

VALORACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL COMO MARCADOR PRECOZ DE ESTRÉS INTESTINAL Y SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA EN EL RECIÉN NACIDO PRETÉRMINO

Doctorando: Sandra Díaz Parra

Directores: Javier Blasco Alonso

Carlos Sierra Salinas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

Departamento de Farmacología y Pediatría

2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Sandra Díaz Parra

 <http://orcid.org/0000-0002-9084-1051>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA
Departamento de Farmacología y Pediatría

**VALORACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL
COMO MARCADOR PRECOZ DE ESTRÉS INTESTINAL Y SÍNDROME DE
RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA EN EL RECIÉN NACIDO
PRETÉRMINO**

TESIS DOCTORAL

Sandra Díaz Parra

2017

DIRECTORES

Javier Blasco Alonso

Carlos Sierra Salinas

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



El **Dr. D. Javier Blasco Alonso**, F.E.A. de la sección de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Infantil de la UGC de Pediatría del Hospital Regional Universitario de Málaga, y el **Dr. D. Carlos Sierra Salinas**, Jefe de Sección de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Infantil de la UGC de Pediatría del Hospital Regional Universitario de Málaga.

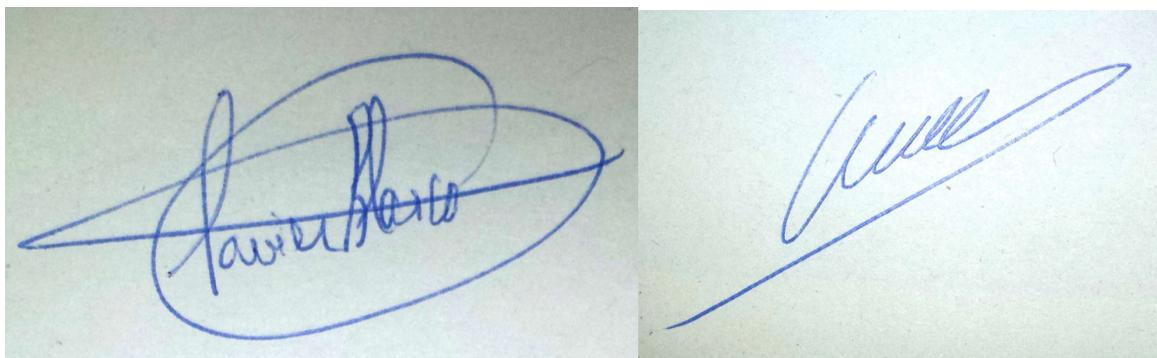
CERTIFICAN:

Que D^a. Sandra Díaz Parra ha realizado, bajo la dirección de ellos, una investigación sobre el tema “Valoración de la cinética de la calprotectina fecal como marcador precoz de estrés intestinal y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en el recién nacido pretérmino”, recogiendo personalmente el material necesario, efectuando el análisis de casos, la interpretación de resultados y la redacción de la memoria adjunta, que ha sido revisada por los que suscriben, quienes acuerdan que, en su opinión, es factible de ser presentada como Tesis Doctoral para ser defendida ante el Tribunal correspondiente, a lo que dan su conformidad.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente en Málaga.

J. Blasco Alonso

C. Sierra Salinas





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Doctoral, D. Carlos Sierra y J. Blasco Alonso, me gustaría agradecerles sus consejos, su dedicación y ayuda, así como la disponibilidad en todo momento y tiempo invertido.

Al equipo de Neonatología y Gastroenterología, tanto personal médico como enfermería, del Hospital Regional Universitario de Málaga, por iniciar este trabajo y colaborar en él durante todo su trayecto, con dedicación y esmero.

A mis padres, Sebastián y Victoria, por enseñarme a ser perseverante, y sacar lo mejor de mí. A mi hermana Cristina, por lo vivido juntas en el camino hasta llegar aquí, gracias.

A mi Juan, qué decirle, gracias por el día a día, por las risas entre tantos papeles, por el aliento en los momentos de agobio, por tu paciencia con mis locuras, por tu comprensión en todo momento, por hacerme sentir especial, por tantas cosas que no podría enumerar, por estar ahí siempre, te quiero.

A mi pequeña la que, antes de nacer, me dio la lección de nunca perder la ilusión, ella ha hecho la recta final mucho más fácil, sintiéndome bien en todo momento gracias a ese vínculo tan especial.

A mis compañeros y amigos, gracias por el apoyo recibido, y vuestras palabras de ánimo.

Para terminar, a Javi, por ser mucho más que el motor de este proyecto, gracias por ser un referente y apoyo durante todos estos años de formación, gracias por creer en mí y por tus palabras siempre de ánimo cuando más las he necesitado. Tu esfuerzo y entusiasmo me han hecho continuar y finalizar este trabajo con ilusión. Gracias.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	17
1. INTESTINO DELGADO	18
1.1. ANATOMÍA DEL INTESTINO DELGADO	18
1.1.1. SUPERFICIE ABSORTIVA	18
1.1.2. ESTRUCTURA EN CAPAS	19
1.2. FUNCION INTESTINAL	22
1.2.1. BARRERA INTESTINAL	23
2. PERMEABILIDAD INTESTINAL	27
2.1. DEFINICIÓN	27
2.2. MEDIDA	27
2.3. PERMEABILIDAD Y MADURACIÓN INTESTINAL	27
2.4. FACTORES POSTNATALES QUE INFLUYEN EN MADURACIÓN Y PERMEABILIDAD INTESTINAL	29
3. PREMATURIDAD. INCIDENCIA.	34
4. PREMATURO ENFERMO	36
4.1. ALTERACIONES DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL Y PATOLOGIA NEONATAL	36
4.2. SINDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA	38
4.3. SEPSIS NEONATAL	40
4.4. ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE.	43
4.4.1. DEFINICIÓN	43
4.4.2. EPIDEMIOLOGÍA	43
4.4.3. PATOGENIA	44
4.4.4. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO	49
4.4.5. TRATAMIENTO	51
4.4.6. PREVENCIÓN	53

5. CALPROTECTINA	53
5.1. DEFINICIÓN	53
5.2. FUNCIONES	54
5.3. MEDICIÓN	54
5.4. CALPROTECTINA FECAL	55
5.4.1. TEST ELISA	55
5.4.2. NIVELES NORMALES	56
5.4.3. INTERPRETACIÓN DE NIVELES DE CALPROTECTINA MEDIDOS EN HECES	57
5.4.4. UTILIDAD CLÍNICA ACTUAL	57
5.4.5. CALPROTECTINA FECAL EN UNA UNIDAD NEONATAL	58
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	60
1. HIPÓTESIS	61
2. OBJETIVOS	63
III. MATERIAL Y MÉTODOS	64
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	65
2. ÁMBITO DEL ESTUDIO	65
3. SUJETOS DEL ESTUDIO	65
3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	65
3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	66
3.3. TAMAÑO MUESTRAL	66
4. RECOGIDA DE DATOS Y SU ANÁLISIS	67
5. LIMITACIONES	69

IV. RESULTADOS.	71
1. EPIDEMIOLOGÍA DE NUESTRA SERIE	72
2. CALPROTECTINA EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO SANOS Y ENFERMOS, ASÍ COMO LA VALORACIÓN DE SU CINÉTICA.	77
3. CORRELACIÓN DE VARIABLES ESTUDIADAS CON CIFRAS DE CALPROTECTINA FECAL EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINOS SANOS	85
4. CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA CALPROTECTINA FECAL EN SEPSIS NOSOCOMIAL	90
5. CURVAS ROC	92
V. DISCUSIÓN.	93
1. EPIDEMIOLOGÍA	94
2. CIFRAS NORMALES MÁS ELEVADAS EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO RESPECTO A NIÑOS-ADULTOS.	95
3. CINÉTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL EN EL RECIÉN NACIDO PRETÉRMINO EN LOS PRIMEROS MESES DE VIDA	96
4. INFLUENCIA DE VARIABLES COMO EL TIPO DE PARTO, TIPO DE ALIMENTACIÓN PREDOMINANTE, EDAD GESTACIONAL O PESO AL NACIMIENTO.	98
5. CIFRAS DE CALPROTECTINA FECAL EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINOS ENFERMOS RESPECTO A SANOS.	102
6. DISTRÉS INTESTINAL Y ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE	104
7. SEPSIS NOSOCOMIAL	107
8. CALPROTECTINA FECAL: EFICACIA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA	110

VI. CONCLUSIONES	112
VII. BIBLIOGRAFÍA	115
VIII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	138
IX. ANEXO	140

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Vías de transporte a través del epitelio intestinal.
- Figura 2. Uniones de anclaje y comunicantes.
- Figura 3. Esquema de la función de la unión estrecha.
- Figura 4. Porcentaje de pretérminos nacidos vivos en 2004 y diferencias entre 2004 y 2010.
- Figura 5. Fisiopatología de la enterocolitis necrotizante: factores predisponentes.
- Figura 6. Fisiopatología de la enterocolitis necrotizante.
- Figura 7. Gráficos de barras de las edades gestacionales de los recién nacidos incluidos.
- Figura 8. Gráfico de barras con pesos al nacimiento agrupados en menores o mayores de 1500 g.
- Figura 9. Gráficos de barras de pesos al nacimiento según la edad gestacional sea menor o mayor de 30 semanas.
- Figura 10. Gráficos de barras de pesos al nacimiento según la edad gestacional sea menor o mayor de 28 semanas.
- Figura 11. Gráficos de barras de tipo de lactancia predominante en los primeros 30 días de vida.
- Figura 12. Valores de calprotectina en los diferentes días de extracción en RNPT sanos (A) y en RNPT enfermos (B).
- Figura 13 Correlación de cifras de CF y días de vida según publicación de Yoon et al 2014.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Factores neonatales y repercusión sobre la barrera defensiva intestinal y colonización bacteriana de recién nacidos prematuros.
- Tabla 2. Grupos de distribución según edad.
- Tabla 3. Variables clínicas y analíticas dependientes de la edad para definir el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
- Tabla 4. Tabla de frecuencias con el número de muestras válidas e inválidas para el estudio en cada momento de determinación.
- Tabla 5. Comparación de cifras de calprotectina entre RN pretérminos sanos y enfermos.
- Tabla 6. Número de muestras en cada día de análisis y principales parámetros estadísticos analíticos.
- Tabla 7. Estadísticos descriptivos de las calprotectinas en los diversos días diferenciando entre RNPT sanos y enfermos.
- Tabla 8. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT enfermos y en RNPT sanos.
- Tabla 9. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según tipo de parto.
- Tabla 10. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según tipo de lactancia predominante.
- Tabla 11. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según Corte de edad gestacional en 30 semanas.
- Tabla 12. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos corte de edad gestacional en 28 semanas.
- Tabla 13. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según el peso al nacimiento fuera mayor o menor de 1500 gramos.
- Tabla 14. RNPT con proceso de enfermedad más allá del día 4 y que tuvieran muestra de calprotectina en la fecha inmediatamente anterior. Días en que estaban enfermos y cifra de calprotectina.
- Tabla 15. Datos de la curva COR para calprotectina a los 4, 8, 15 y 30 días, representando el punto de corte, su sensibilidad y especificidad aportada.

