, se logró la identificación de bacterias en el recién nacido en 5% de los casos por ambos métodos (hemocultivo y RCP), la mortalidad neonatal temprana ocurrió en 3%.

Conclusión. No se observó incremento en la prevalencia de sepsis neonatal temprana al identificar gérmenes por PCR y la presencia de bacterias al nacimiento no tuvo correlación con la ocurrencia de mortalidad neonatal temprana.

Identification of bacteria by polymerase chain reaction in preterm premature rupture of membranes

SUMMARY

Introduction. Preterm birth is the leading cause of mortality in the neonatal period, rupture of membranes being responsible for 30% of premature births. In most cases of early neonatal sepsis RPM and the microorganism responsible are present in the amniotic fluid, but these are not always identified by standard techniques of culture by what is not known for certain prevalence of agents pathogens involved in this disease.

Method. We performed a prospective, observational, descriptive in preterm premature rupture of membranes who are taking birth sample of cord blood and gastric aspirate for detection of bacteria by culture and PCR methods, determination of protein CRP and CBC data were compared with the findings of chorioamnionitis and early neonatal mortality.

Results. A total of 60 infants. The mean maternal age was 25.6 years, the RPM was present in 80% of cases in subsequent pregnancies, the average latency between rupture and birth was 59.6 h, the mean for gestational age in newborn infants was 33.6 weeks and for the weight of 1,470 g, chorioamnionitis was observed in 15% when the time of rupture was higher at 96 h and funisitis in the 5% breakthrough times greater than 120 h, it was possible to identify bacteria in the newborn to 5% of cases by both methods (blood culture and PCR), early neonatal mortality occurred in 3%.

Conclusion. There was no increased prevalence of early neonatal sepsis to identify bacteria by PCR compared to blood culture. The identification of bacteria at birth did not correlate with the occurrence of early neonatal mortality.

Palabras clave: Periodo neonatal, sepsis, prematuros, morbilidad neonatal.

Key words: Neonatal period, sepsis, prematurity, neonatal morbidity and mortality.

* Jefe del Departamento de Neonatología. HMEMyN. ** Jefe de Laboratorio de Biología Molecular, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. *** Adscrito al Laboratorio Multidisciplinario. Escuela Médico Militar.

[†] Este trabajo fue realizado como parte del curso de Maestría en Ciencias de la Salud de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dr. Jorge M. Acosta-García
Depto. Neonatología HMENyN. Av. Industria Militar S/N Lomas de Sotelo, México, D.F. Correo electrónico: drjmacosta@gmail.com

Recibido: Agosto 12, 2013.
Aceptado: Octubre 4, 2013.

Introducción

El nacimiento pretérmino se presenta en 10-15% de todos los embarazos alrededor del mundo.¹ Las causas del parto pretérmino son multifactoriales y en su gran mayoría se desconocen a fondo los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el parto prematuro, sin embargo investigaciones recientes se han enfocado a determinar su origen en factores maternos tanto intrínsecos como extrínsecos.^{2,3} Dentro de los factores intrínsecos las investigaciones se han encaminado a la búsqueda de alteraciones genómicas, inmunológicas y nutricionales en la madre;⁴ de los factores extrínsecos uno de los mecanismos propuestos es la activación de mediadores inflamatorios como consecuencia de la colonización de la decidua y las membranas fetales por microorganismo patógenos que activan en el huésped la respuesta inmune.⁵⁻⁷ Este proceso resultaría en la liberación de mediadores inflamatorios, leucocitosis, corioamnionitis, funisitis y finalmente en el inicio de actividad uterina con o sin ruptura de membranas que desencadenaría el parto prematuro.⁸⁻¹⁰ Recientes estudios sugieren que en la mayoría de los casos de parto pretérmino en donde se demuestran marcadores inflamatorios fetales principalmente interleucina 6, factor de necrosis tumoral o proteína C reactiva, entre otros, los microorganismo responsables de este proceso inflamatorio están presentes en el líquido amniótico,¹¹⁻¹⁷ pero éstos no siempre son identificados por las técnicas habituales de cultivo por lo que se desconoce a ciencia cierta la prevalencia de estos agentes patógenos como causales de la respuesta inflamatoria en el recién nacido y su relación con la sepsis neonatal temprana.¹⁸⁻²¹