ABREVIATURAS

AUC. Área bajo la curva

CF. Calprotectina fecal

DE. Desviación estándar

EG. Edad gestacional

EGB. Streptococcus agalactiae o del grupo B

EII. Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA. Enzyme-linked immunosorbent assay

FAP. Factor activador de plaquetas

GIT. Gastrointestinal

Ig A. Inmunoglobulina A

IGF-1. Insulin-like growth factor-1. Factor de crecimiento similar a la insulina

IL. Interleuquina

IN. Infección nosocomial

ITU. Infección del tracto urinario

NEC. Enterocolitis necrotizante

NICHD. Neonatal Research Network

PI. Permeabilidad intestinal

PUFAs. Polyunsaturated fatty acids. Ácidos grasos poliinsaturados

PCR. Proteína C Reactiva

PCT. Procalcitonina

RN. Recién nacido

RNAT. Recién nacido a término

RNMBP. Recién nacido de muy bajo peso

RNPT. Recién nacido pretérmino

SDR-I. Síndrome de distres respiratorio tipo 1

SRIS. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

TNF- α . Factor de necrosis tumoral-alpha

UCIN. Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I. INTRODUCCIÓN

1. INTESTINO DELGADO

1.1. ANATOMÍA DEL INTESTINO DELGADO

El intestino delgado es la parte del aparato digestivo que se extiende desde el esfínter pilórico del estómago hasta la válvula ileocecal que marca el comienzo del intestino grueso. Comprende 3 porciones dispuestas secuencialmente, denominadas duodeno, yeyuno e íleon. En el intestino delgado tiene lugar la función digestiva iniciada en el estómago y la absorción de los nutrientes a partir de los alimentos ingeridos.

1.1.1. SUPERFICIE ABSORTIVA

Existen diferentes grados de plegamiento que aumentan la superficie absortiva de la mucosa intestinal de forma exponencial. Los pliegues circulares o válvulas de Kerckring, las vellosidades intestinales, glándulas intestinales, las microvellosidades y el glucocálix.

VÁLVULAS DE KERCKRING

Pliegues circulares que afectan a la mucosa y submucosa, capas que conforman el intestino delgado. Se denominan válvulas conniventes o pliegues de Kerckring. Se encuentran a lo largo de todo el intestino delgado, a excepción de los 5-6 primeros cm del duodeno. Estos pliegues se encuentran especialmente bien desarrollados en el duodeno y en el yeyuno, donde a menudo sobresalen 1 cm hacia a luz intestinal. Aumentan unas 3 veces la superficie del intestino delgado (hasta $\approx 0.5-1 \text{ m}^2$).

VELLOSIDADES INTESTINALES

Sobre la totalidad del intestino delgado, existen millones de pequeñas proyecciones difitiformes de mucosa, denominadas vellosidades intestinales. Sobresalen 0,5-1,5 mm en la luz intestinal. Grandes y numerosas en el duodeno y en el yeyuno, y menores y menos abundantes en el íleon. Entre las vellosidades intestinales encontramos las criptas o glándulas de Lieberkühn, existiendo siempre continuidad entre el epitelio de las vellosidades y el de las

criptas. La presencia de dichas vellosidades hace que el área de absorción aumente entre 6-14 veces la superficie del intestino delgado (hasta $\approx 10 \text{ m}^2$).

MICROVELLOSIDADES INTESTINALES

Las células epiteliales, **enterocitos**, que conforman el epitelio de la mucosa de dichas vellosidades, en su cara luminal presentan, a su vez, múltiples evaginaciones conformando una ultraestructura característica de un epitelio absorbente, denominado **ribete en cepillo**. Se constituye por unas 3000 microvellosidades por célula, aumentando la superficie intestinal entre 20-35 veces (hasta $\approx 200 \text{ m}^2$).

GLICOCÁLIX

Y por último, asociados al dominio externo de la membrana de cada microvellosidad encontramos glucoproteínas y glicolípidos que conforman lo que se conoce como glicocáliz y que cumplen un importante papel funcional en las etapas finales del proceso digestivo (*Kierszenbaum AL et al 2008*).

En resumidas cuentas, esta caracterización especial de la **mucosa en pliegues, éstos en vellosidades, la membrana apical del enterocito en microvellosidades, y la de éstas en glicocáliz no posee otro fin que el de aumentar la superficie de absorción intestinal** hasta llegar a dimensiones próximas a los 200 m^2 (*García P et al 2000*).

1.1.2. ESTRUCTURA EN CAPAS

La pared intestinal está formada desde la luz intestinal hacia fuera por las capas siguientes: mucosa, submucosa, muscular y serosa:

CAPA MUCOSA

Está en contacto con los componentes alimenticios. La mucosa establece una barrera de protección (el epitelio) entre el exterior del organismo (la luz del tubo) y el resto de los tejidos. Además, la mucosa del tubo digestivo cumple con las funciones de absorción de los principios inmediatos resultado de la digestión y de secreción de productos (enzimas digestivas, moco, hormonas...).

La capa mucosa, desde la luz intestinal hacia fuera, está formada por **epitelio de**

revestimiento, lámina propia y muscular de la mucosa. Destacan dos accidentes fundamentales:

Vellosidades intestinales. Formadas por:

- **Epitelio cilíndrico simple** en su superficie.
- **Tejido conectivo laxo** en el centro (forma parte de la lámina propia) y un capilar linfático que se origina en un fondo de saco ciego: vaso quilífero central.

Criptas de Lieberkühn (glándulas intestinales): Son *invaginaciones* tubulares que se originan a la altura de la base de la vellosidades y que atraviesan toda la lámina propia hasta la muscular de la mucosa (**gl. simples tubulares**).

Describimos las distintas subcapas de la mucosa atendiendo a los tipos celulares:

a. **Epitelio de revestimiento:** El epitelio de revestimiento del intestino delgado es un **epitelio cilíndrico simple** en el que se distinguen los siguientes tipos celulares:

- **Enterocitos.** Son células cilíndricas-prismáticas altas con núcleo ovalado situado en los 2/3 inferiores de la célula.

Su membrana apical tiene gran cantidad de **microvellosidades** cubiertas por un **glicocáliz** grueso (con el M. O se ven como una zona irregular llamada chapa estriada o ribete en cepillo) sobre el que se deposita una capa de moco (secretado por las células caliciformes).

Las paredes laterales de la célula presentan los diversos elementos de los **complejos de unión** y abundantes **prolongaciones citoplasmáticas que se interdigitan** con las de las células vecinas.

La **función** de estas células es doble: **secretar** enzimas, que forman parte del glicocáliz y llevan a cabo la digestión terminal de los alimentos, y agua y electrolitos (esta función es propia de los enterocitos de las criptas de Lieberkühn); y **absorber** los líquidos y los productos de la digestión final.

Como las células del epitelio están unidas por uniones ocluyentes, el paso de los diversos productos desde la luz intestinal hasta los vasos de la lámina propia se hace a través de los enterocitos gracias a la existencia de sistemas de transporte activo específicos para los diversos productos.

- **Células caliciformes.** Son glándulas unicelulares secretoras de moco. Su cantidad aumenta desde el duodeno hasta el final del íleon.

- **Células endocrinas.** Son células que forman parte del **sistema endocrino difuso**. Se localizan entre los enterocitos y las células caliciformes, fundamentalmente en las bases de las vellosidades intestinales, aunque la mayoría de las células endocrinas intestinales están en las criptas de Lieberkühn. Sintetizan diversos tipos de hormonas (colecistoquinina, secretina, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo, motilina...).
- **Células M:** Son células epiteliales que se encuentran asociadas a las placas de Peyer. Se encargan de captar antígenos de la luz intestinal que introducen en la célula por medio de vesículas endocitóticas y son transportados hasta el espacio intercelular del epitelio donde se ponen en contacto con linfocitos que se encuentran allí.
- **Linfocitos:** la membrana epitelial orientada a la luz intestinal contiene numerosos linfocitos intraepiteliales, mecanismo de defensa contra la posible invasión por microorganismo patógenos.

Criptas de Lieberkühn. Las células que forman la pared de la cripta de Lieberkühn son continuación de las del epitelio de revestimiento de la vellosidad: La mitad superior de la pared de la cripta está compuesta de **enterocitos** y de **células caliciformes**; la mitad inferior de la pared de la cripta está formada por **células endocrinas** y por dos tipos de células que no aparecen en el epitelio de revestimiento:

- **Células de Paneth.** se localizan en la zona basal de la cripta con forma piramidal. Tienen un papel en el control de la flora bacteriana intestinal ya que el producto de secreción principal es una enzima bacteriolítica llamada lisozima. Además tienen capacidad de fagocitar bacterias.
- **Células madre.** Son la mayor parte de las células de la pared de en la mitad inferior de la cripta. Son células cilíndricas bajas indiferenciadas. Conservan la capacidad de proliferar y son las responsables de la renovación del epitelio: el epitelio se renueva cada 5-6 días. Se diferencian y se transforman en el resto de los tipos celulares.