Actualmente se considera al hemocultivo como el *gold estándar* para la identificación de bacterias causantes de un proceso infeccioso en el organismo de un recién nacido. Esta técnica, sin embargo, ha demostrado tener una sensibilidad sumamente baja, ya que el resultado depende de la técnica de recolección, el material y medio utilizado para el cultivo, de la persona que realiza el procedimiento así como de la cantidad de sangre recolectada para la muestra; reportándose en el mejor escenario clínico una sensibilidad para la prueba de 30% y una especificidad de 100% para la misma.²²

En nuestros días nuevas técnicas de laboratorio se están implementando para la identificación de bacterias en situaciones de difícil crecimiento. La genotipificación bacteriana por PCR ha demostrado en diversos escenarios clínicos una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de bacterias que las técnicas habituales de cultivo.²³

El presente estudio tiene como objetivo la identificación de agentes bacterianos utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa en sangre y líquido amniótico de recién nacidos pretérmino con ruptura prematura de membranas y compararla con los resultados obtenidos por hemocultivo. Asimismo, establecer si existe correlación entre la identificación de gérmenes patógenos y los hallazgos de un proceso inflamatorio en la placenta y el feto con la tasa de mortalidad neonatal temprana.

Material y métodos

Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, prospectivo, transversal, de prevalencia (concordancia). El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido de junio a diciembre del 2011. Todas las muestras de sangre y líquido amniótico se tomaron en el área de Neonatología de la C.E.M. al ingreso del recién nacido.

La determinación de proteína C reactiva y la identificación de gérmenes por cultivo se realizó en el laboratorio de la C.E.M.

La técnica de amplificación y secuenciación por PCR se realizó en el laboratorio multidisciplinario de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Criterios de inclusión

- Hijos de madre con parto pretérmino y ruptura prematura de membranas.
- Sin patología materna agregada.
- Nacidos en la CEM.
- De 25-35 semanas de edad gestacional.

Criterios de exclusión

- Hijos de madre con parto pretérmino inducido.
- Patología materna asociada.
- Malformaciones congénitas mayores.
- Embarazo gemelar.
- Polihidramnios.
- Muerte fetal.
- Recién nacidos que ameriten traslado a otro centro hospitalario.
- Reporte de hemocultivo con crecimiento polibacteriano secundario a contaminación.

Resultados

Se incluyeron un total de 60 mujeres con embarazo único y RPM que cumplieron con los criterios de estudio, la edad materna promedio fue de 25 años con un rango de 17 a 36 años, en 60% de los casos la vía de nacimiento fue por cesárea (*Cuadro 1*), la ruptura prematura de membranas se presentó en 13 pacientes (21.7%) durante el primer embarazo, 29 (48.3%) en el segundo, 15 (25%) en el tercero, y tres (5%) después del tercer embarazo (*Cuadro 2*).

El tiempo promedio de latencia entre la RPM y el nacimiento fue de 59 h con un rango de 18 a 168 h. Treinta y cuatro recién nacidos (56.6%) fueron de sexo femenino. La distribución por edad gestacional fue 10% (n = 11) de las 26 a 28 semanas, 30% (n = 18) de las 29 a 32 semanas y 60% (n = 42) de 33 a 35 semanas con una media para la edad gestacional de 32.3 SEG (*Cuadros 3 y 4*). La media para el peso fue de 1,470 g con una DE de 395 g. La corioamnionitis se diagnosticó en 12 casos que representa una tasa de 20%, al estadificar la corioamnionitis se encontró que 15% (n = 9) corres-

Cuadro 1. Características de la población en estudio.

Edad materna	25.6 años	D.E. 2.1a
Horas de RPM	59.6 h	D.E. 50.6 h
Peso al nacimiento	1470 g	D.E. 395 g
Edad gestacional	32.3 sem	D.E. 0.7d
Cesárea	36	60%
Corioamnionitis	12	20%
Germen aislado	3	5%

Cuadro 2. Relación entre ruptura prematura de membrana y edad materna.

< 18	3	5%
19-25	25	42%
26-30	23	38%
31-35	9	15%

Cuadro 3. Distribución de recién nacido por edad gestacional.

26-28 sem	6	10%
29-32 sem	18	30%
33-35 sem	36	60%

Cuadro 4. Distribución por horas de ruptura prematura de membrana.