- b. **Lámina propia:** Es un **tejido conectivo laxo** que encontramos en el centro de las vellosidades intestinales y rodeando a las criptas de Lieberkühn. En la lámina propia se

encuentran abundantes vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos, alguna fibra muscular lisa y células del sistema inmunitario. La cantidad de tejido linfoide aumenta en dirección al íleon, pudiendo invadir la submucosa, donde encontraremos auténticos agregados linfoides que constituyen las denominadas **placas de Peyer** (grandes conglomerados de nódulos linfoides y tejido linfoide difuso).

- c. **Muscular de la mucosa:** Está formada por dos capas delgadas, una circular interna y otra longitudinal externa, de fibras musculares lisas. Algunas fibras musculares lisas de la muscular de la mucosa se extienden hasta la lámina propia de las vellosidades intestinales.

CAPA SUBMUCOSA

Está formada por un tejido conjuntivo laxo en el que se encuentran los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. Las denominadas glándulas de Brunner se encuentran en esta capa, a lo largo del duodeno, y su función es secretar mucus protector para su adhesión a la capa mucosa.

CAPA MUSCULAR

Consiste en una fina banda de tejido muscular liso longitudinal externa y otra gruesa circular e interna. Tiene por función realizar los movimientos de segmentación y peristaltismo responsables de que el contenido del intestino se mezcle y avance a lo largo del mismo.

CAPA SEROSA

Constituida por el peritoneo visceral. Su función no es otra que recubrir la superficie de la pared intestinal.

1.2. FUNCION INTESTINAL

La función del intestino delgado es la **digestión y absorción** de nutrientes potencialmente beneficiosos, pero al mismo tiempo debe **restringir el acceso de sustancias nocivas** al organismo. Hemos de tener en cuenta que el tracto gastrointestinal, debido a los pliegues y vellosidades del intestino delgado, constituye la mayor superficie de interacción

entre el hombre y el medio ambiente, entre el medio interno y el medio externo, por lo que es necesario que exista una **barrera intestinal intacta** que actúe de forma selectiva, compuesta por diferentes elementos.

1.2.1. BARRERA INTESTINAL

La barrera intestinal está formada por constituyentes no inmunológicos: peristaltismo, ácido gástrico, enzimas digestivas, mucus, microflora entérica y el epitelio intestinal, y constituyentes inmunológicos: tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y el sistema inmune. Dichos constituyentes se desarrollan a continuación (*Martin CR et al 2012*).

DEFENSA NO ESPECÍFICA

Constituida por enzimas digestivas, movimiento peristáltico, Inmunoglobulina A (Ig A) producida por las células plasmáticas de la lámina propia, y un componente importante como el moco intestinal constituido por agua, electrolitos, mucina, inmunoglobulinas (Ig A) glicolípidos y albúmina (*Neu J et al 2003*). El moco intestinal genera una capa protectora que atrapa bacterias impidiendo su contacto directo con las células epiteliales y favoreciendo su eliminación. La mucina es su componente principal generado por las células caliciformes, dicha producción se ve incrementada por hormonas, mediadores inflamatorios y factores derivados de microbios (*Dharmani et al 2009*).

INTERACCIONES CÉLULA-ANTÍGENO: Inmunidad Innata de la mucosa intestinal. péptidos antimicrobianos generados por células de Paneth y otras células del intestino en respuesta a antígenos patógenos.

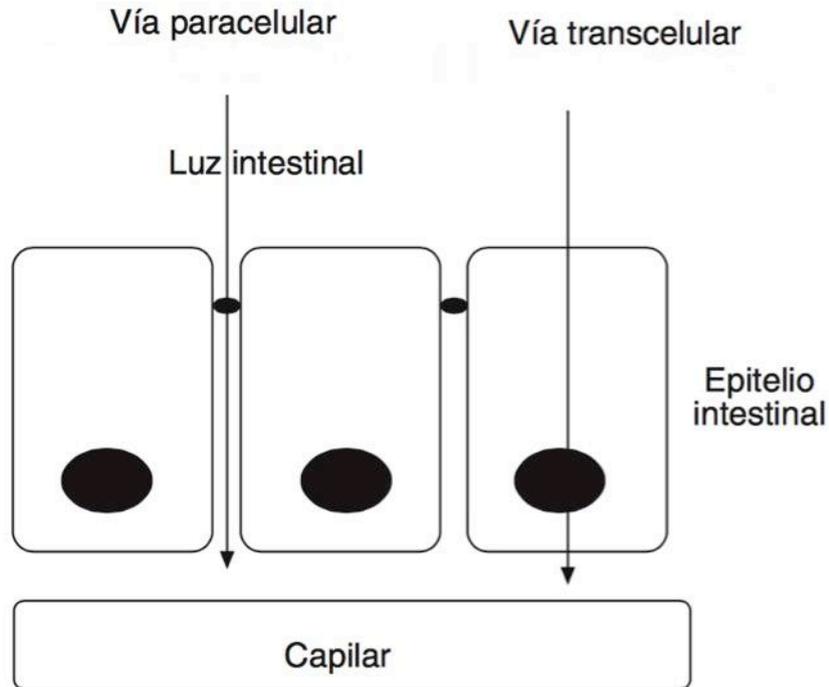
INTERACCIÓN CÉLULA-CÉLULA:

Existen dos tipos de mecanismo de transporte que regulan el paso de sustancias a través de la membrana epitelial: paracelular y transcelular (*Groschwitz et al 2009*) (Figura 1).

El movimiento electrolítico a **través de las células epiteliales** se denomina **transporte transcelular**, activo o pasivo. El enterocito capta la molécula por endocitosis con posterior salida hacia la serosa.

Mientras que el movimiento electrolítico **a través de la unión estrecha** se denomina **transporte paracelular**, siempre pasivo, siendo éste en el que nos centraremos.

Figura 1. Vías de transporte a través del epitelio intestinal.



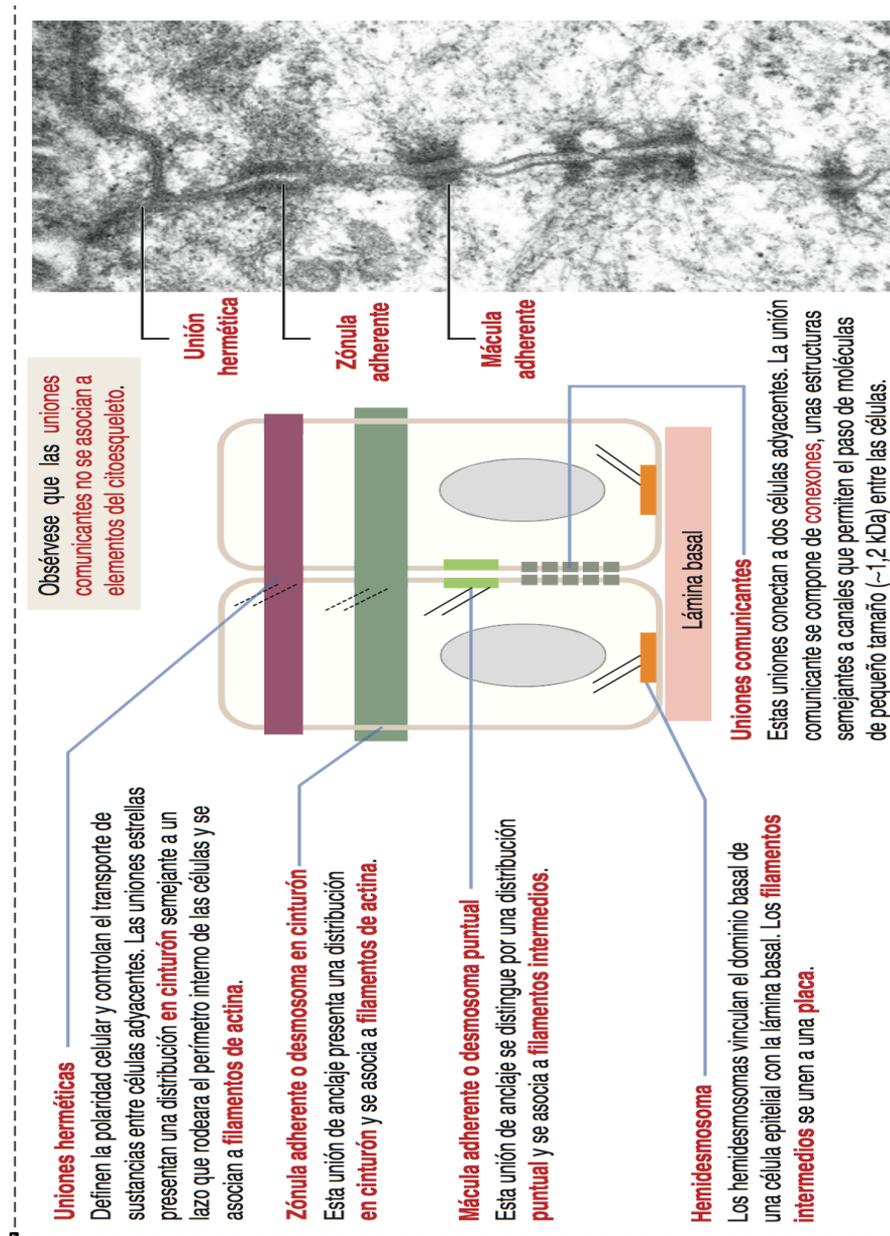
Las células epiteliales están unidas entre sí a través de complejos de unión, localizados en la membrana lateral de las células. Estos complejos de unión son “policías” del intestino, impidiendo el paso de macromoléculas y permitiendo el de fluidos, electrolitos y péptidos pequeños.

Los complejos de unión son de arriba abajo (Figura 2):

- Unión estrecha o zona ocludens.
- Unión intermedia o zona adherens.
- Desmosomas.