18-72	46	78%
73-96	7	11%
97 o más	7	11%

pondieron al estadio 1 y 5% (n = 3) al estadio 3. Se reportaron un total de tres hemocultivos positivos a agentes bacterianos (5%). Una determinación de Prot C reactiva mayor de 1 se observó en ocho pacientes; de ellos una Prot. C reactiva mayor a 2 mg/dL se correlacionó con la presencia de corioamnionitis estadio 3 y con un reporte de cultivo positivo. La mortalidad neonatal temprana se presentó en dos pacientes con una tasa de 3.4%.

Discusión

Las causas del parto pretérmino son multifactoriales y en su gran mayoría se desconocen a fondo los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el parto prematuro, sin embargo, investigaciones recientes se han enfocado a determinar su origen en factores maternos tanto intrínsecos como extrínsecos. En nuestro estudio al analizar los factores maternos en los casos de parto pretérmino y ruptura prematura de membranas se observó que ésta se presenta con mayor frecuencia en madres de la segunda y tercera década de la vida (80%), siendo menos frecuente en madres que pasan la tercera década (15%) y extremadamente rara en las madres adolescentes (5%), éste es un hallazgo peculiar, ya que al parecer el embarazo en la edad adolescente ejerce un efecto protector contra la RPM. En relación con el número de

gestas en que se presenta la ruptura, llama la atención que la mayor prevalencia se observa en los embarazos subsecuentes con un pico máximo durante el segundo y tercer embarazo (78%), la RPM es un fenómeno poco frecuente en madres primigestas (22%) y al igual que las madres jóvenes pareciera que algún mecanismo modulador tuviera lugar en ellas, el cual por alguna razón se pierde en las madres expuestas a un embarazo posterior.

En relación con la corioamnionitis en nuestro estudio se reportó una prevalencia de 15% de todos los casos de ruptura prematura de membranas, tasa menor a la reportada por otros estudios en donde se reporta hasta 50-60% de corioamnionitis en las pacientes con RPM. Al analizar una posible causa para esta cifra menor encontrada por nosotros, estudiamos el tiempo de latencia entre la ruptura de membranas y el nacimiento. En nuestro estudio observamos que la corioamnionitis histopatológica se presentó con mayor frecuencia en los casos en que la latencia entre la RPM y el nacimiento rebasó las 96 h (80%). Además al estadificar los casos de corioamnionitis se observó que ésta se incrementó proporcionalmente al tiempo de ruptura, además en nuestro estudio la funisitis se reportó sólo en los casos en que se rebasó las 120 h de ruptura. Se encontró que en nuestra institución la media para la ocurrencia del nacimiento en los casos de RPM fue de 59.6 h y que éste tuvo lugar hasta en 60% de los casos por vía cesárea; es decir, al parecer existe una tendencia obstétrica a apresurar el nacimiento por indicación médica en los casos de RPM. Esto sin duda puede ser beneficioso para el feto, ya que ocurriendo el nacimiento antes de 96 h de inicio de la ruptura de membranas y de existir un proceso inflamatorio incipiente, éste no logra identificarse histológicamente en las membranas fetales, lo cual ha sido sugerido de manera indirecta en otros estudios. La frecuencia de corioamnionitis reportada de manera global para los casos de RPM fue de 15%; al estratificar los casos de corioamnionitis se observó que 10% correspondió al grado 1 correlacionándose con un tiempo mayor a 96 h de ruptura y 5% correspondió a coriofunisitis grado 3 presente en los casos de más de 120 h de ruptura.

En nuestro estudio al analizar los marcadores de respuesta inflamatoria en el recién nacido igualmente encontramos que aun en presencia de corioamnionitis histológica no se documenta la presencia de respuesta inflamatoria en el recién nacido si el periodo de latencia entre la ruptura y el nacimiento es menor a 120 h. En nuestro estudio se cuantificaron serie blanca, porcentaje de neutrófilos, bandemia, relación B/N y determinación de proteína C reactiva al momento del nacimiento. No se encontró elevación de ningún marcador inflamatorio aun en presencia de corioamnionitis si el periodo de ruptura no rebasó las 120 h. Nosotros observamos que la determinación de PCR menor de 1 mg/dL en el recién nacido con antecedente de RPM tiene un valor predictivo negativo de 96% para descartar la presencia de sepsis neonatal temprana tanto por hemocultivo como por reacción en cadena de polimerasa.

En el presente estudio se identificó la presencia de agentes bacterianos por hemocultivo solamente en 5% de los ca-

sos, sin embargo, este resultado no se incrementó al utilizar la amplificación por reacción en cadena de polimerasa como herramienta diagnóstica. Los gérmenes encontrados fueron *E. coli* (N = 1), *E. cloacae* (N = 1) y *S. hominis* (N = 1), en los todos los casos se observó una correlación directa con la presencia de coriofunisitis en el estudio histopatológico y con elevación de la proteína C reactiva mayor de 1 mg/dL en el recién nacido. Esto contrasta de alguna manera con algunos resultados reportados en otros estudios en donde se reporta una incidencia de hasta de 30-50% utilizando la RCP para la identificación de bacterias, si bien estos estudios reportan la presencia de gérmenes en muestras de líquido amniótico tomado del tubo digestivo del recién nacido, esto no documenta un proceso infeccioso en el mismo. Por otro lado, existen reportes compatibles con nuestros hallazgos en donde se documenta que la prevalencia de gérmenes en el recién nacido disminuye significativamente hasta 1-3% si no existe un proceso inflamatorio en el cordón umbilical (funisitis), siendo éste el factor principal identificado en la transmisión de gérmenes de la cavidad uterina y el microambiente materno hacia el recién nacido.

En relación con la mortalidad y su relación con la sepsis neonatal temprana, en estudios recientes algunos autores han encontrado que la edad gestacional y la propia inmadurez sistémica son mejores factores pronósticos para el recién nacido con RPM que las mediciones de diferentes biomarcadores.^{24,25} Asimismo, se ha encontrado que la estabilidad hemodinámica, metabólica y respiratoria en la primera hora de vida documentada por la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, el pH, y la saturación de oxígeno tienen un mejor factor pronóstico para la sobrevida del prematuro que la medición al nacimiento de marcadores proinflamatorios en los prematuros con RPM.²⁶

En este estudio se reportaron sólo dos muertes neonatales tempranas, las cuales no tuvieron relación directa con la presencia de sepsis neonatal.

En los casos en que se documentó sepsis neonatal temprana por la presencia de corioamnionitis, elevación de proteína C reactiva e identificación de un agente bacteriano, no se observó correlación con la tasa de mortalidad neonatal temprana.

Conclusiones

1. La ruptura prematura de membranas es una patología que se muestra más frecuentemente en la tercera década de la vida, siendo poco frecuente que se presente en la gestante adolescente y en las mayores de 30 años.
2. La ruptura prematura de membranas es una complicación que se presenta con mayor frecuencia en los embarazos subsecuentes, siendo rara su presencia durante el primer embarazo.
3. La ruptura prematura de membranas complica principalmente el embarazo durante el tercer trimestre, siendo una causa frecuente de nacimientos prematuros tardíos entre las 33 y 35 semanas.

4. Existe una tendencia clínica a acortar el periodo de latencia entre la ruptura de membranas y el nacimiento del producto, lo cual guarda relación directa con la identificación de bacterias en la sangre del recién nacido.
5. El hallazgo de corioamnionitis se incrementa a medida que lo hacen las horas de ruptura previo al nacimiento.
6. La corioamnionitis estadio 3 con funisitis se observa después de 120 h de ruptura de membranas.
7. Se observó elevación de los niveles de proteína C reactiva mayores de 2 mg/dL en los recién nacidos, sólo en los casos en que la ruptura de membranas fue mayor a 120 h.
8. La identificación de un agente bacteriano en el recién nacido se asoció a un tiempo de ruptura de membranas mayor a 120 h y en el estudio histopatológico se documentó corioamnionitis estadio 3.
9. En el presente estudio la identificación de un agente bacteriano al nacimiento no guardó relación con los episodios de mortalidad neonatal temprana.
10. Se requieren estudios complementarios para justificar el uso profiláctico de antibióticos en el recién nacido prematuro con ruptura prematura de membranas.