Figura 2. Uniones de anclaje y comunicantes

(Tomado de Kierszenbaum AL et al 2012).



Unión estrecha o zona ocludens, representa la principal barrera dentro del transporte paracelular, responsable del desarrollo del **“intestino permeable”** y cuya alteración se ha visto que juega un papel primordial en el desarrollo de la patología neonatal y enfermedades pediátricas.

- **UNIÓN ESTRECHA O ZONA OCLUDENS:**

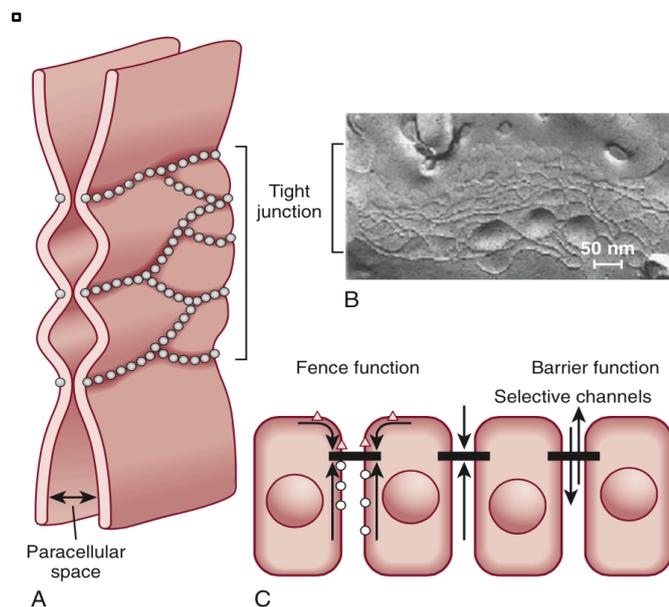
Se le atribuye la función de barrera regulando el **paso selectivo** de partículas y solutos a través del espacio intercelular, así como el mantenimiento de la **polaridad** celular diferenciando las membranas apical y lateral de la célula.

Está constituida por proteínas integrales o “porteros” que modulan la permeabilidad, por proteínas que anclan el complejo al citoesqueleto y proteínas citosólicas y nucleares que regulan la transcripción. Este grado de complejidad se correlaciona con la función de barrera.

La unión estrecha es una estructura **DINÁMICA**, tiene la propiedad de ajustarse a las demandas fisiológicas o patológicas, a través de su grado de fosforilación, modificando la contracción y apertura de las uniones con los consiguientes cambios de permeabilidad.

Figura 3: Esquema de la función de la unión estrecha.

(Tomado de: Sawada et al 2003)



2. PERMEABILIDAD INTESTINAL

2.1. DEFINICION

La integridad de la barrera intestinal puede ser estimada a través de la investigación de la permeabilidad intestinal.

La permeabilidad se puede definir como el flujo de un soluto a través de una unidad de área de membrana en un tiempo dado (*Lifschitz et al 1990*). No es sinónimo de absorción, en la que ocurre el flujo de un soluto en un tiempo dado, sin relación con el área de membrana. También puede afirmarse que la PI es la facilidad por la que la superficie la mucosa intestinal puede ser penetrada por constituyentes específicos en un tiempo determinado. No obstante el concepto más apropiado corresponde a la **propiedad que presenta la mucosa digestiva para modificar la penetración de un soluto a través de la pared intestinal, especialmente en relación a las moléculas hidrosolubles no sujetas a una absorción activa o facilitada** (*Beach RC et al 1985*).

2.2. MEDIDA

La medición directa de la PI es difícil, pero se puede medir indirectamente a través de la ratio disacárido (vía paracelular) / monosacárido (vía transcelular) en orina tras la ingestión oral [Lactulosa/manitol]. En el intestino enfermo en el que se altera la función de barrera, la permeabilidad a la lactulosa puede verse incrementada y la del manitol disminuida, resultando en un incremento de dicha ratio.

2.3. PERMEABILIDAD Y MADURACIÓN INTESTINAL

La maduración intestinal es un proceso dinámico y continuo desde la etapa fetal hasta la niñez (*Wagner et al 2008*).

Un dato a destacar es que el intestino dobla su longitud en el último trimestre del embarazo, nutriéndose a través de la placenta pero también por el líquido amniótico. De

hecho el 15% de la nutrición es proporcionada por proteínas, carbohidratos, lípidos y electrolitos procedentes de líquido amniótico (*Wagner CL et al 2004*).

El líquido amniótico además contiene factores de crecimiento, y factores inmunomoduladores para el crecimiento del feto, y específicamente del intestino fetal.

La madurez intestinal puede ser medida a través de la permeabilidad intestinal de forma inversa.

Un intestino inmaduro como el del recién nacido, más aún en el prematuro, presenta una elevada permeabilidad intestinal que disminuirá progresivamente a lo largo de las primeras semanas de vida según se produzcan los cambios madurativos propios de dicho periodo.

Esto fue ya descrito por Beach et al en 1982, cuando demostró un estado de **hiperpermeabilidad intestinal** en el periodo neonatal inmediato en recién nacidos pretérminos (RNPT) sanos, resultado de una inmadurez intestinal fisiológica, describiendo ya entonces que dicho proceso de disminución de la PI en las primeras semanas de vida era menos acentuado en recién nacidos con un “trauma neonatal” como sepsis o asfixia.

La permeabilidad intestinal no está relacionada con la edad gestacional o peso al nacimiento, pero es más alta durante los 2 primeros días tras el nacimiento que posteriormente. Siendo solo en ese periodo donde los niveles medidos en el RNPT son más altos que en el recién nacido a término (RNAT), hecho que sugiere la rápida adaptación postnatal del intestino del prematuro (*Van Elburg RM et al 2003*). El aumento de permeabilidad en el recién nacido puede ser debido estructuralmente a una expresión incompleta de las proteínas de unión que conforman la unión estrecha (*Kelly D et al 2000; Teitelbaum JE et al 2005*).

La mayor permeabilidad se produce de forma fisiológica con el fin de permitir el transporte de macromoléculas y favorecer el desarrollo del sistema de tolerancia inmunológica, pero a su vez tiene como inconveniente el aumento de penetración de agentes infecciosos que pueden favorecer tanto la infección, la inflamación y la hipersensibilidad sistémica.

El “cierre intestinal” (GUT CLOSURE), referente a la absorción de macromoléculas, está determinado por factores dietéticos, hormonales y probablemente programados genéticamente. Un intestino maduro se considera un intestino “closed” con uniones estrechas bien formadas y disminución de la permeabilidad, permitiendo una absorción selectiva (*Taylor SN 2013*).

El momento del cierre intestinal, se sugiere entre 24 horas y semanas tras el nacimiento, consecuencia de la rápida adaptación intestinal a las circunstancias extrauterinas, siendo la principal la alimentación, no otros factores como el sexo, peso al nacer o edad gestacional, aunque es cuestionado (*Van Elburg et al 2003*).

2.4. FACTORES POSTNATALES QUE INFLUYEN EN MADURACIÓN INTESTINAL Y PERMEABILIDAD INTESTINAL

Postnatalmente distintos factores son los que influyen en el proceso de adaptación intestinal a las circunstancias de la vida extrauterina (*Van Elburg 2003, Taylor SN 2013, Westerbeek et al 2013*).

NUTRICIÓN

Características nutrición enteral

La alimentación enteral es definida como una fase crucial tras el nacimiento en el proceso de maduración intestinal modulando el aumento de masa intestinal (*Shulman RJ et al 1998; Rouwe EV et al 2002*).

Situaciones como la intolerancia de la alimentación enteral o el temor al desarrollo de enterocolitis necrotizante (NEC), alargan en el tiempo la situación de “inanición intestinal”.

En las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), la privación de la nutrición enteral, a expensas de nutrición parenteral prolongada, se ha asociado con cambios en la estructura y función del intestino. De forma que el retraso en la alimentación enteral en los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento produce una alteración de la barrera mucosa que puede predisponer a la translocación bacteriana, y aumenta el riesgo de patología relacionada con atrofia intestinal (*Kudsk KA 2002, King C 2005*). Ha sido demostrado el beneficio de la alimentación trófica en los prematuros de riesgo, la cual ha reducido el ratio de sepsis pudiendo ser debido a la reducción de dicha translocación bacteriana (*McClure et al 2002*). Pequeñas cantidades, como un promedio de 24 ml, en los primeros días tras el nacimiento se ha correlacionado con un aumento significativo de los niveles plasmáticos de enteroglucagón, hormona que promueve el trofismo del intestino delgado (*King C 2005*).

Recientes estudios realizados respaldan que la alimentación temprana no se asocia a daño, es más, la asocian con una disminución del tiempo en alcanzar la nutrición enteral

total, con una mejoría de la tolerancia alimentaria y una disminución en el tiempo de estancia hospitalaria (*Simmer K et al 2007; Ronnestad A et al 2005; Morgan J et al 2014; Tyson JE et al 2005*).

Shulman y colaboradores en 1998 demuestran que la alimentación enteral temprana en recién nacidos pretérmino se ha asociado a una reducción de la permeabilidad intestinal a los 10 días de vida, mientras que la alimentación con lactancia materna (vs fórmula) fue asociada con una disminución de la permeabilidad a los 28 días de vida, sin efecto alguna sobre la misma la alimentación continua vs en bolo.

Sin embargo, trabajos recientes como Colomé G 2007, demuestran que no influye el tipo de alimentación en la permeabilidad intestinal de los recién nacidos pretérmino a los 30 días de vida.

Aún así el papel protector de la lactancia materna en el desarrollo intestinal esta claramente definido. Es indiscutible el excelente valor nutricional de la lactancia materna, la cual ofrece múltiples beneficios en relación a la absorción y metabolismo, favorece un desarrollo adecuado de la microbiota intestinal, promueve la maduración intestinal, disminuye el riesgo de infecciones y procesos alérgicos, e influye de forma positiva en el desarrollo cerebral y de otros órganos (*Kramer MS et al 2004*).

Glutamina:

Recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento, y aquellos gravemente enfermos, se han visto con frecuencia privados de glutamina, un aminoácido esencial, con funciones conocidas en el mantenimiento de la mucosa, modulación de la inflamación y el metabolismo energético. Además mejora la función de la barrera intestinal debido a su implicación en la síntesis de los aminoácidos necesarios para conformar las uniones estrechas.

Dos ensayos clínicos controlados y aleatorizados evalúan el efecto de la suplementación con glutamina en la permeabilidad intestinal en el recién nacido pretérmino. En ambos se suplementó vía oral diariamente desde el día 3-30 versus placebo. Van del Berg A et al 2006, no encontró efecto en la disminución de PI, con un factor de confusión que fue la alta ingesta de lactancia materna en ambos grupos, aunque ellos, a diferencia de otros estudios previos, no objetivan una menor permeabilidad con un consumo mayor de leche materna. Quizás la suplementación con glutamina disminuye la permeabilidad intestinal en prematuros alimentados con fórmula y, debido a la alta ingesta de lactancia materna en ambos grupos, no encontraron diferencias significativas. Sevastiadou S y col. en 2011, por el contrario objetivan una disminución de la PI en el grupo suplementado respecto al control a

los días 7 y 30. Demostrando además menor tasa de NEC y septicemia en grupo suplementado. Por lo tanto, mantienen que la glutamina (de la leche humana o suplementada en fórmula artificial) juega un papel importante en la madurez intestinal (*Taylor SN 2013*).

Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)

Estudios evalúan el efecto del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), factor de crecimiento presente en líquido amniótico y leche humana, como factor que interviene en el desarrollo y maduración intestinal. No pudiendo concluir su efecto como promotor del crecimiento por sí solo, pero si ejerciendo probablemente un papel de sinergia, junto a otros factores de crecimiento y hormonas de la leche materna (*Corpeleijn WE et al 2008*).

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Los PUFAs, además de formar parte de la membrana celular, influyen en la maduración intestinal mejorando su diferenciación, reduciendo la permeabilidad transcelular y pueden también mejorar la formación de uniones estrechas (*Yamagata et al 2003*).

La fracción lipídica de la leche humana (3-5%) contiene un 13-15%, siendo el balance n3-n6 LC PUFAs el óptimo.

MICROBIOTA INTESTINAL

Aproximadamente 100 billones de organismos comprenden típicamente la microbiota intestinal, mas del 99% son anaerobios. Es de destacar, que la microbiota de cada individuo solo supone el 15% de las más de 1000 especies de bacterias intestinales descritas, lo que se traduce en una amplia variabilidad interindividual (*Putignani L et al 2014*).

El dogma de un medio estéril intrauterino se ha visto cuestionado recientemente al encontrarse bacterias en las membranas placentarias (*Aagaard et al 2014, Steel et al 2005*), líquido amniótico y cordón umbilical (*Jimenez et al 2005*), así como en meconio (*Ardissone et al 2014*) de recién nacido a término sanos.

A pesar de ello, la mayoría de publicaciones coinciden en que los niños nacidos vía vaginal tienen una colonización intestinal reflejo de la flora vaginal materna tal como especies de *Lactobacillus* and *Prevotella*, sin embargo los nacidos por cesárea se colonizan inicialmente por bacterias procedentes de la piel de la madre tal como *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Propionobacterium*, and *Corynebacterium*, con una deficiencia de anaerobios con menor número de *Bacterioides* y *bifidobacterium* comparado con los de parto vaginal. Además de una menor diversidad de especies presentan una colonización retrasada de especies como *bifidobacterium*, *lactobacillus* y *bacterioides*, Por tanto el modo de parto influye tanto en la diversidad como función de la microbiota pudiendo persistir durante meses, o quizás más tiempo tras el nacimiento. (*Madan JC et al 2012, Di Mauro et al 2013; Biasucci G et al 2010, Jakobsson HE et al 2014*)

Diferentes factores influyen en que los recién nacidos prematuros, particularmente los de muy bajo peso al nacimiento, no desarrollen una microbiota adecuada, como son la propia inmadurez intestinal, la ruptura prematura de membranas, infecciones maternas, incremento de incidencia de parto por cesárea, uso de antibióticos de amplio espectro perinatal y postnatalmente, alteración de la motilidad intestinal, disminución de la exposición a leche materna.... (*Stewart CF et al 2013, Groer MW et al 2014*) Por tanto la colonización bacteriana en el recién nacido pretérmino, independientemente del tipo de parto, se produce por un número bajo de especies bacterianas, con mayor frecuencia enterobacterias y persisten largos periodos en la flora fecal de estos niños, siendo el establecimiento de la flora anaerobia, en especial las bifidobacterias, más tardío (*Moreno JM 2006; Westerbeek EA et al 2006*).

La interacción entre epitelio intestinal y los microorganismos entéricos implica una compleja y dinámica “cross-talk”. Las bacterias enteropatógenas pueden alterar las uniones estrechas de la barrera intestinal a través de distintos factores de virulencia. Para evitar una respuesta inflamatoria desbalanceada en el tracto gastrointestinal es fundamental mantener una microbiota comensal que evite la colonización por microorganismos patógenos. Las bacterias comensales tienen funciones metabólicas que se traducen en la recuperación de energía y nutrientes, entre ellos los ácidos grasos de cadena larga; además de la función defensiva ya comentada impidiendo la implantación de bacterias enteropatógenas, así como el sobrecrecimiento de bacterias oportunistas. Fortalecen la barrera debido a la capacidad de ciertas bacterias para segregar sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) que inhiben la proliferación de otras bacterias (*Duffy LC 2000*). La microbiota intestinal influye en el desarrollo del sistema inmune, en las respuestas celular y humoral. En edades muy tempranas, ante la exposición a las bacterias intestinales y a otros patógenos, la respuesta predominante

en el recién nacido Th 2 cambia a una respuesta Th1 por la inducción de Il 2 (*Dimmitt et al 2010*).

El recién nacido, especialmente el recién nacido pretérmino, tiene un sistema inmune aún por desarrollar, presenta un inadecuado “cross-talk” epitelio-bacteria y un mayor riesgo de desarrollar infecciones (*Forchielli ML et al 2005*).

ESTRÉS DEL PREMATURO ENFERMO

En el paciente críticamente enfermo, la permeabilidad intestinal se ha relacionado de forma estrecha con la isquemia de la mucosa intestinal. (*Pastores SM et al 1996*). El incremento de permeabilidad intestinal se produce consecuencia del estrés oxidativo, con la producción de óxido nítrico, liberación de citoquinas proinflamatorias, reducción del ph de la mucosa y la hipoxia. Potentes agentes oxidantes dañan el ADN celular y promueven la peroxidación de lípidos de membrana y la disregulación de la expresión de varias proteínas clave en las uniones estrechas.

La situación de estrés incluye una serie de relaciones entre las defensas del huésped y el agente agresor. La inflamación consta de una fase humoral y otra celular, asociadas a cambios en la permeabilidad del sistema circulatorio para marginar o dirigir la migración de las células circulantes. Las proteínas del grupo de las selectinas de los linfocitos, neutrófilos y monocitos, y las del endotelio son las responsables de acumular linfocitos en el punto inflamado, que a su vez colaboran con las moléculas de adhesión y las series de inmunoglobulinas. Otras sustancias como el NO, los metabolitos del AA y los radicales libre de oxígeno generados *in situ*, modulan y dirigen la adhesión, migración y activación leucocitarias.

El recién nacido enfermo se somete a múltiples situaciones vinculadas con un exceso de producción de radicales libres oxidativos, como son la restricción en la alimentación enteral, la isquemia de la mucosa intestinal, el shock hemorrágico, o el síndrome de repuesta inflamatoria sistémica.

Otros factores también se han relacionado con la función de barrera intestinal, tal como el ph de arteria umbilical bajo al nacimiento (*Van Elburg et al 2003*) y la exposición a corticoides prenatales, mejorando éstos la permeabilidad medida al mes de vida.

CITOQUINAS

Citoquinas, y quimiocinas son factores solubles que median la respuesta inflamatoria estimulando linfocitos y otras células del sistema inmune. Ha sido evaluado el papel de varias citoquinas en el trofismo y maduración del intestino (*Maheshwari A 2004*). La alteración en sus niveles juega un papel importante en la pérdida de la función de la barrera intestinal. De hecho, muchos de los factores presentados previamente que alteran la estructura y función de barrera, lo hacen a través de la activación de citoquinas y quimiocinas.

3. PREMATURIDAD. INCIDENCIA.

Se estima que cada año nacen unos 15 millones de niños prematuros. La prematuridad es la primera causa de morbilidad neonatal e infantil, y constituye uno de los problemas de salud más importantes de la sociedad. Las complicaciones relacionadas con la prematuridad, principal causa de defunción en los niños menores de 5 años, provocaron en 2013 cerca de un millón de muertes.

Tres cuartas partes de esas muertes podrían evitarse con intervenciones actuales, eficaces y poco onerosas, incluso sin necesidad de recurrir a servicios de cuidados intensivos.

En los 184 países estudiados, la tasa de nacimientos prematuros oscila entre el 5% de países europeos y el 18% de algunos países africanos. La OMS acaba de publicar una serie de nuevas directrices con recomendaciones para mejorar los resultados obstétricos en casos de prematuridad. Se trata de un conjunto de intervenciones clave que pueden mejorar las posibilidades de supervivencia y los resultados sanitarios en los neonatos prematuros (*disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/es/>*).