Referencias

1. LaVone E, Simmons F, Craig D, William R. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Semin Perinatol* 2010; 34: 408-15.
2. Althabe F, Carroli G, Lede R, José M, Homar H. El parto pretérmino: detección de riesgos y tratamientos preventivos. *RevPanam Salud Publica* 1993; 5(6): 373.
3. Muglia L, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med* 2010; 362: 529-35.
4. Fortunato S, Menon R. Distinct molecular events suggested different pathways for preterm labor and rupture premature of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(7): 1399-406.
5. Maxwell NC, Davies PL, Kotecha S. Antenatal infection and inflammation: what's new? *Current Opinion in Infectious Dis* 2006; 19: 253-8.
6. Bastek J, Gómez M, Elovitz M. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Clin Perinatol* 2011; 38: 385-406.
7. Lim KH, Brooks H, McDougal R, Burton J, Devenish C, DeSilva T. Is there a correlation between bacterial vaginosis and preterm labour in women in the Otago region of New Zealand? *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2010; 50(3): 226-9.
8. Romero R, Chaiworapongsa T. Preterm labor, intrauterine infection, and the fetal inflammatory response syndrome. *Neo Reviews* 2002; 3(5): e73-e85.
9. Fortunato S, Menon R. Support for an infection induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(7): 1392-8.
10. Shim S, Romero R. Clinical significance of intraamniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4): 1339-45.
11. Guinn D, Ronald GR. Infection-related preterm birth: A review of the evidence. *Neo Reviews* 2002; 3(5): e86-e95.
12. van Rossum A, Wulkan R, Murphy A. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 620-30.
13. Fortunato S, Menon R. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(5): 1159-62.
14. Lukonvic M, Kornhauser L, Premru-Sren T, Gmeiner T, Derganc T. Neutrophil defensins but not interleukin-6 in vaginal fluid after preterm premature rupture of membranes predict fetal/neonatal in-

flammation and infantneurologicalimpairment. *Acta Obstetricia et GynecologicaScandinavica* 2011; 90: 908-16.

15. Lewis D, Barrilleaux S, Wang Y, Adair D, Baier J, Kruger T. Detection of Interleukin-6 in Maternal Plasma Predicts Neonatal and Infectious Complications in Preterm Premature Rupture of Membranes. *Am J Perinatol* 2001; 18(7): 388-91.

16. Torbe A, Ma³gorzata S, Kwiatkowski S, Rzepka R, Torbe B, Czajka R. Maternal plasma lipopolysaccharide binding protein (LBP) concentrations in pregnancy complicated by preterm premature rupture of membranes. *Eu J Obstet Gynecol Reproduct Biol* 2011; 156: 153-7.

17. Poletini J, Takitane J, Jose C, Peracoli B, Marcia G. Expression of b defensins 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes of preterm pregnancies complicated by chorioamnionitis. *Eu J Obstet Gynecol Reproduct Biol* 2011; 157: 150-5.

18. Romero RDR. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reproduct Immunol* 2010; 64(1): 38-57.

19. Yoon BH, Romero R. Clinical implications of detection of Urea plasma urealyticum I the amniotic cavity whit the polymerase chain reaction. *J Obstet Gynecol* 2000; 183(5): 1130-7.

20. Perni SC, Vardhana S. Mycoplasma Hominis and Ureaplasma urealyticum in midtrimesteramniotic fluid: Associationwithamniotic fluid cytokinelevels and pregnancy out come. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4): 1382-6.

21. Digulio B, Romero R, Kusanovic J, Gómez R, Jai K. Prevalence and Diversity of Microbes in theAmniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and PregnancyOutcome in WomenwithPreterm Pre-Labor Rupture of Membranes. *Am J Reproduct Immunol* 2010; 64(1): 38-57.

22. Si Eun Lee, Romero R, Lee Seung Mi, Bo Hyun Yoon. Amniotic fluid volume in intra-amniotic inflammation with and without culture-provenamniotic fluid infection in preterm premature rupture of membranes. *J Perinat Med* 2010; 38: 39-44.

23. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S. fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(4): 238-45.

24. Edward R. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *ClinPerinatol* 2005; 32: 571-600.

25. Kacerovsky M, Drahosova M, Andrys, C, Hornychova H, Tambor V, Lenco J, Tosner J, et al. Amniotic fluid concentrations of soluble scavenger receptor for hemoglobin (SCD163) in pregnancy complicated by preterm premature rupture of the membranes and histologic chorioamnionitis. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2011; 24(8): 995-1001.

26. Yoon H, Romero R, Kim S, Park S, Jun K. A systemic fetal inflammatory response and the development of broncho pulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 773-9.