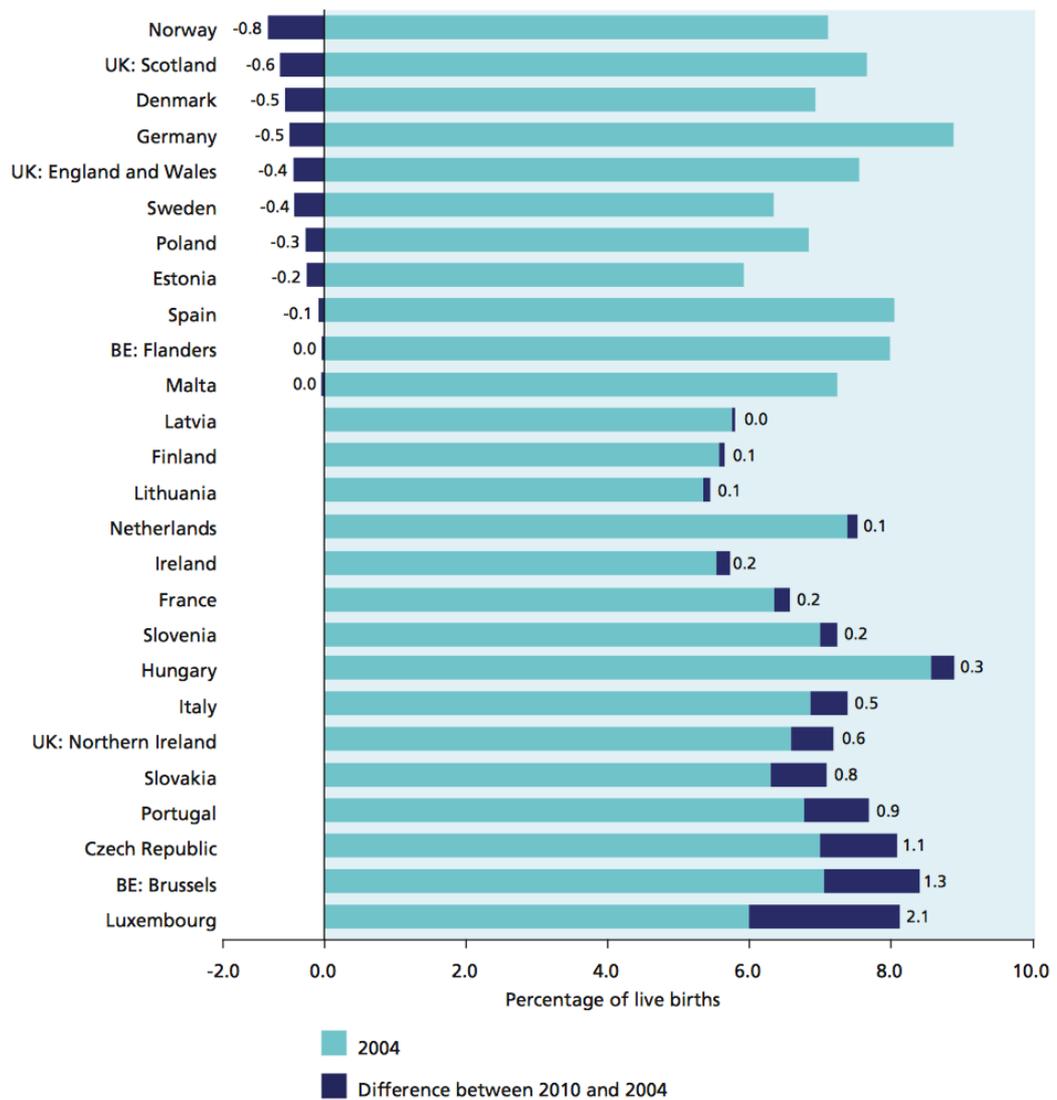
Muchos países han registrado un incremento en las tasas de nacimientos pretérminos en las últimas 2 décadas (1990-2010), y esta tendencia ha sido confirmada por encuesta mundial de la Organización Mundial de la salud (OMS), situándose las tasas de prematuridad en el 10%, aunque en Estados Unidos alcanza hasta el 10,6%-12,8% (*Blencowe H et al 2012*).

Sin embargo el análisis que realiza el grupo EURO-PERISTAT entre 1996 y 2008 (*Zeitlin J et al 2013*) y posteriormente en 2010, con un índice de nacimientos prematuros en Europa que varía del 5 al 10% muestra una tendencia temporal más heterogénea con países en los cuales incluso desciende el número de nacimientos pretérmino, tal como muestra la figura

4.

En España desde 1996 con un índice de nacimientos pretérminos vivos del 7,1% pasó a ser en 2008 del 8,2%, para descender a 7,9% en 2010. Siendo los últimos datos de los que disponemos de 7,56% en el año 2015. (*Disponible en <http://inclasns.msssi.es/main.html#multipleBar-71752>*).

Figura 4. Porcentaje de pretérminos nacidos vivos en 2004 y diferencias entre 2004 y 2010. Euro-Peristat project with SCPE and Eurocat. *European Perinatal Health Report. The health and care of pregnant women and babies in Europe in 2010.* May 2013



4. PREMATURO ENFERMO

4.1. ALTERACIONES DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL Y PATOLOGÍA NEONATAL

Patología del **intestino inmaduro**, como la enterocolitis necrotizante (ECN), ha sido relacionada con las alteraciones en la barrera intestinal.

El recién nacido prematuro se enfrenta a potenciales amenazas capaces de alterar el desarrollo de la barrera intestinal e inmunidad (Tabla 1).

Una alteración en el desarrollo gastrointestinal o alteración de cualquiera de los componentes que constituyen la barrera intestinal, puede generar una estimulación patológica del sistema inmune generando un desequilibrio entre tolerancia inmune y respuesta inflamatoria. En el prematuro, son **el aumento de la permeabilidad intestinal** junto a la **colonización bacteriana anómala** y la **inmadurez del sistema inmune** los que favorecen dicha disregulación del sistema inmune, implicada en procesos tales como la translocación bacteriana (permitiendo la adherencia de organismos patógenos al epitelio intestinal), desarrollo de sepsis y fallo multiorgánico entre otros. (*Dai D 1999; Duffy LC 2000*).

Los principales mecanismos afectados en la TB son: alteración en la microflora gastrointestinal normal que condiciona sobrecrecimiento bacteriano; disrupción física de la barrera mucosa intestinal por lesión directa de los enterocitos (radiación o toxinas) o por un reducido flujo sanguíneo intestinal; alteraciones de las defensas del huésped.

Existen múltiples vías por las que un organismo se puede traslocar fuera del intestino a localizaciones extra-intestinales: migración retrógrada a los pulmones, migración transmural directa a través de la barrera intestinal, migración a través de las placas de Peyer, de los nódulos linfáticos mesentéricos, del conducto torácico y de la circulación sistémica o vía los canales vasculares hasta alcanzar el sistema porta.

Tabla 1: Factores neonatales y repercusión sobre la barrera defensiva intestinal y colonización bacteriana en recién nacidos prematuros.

(Tomado de: Martin CR et al 2006)

	Factor	Consecuencia
Defensa inespecífica	Prematuridad	<ul style="list-style-type: none"> • Nivel disminuido de inmunoglobulinas • Menor producción de enzimas digestivas • Menor producción de moco • Menor peristalsis
	Retraso de la alimentación enteral	<ul style="list-style-type: none"> • Atrofia vellositaria: <ul style="list-style-type: none"> ○ Menor producción de enzimas digestivas ○ Menor producción de moco ○ Menor peristalsis
	Medicación	
	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonistas de los receptores H2 de la histamina • Vasopresores • Sedantes y relajantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Acidez gástrica disminuida • Mayor riesgo de isquemia intestinal y lesión del enterocito • Menor peristalsis
Colonización bacteriana	Prematuridad	<ul style="list-style-type: none"> • Acusada respuesta inflamatoria • Patrón de glicosilación anormal
	Retraso de alimentación enteral	<ul style="list-style-type: none"> • Colonización bacteriana tardía
	Antibióticos de amplio espectro	<ul style="list-style-type: none"> • Prolongada esterilización intestinal • Reemplazo de flora intestinal comensal por flora patógena
	Alimentación con fórmula y hospitalización	<ul style="list-style-type: none"> • Colonización bacteriana patógena

4.2. SINDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA

El término sepsis implica una respuesta clínica que deriva de una infección. Una respuesta similar o idéntica puede ocurrir en ausencia de infección. Se propuso el término síndrome de respuesta inflamatoria sistémica para describir este proceso inflamatorio independientemente de su causa. Durante un tiempo los términos infección, sepsis, síndrome séptico, disfunción multiorgánica, fueron empleados de forma indistinta. Por lo que fue necesaria una unificación de las definiciones empleadas (*Bone 1992*).

Se define síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) como el conjunto de **fenómenos clínicos y fisiológicos que resultan de la activación general del sistema inmune, con independencia de la causa que lo origine**. SRIS se considera la expresión sistémica incontrolada de citoquinas proinflamatorias.

Este término fue introducido en la conferencia de consenso de la Society of Critical Care Medicine (SCCM) y el American College of Chest Physicians (ACCP) de 1992. Siendo revisado posteriormente en varias ocasiones, siendo en la conferencia consenso internacional de sepsis pediátrica de 2002 (*Goldstein B et al 2005*), donde se aborda el aspecto de los distintos grupos de edad pediátrica.

Las variables clínicas y de laboratorio usadas para definir SRIS y disfunción orgánica varían ampliamente en función de los grupos de edad (tabla 2 y 3).

Definiciones adaptadas a los mismos son las siguientes:

Definición SRIS:

Presencia de al menos dos de los siguientes 4 criterios, uno de los cuales debe ser la temperatura o cifra de leucocitos alterada:

- Temperatura central $>38.5^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$.
- Taquicardia, definida como >2 Desviación estándar (DE) sobre el valor normal para edad en ausencia de estímulo externo, fármacos o estímulo doloroso; o por el contrario una elevación persistente inexplicada durante un periodo de 0,5-4h. En niños <1 año: bradicardia, definida como una frecuencia cardiaca media $>$ al Percentil 10 para la edad en ausencia de estímulo vagal externo, betabloqueantes,

enfermedad cardiaca congénita; o una depresión mantenida e inexplicada durante 0,5h.

-Frecuencia respiratoria >2DE sobre lo normal para la edad o ventilación mecánica por proceso agudo no relacionado con enfermedad neuromuscular, o anestesia general.

-Recuento elevado o disminuido de leucocitos según edad o >10% de neutrófilos inmaduros.

Tabla 2. Grupos de distribución según edad

Grupo de edad	Edad
Recién nacido	0-7 días
Neonato	7 días- 1 mes
Lactante	1 mes- 1 año
Preescolar	2-5 años
Escolar	6-12 años
Adolescente	13-18 años

Tabla 3. Variables clínicas y analíticas dependientes de la edad para definir el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

Grupo de edad	Taquicardia (lpm)	Bradicardia (lpm)	Taquipnea (rpm)	Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	TAS (mmHg)
Recién nacido	>180	<100	>50	>34	<65
Neonato	>180	<100	>40	>19.5 o <5	<75
Lactante	>180	<90	>34	>17.5 o <5	<100
Preescolar	>140	NA	>22	>15.5 o <6	<94
Escolar	>130	NA	>18	>13.5 o <4.5	<105
Adolescente	>110	NA	>14	>11 o <4.5	<117

NA: no aplicable; TAS: tensión arterial sistólica

Sin embargo, el consenso excluye de manera explícita a los prematuros, dado que su atención tiene lugar en unidades de cuidados intensivos neonatales y la conferencia se discutió desde la perspectiva de unidades pediátricas de cuidados intensivos. Por tanto, es necesario llegar a un consenso sobre las definiciones de SRIS y sepsis en las unidades neonatales y por supuesto incluir en ellas a los niños prematuros (*López JB et al 2006*). Y, para ello, es necesario tipificar cuáles son los síntomas clínicos que mejor definan el SRIS neonatal y determinar cuáles son los valores de hemograma, proteína C reactiva (PCR), procalcitonina (PCT) e interleuquina que de forma aislada o en combinaciones diversas definan con precisión la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica (*Escobar GJ 2005*).

Hemos de señalar que en el grupo de recién nacidos pretérmino ingresados en unidades de cuidados intensivos neonatales con SIRS, presentan una permeabilidad intestinal anormalmente alta durante su enfermedad y un retraso en su normalización respecto a pacientes sanos (*Doig CJ et al 1998*).

4.3. SEPSIS NEONATAL

La sepsis es sin duda uno de los grandes problemas en el ejercicio de la Neonatología.

En España el Grupo de Hospitales Castrillo sitúa la incidencia de sepsis vertical en el 2,5 por 1.000 recién nacidos (RN) vivos (*López JB et al 2000*) y la sepsis nosocomial en 2,1 por 100 RN ingresados en unidades neonatales (*López JB et al 2002*).

Incidencias similares se han referido en Estados Unidos (*Vergnano S et al 2005*), aunque, en realidad, las incidencias publicadas son solo una parte del problema, pues son muchos más los neonatos que son sometidos a chequeos para descartar sepsis y que reciben antibióticos. Escobar et al (*Escobar GJ et al 2000*) refieren que solo el 2,2% de los RN estudiados por sospecha de sepsis cumplieron después criterios de infección invasiva.

Aunque el concepto de sepsis forma parte de la práctica diaria en nuestros hospitales, lo cierto es que hasta el momento no existe un consenso internacional para definir con nitidez la sepsis neonatal.

El concepto de sepsis neonatal implicaría un SRIS en presencia de, o como resultado de, una infección sospechada o demostrada.

Infección sospechada o confirmada (por cultivo positivo u otros métodos) causada

por un patógeno o un síndrome clínico asociado a una alta probabilidad de infección. Evidencia de infección incluiría hallazgos positivos en la exploración clínica o datos de laboratorio (*Goldstein et al 2005*).

El hemocultivo tiene un valor limitado en el periodo neonatal, especialmente por la frecuencia de falsos negativos debidos a factores como el uso de antibióticos intraparto, lugar inadecuado de la extracción de sangre o extracción insuficiente de sangre o por la presencia de falsos positivos por contaminación con gérmenes de la piel durante la extracción (*López JB 2006*).

Con muestras de sangre de 1 ml, un volumen difícil de extraer en un prematuro, se ha estimado una sensibilidad para el hemocultivo del 30-40% (*Fischer JE et al 2003; Haque KN 2005*).

En 1995, el grupo de Hospitales Castrillo llegó a un consenso para definir **sepsis comprobada** basado en la constatación de síntomas o signos clínicos de infección(aspecto séptico objetivado por un neonatólogo experimentado y/o presencia de dos o más síntomas o signos de infección) y positividad de los datos de laboratorio (recuento leucocitario alterado según los criterios de Manroe et al 1979, PCR >10 mg/L y/o PCT $\geq 0,65$ ng/ml,) como expresión de SRIS en periodo neonatal; y evidencia de infección a través del hemocultivo positivo; **sepsis clínica** en caso de presencia de datos clínicos y marcadores biológicos de SRIS pero hemocultivo negativo; de **bacteriemia asintomática** por la ausencia de datos clínicos, normalidad de los marcadores biológicos y hemocultivo positivo; y de **ausencia de infección** en caso de falta de síntomas o signos clínicos, marcadores biológicos normales y hemocultivo negativo.

Una vez tipificados los diagnósticos de sepsis comprobada, sepsis clínica y bacteriemia, se estableció un consenso para considerar cuándo las infecciones debían considerarse de transmisión vertical y cuándo de origen nosocomial, empleando no sólo criterios temporales sino también epidemiológicos y microbiológicos (*López JB et al 2000 y 2002*).

Mientras que las sepsis de origen vertical son causadas por gérmenes localizados en el canal genital materno y contaminan al feto por vía ascendente, o por contacto directo del feto con secreciones contaminadas al pasar por el canal del parto; las sepsis nosocomiales son producidas por microorganismos localizados en los servicios de neonatología y colonizan al niño mediante el contacto del personal sanitario (manos contaminadas) o el material de diagnóstico y tratamiento contaminado.

La etiología de la sepsis vertical es fundamentalmente bacteriana, siendo las

especies más implicadas el streptococcus agalactiae o EGB y Escherichia coli. La etiología de la sepsis nosocomial en el Grupo de Hospitales Castrillo fue similar a la referida en otras series, destacando *S. epidermidis* (42%), *Candida* spp. (11,5%), *E. coli* (7,8%), *Enterococcus* (7,7%) y *Klebsiella* (7%) (López-Sastre J et al 2005).

Una vez constatada la presencia de sepsis, ésta se considera **vertical** cuando la clínica se inicia antes de los tres días de vida y se descarta la posibilidad de infección nosocomial (aislamiento del mismo germen en hemocultivo y en personal sanitario y/o material de diagnóstico y/o tratamiento). Cuando la clínica se inicia después del tercer día de vida para clasificar la sepsis como vertical, debe aislarse el mismo germen típico de transmisión vertical en la sangre del RN y en el canal genital materno y/o en exudados periféricos del RN (faríngeo y ótico), tomados en las primeras 24 horas de vida. La situación que cursa con clínica de sepsis, hemograma y PCR alterados, aislamiento de EGB en el exudado vaginal materno y en los exudados de superficie tomados al RN, pero con hemocultivo negativo, se define como sepsis vertical clínica (Lopez JB et al 2008).

La sepsis se considera **nosocomial** cuando la clínica se inicia después de los tres primeros días de vida y se descarta el origen vertical (Lopez JB et al 2008).

Posteriormente los criterios del Grupo Castrillo han sido empleados también en estudios sobre eficacia diagnóstica de marcadores de infección.

Es evidente, después de los años transcurridos y tras la aparición de los consensos internacionales de sepsis en adultos y pediátricos, que las definiciones del Grupo Castrillo pueden mejorarse (López JB 2006).

En su momento no se llegaron a especificar al detalle los signos clínicos de sepsis, dejando un margen de subjetividad al neonatólogo responsable. En cuanto al recuento leucocitario, estudios más recientes han mostrado las limitaciones de los trabajos de Manroe et al (Schelonka RL et al 1994).

Igualmente, hoy día disponemos de más información sobre marcadores biológicos como la PCR o procalcitonina.

Las manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal suelen ser inespecíficas; puede objetivarse disminución de la actividad espontánea, inestabilidad de la temperatura (hipotermia o fiebre), dificultades para la alimentación (retención gástrica, regurgitaciones, reflejo de succión débil o abolido) y en el RN prematuro episodios de bradicardias, taquicardia o apneas. A medida que progresa la infección se acentúan las manifestaciones digestivas (vómitos, distensión abdominal, diarrea) y se inicia frecuentemente sintomatología cardiorrespiratoria (taquicardia, taquipnea, apneas, signos de distrés respiratorio) y

neurológica (apatía, irritabilidad, convulsiones). En fases tardías de la infección predomina el aspecto de gravedad con disminución de la movilidad espontánea, hipotonía y aparición de ictericia, “aspecto séptico”. En esta fase es posible objetivar manifestaciones de coagulopatía intravascular diseminada (CID) (petequias, equimosis, hemorragias mucosas) o de shock séptico (taquicardia, pulso débil, relleno capilar lento, hipotensión, etc.) (López-Sastre J et al 2005).

4.4. ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE

4.4.1. DEFINICIÓN

La enterocolitis necrosante es la patología digestiva adquirida más frecuente y grave en periodo neonatal.

Se define como un proceso inflamatorio intestinal agudo que se produce, fundamentalmente, en neonatos con bajo peso al nacer; caracterizado por necrosis isquémica de la mucosa gastrointestinal, que puede conducir a perforación y peritonitis. Es considerada como la catástrofe gastrointestinal más urgente en prematuros de bajo peso al nacimiento.

4.4.2. EPIDEMIOLOGÍA

ECN afecta principalmente a recién nacidos prematuros. Es menos frecuente en recién nacidos a término y pretérminos tardíos. Más del 85% de todas las ECN suceden en recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento (RNMBP) (<1500 gr) o en prematuros <32 semanas de edad gestacional (Sharma R et al 2006).

La **incidencia** de ECN varía de un centro a otro y de un año a otro en cada centro. Se da en proporciones endémicas y epidémicas. Se estima que ocurren 0,3 a 2,4 casos por cada 1.000 RN vivos (Hunter CJ et al 2008).

Aproximadamente sucede en el 1-5% de los todos los recién nacidos ingresados en una UCIN y en el 5-10% de los de muy bajo peso, pudiendo llegar a un 15% si excluimos aquellos que fallecen tempranamente y solo se incluye a aquellos que han recibido nutrición enteral. La prevalencia de ECN se ha visto que es menor en Europa y Canadá respecto a Estados Unidos (Stoll BJ et al 2010; Thompson AM et al 2008; Fanaroff AA et al 2007; Guillet R et al 2006; Fitzgibbons SC et al 2009; EXPRESS group 2010; Bajwa NM et al 2011; Yee WH et al 2012).

A pesar de los avances en las UCIN la **mortalidad** en neonatos se ha mantenido sin cambios en las últimas 3 décadas desde 15 a un 30% (*Berrington JE et al 2012*). En los prematuros con peso <1000 g la mortalidad alcanza hasta un 45%; en los niños <750 gr puede ser mucho mayor.

Además de la alta tasa de mortalidad descrita, los pacientes supervivientes se enfrentan a una morbilidad significativa que abarca desde trastornos del neurodesarrollo, problemas de alimentación, dependencia de nutrición parenteral y el síndrome de intestino corto (*Horbar D et al 2000*).

4.4.3. PATOGENIA

La ECN es un trastorno inflamatorio que puede afectar a cualquier porción del tracto gastrointestinal, pero típicamente afecta a íleon y colon proximal (*Ballance WA et al 1990*).

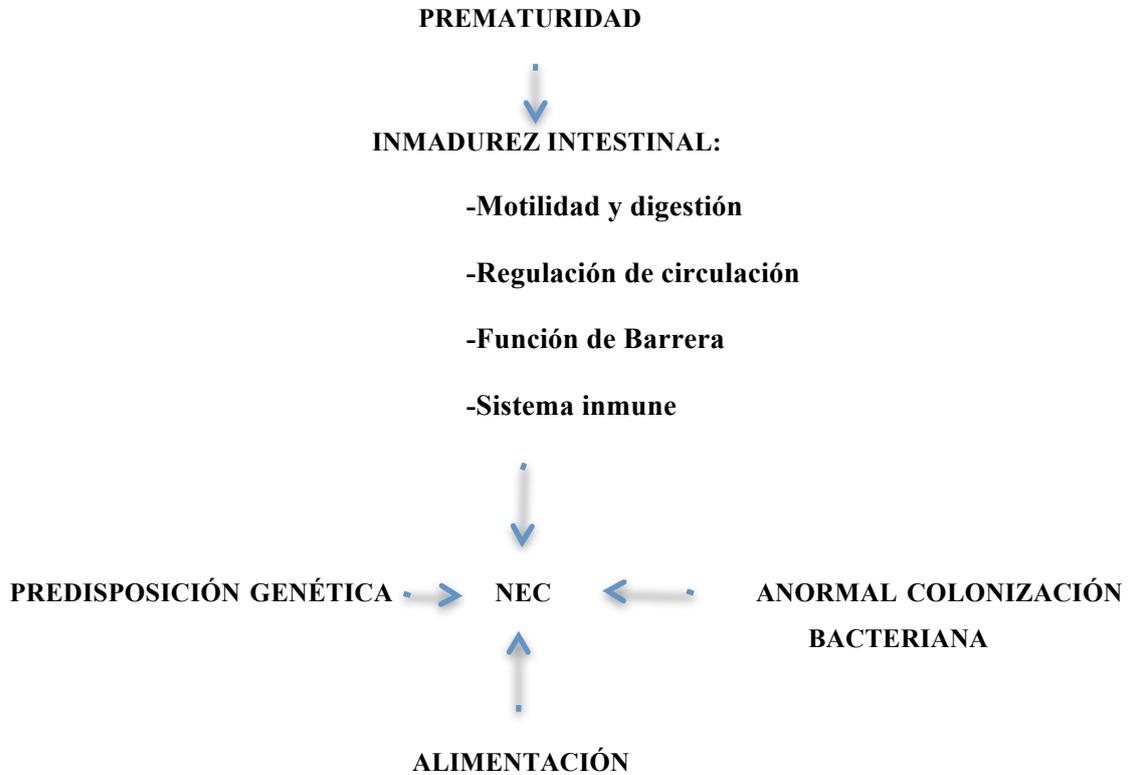
La afectación intestinal puede ser parcheada, focal o difusa (*Zhang Y et al 2011*).

Las causas de la ECN no están bien definidas. Se acepta actualmente un mecanismo **multifactorial en un huésped predispuesto**. (Figura 5).

La **inmadurez del tracto gastrointestinal** afecta a diversos aspectos como a motilidad, digestión, absorción, regulación de la circulación, función de barrera intestinal y sistema inmune predisponiendo a la lesión intestinal y una inadecuada respuesta a la misma.

Figura 5: Fisiopatología de la enterocolitis necrotizante: factores predisponentes.

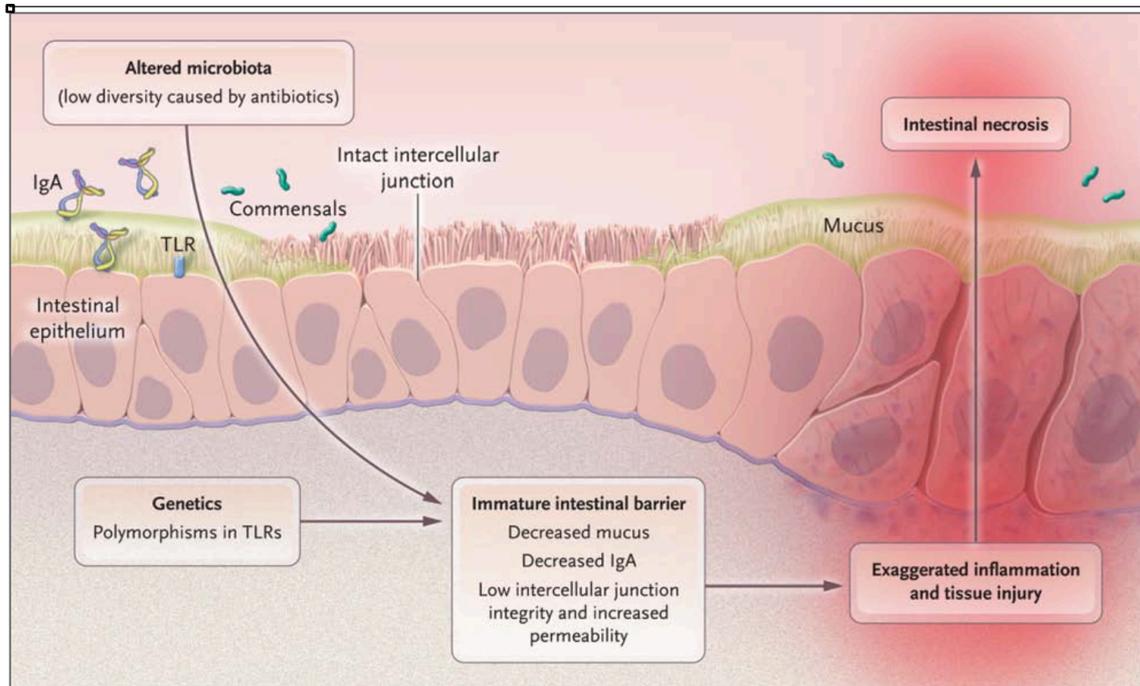
(Tomado de Lin PW et al 2008)



Factores genéticos, entre los que cabe destacar mutaciones en el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 2* (NOD2) y receptores de la interleuquina-4 (IL-4); junto a la interacción entre las características del intestino inmaduro, la microbiota intestinal y la alimentación con fórmula, predisponen a sufrir una ECN (figura 6), teniendo como base una respuesta inflamatoria excesiva e inadecuada.

Figura 6: Fisiopatología de la enterocolitis necrotizante.

(Tomado de Neu J et al 2011)



INMADUREZ INTESTINAL. Motilidad y digestión.

La motilidad se inicia en segundo trimestre pero finaliza y madura en el tercer trimestre del embarazo (Sanderson IR 1999) y por tanto la dismotilidad existente en el prematuro genera un tránsito lento, sometiendo al epitelio al contacto con mayor carga bacteriana y sus productos tóxicos (Henry MC 2009; Indrio F 2011).

Exacerbado por una menor digestión y absorción de nutrientes en el intestino inmaduro. Lin y colaboradores sugieren que una sobreproducción de ácidos grasos de cadena corta en combinación con la disminución de la absorción puede conducir directa o indirectamente a la lesión intestinal (Lin J 2004).

Además el éstasis generado por el tránsito lento provoca la dilatación de asas y deterioro de la barrera intestinal (Wu SF et al 2012; Morowitz MJ et al 2010; Sharma R et al 2007).

INMADUREZ INTESTINAL. *Función de barrera*

El epitelio intestinal tiene un papel importante como protector contra organismos patógenos. La función de barrera consiste en una defensa tanto bioquímica como estructural.

La barrera estructural, como ya hemos comentado previamente, esta integrada principalmente por las uniones estrechas formadas en la semana 10 de gestación, pero la función de barrera requiere el control sobre la función de absorción y secreción de fluidos, la cual madura bajo la influencia del líquido amniótico a partir de la semana 26 de gestación. La integridad de la barrera intestinal es reforzada por una gruesa capa de mucina y además regulada por prostaciclina, óxido nítrico y factor de crecimiento de epidermis. El óxido nítrico tiene un rol paradójico, ya que en niveles bajos contribuye a la integridad de la barrera pero con niveles elevados causa un efecto citopático sobre el epitelio.

La barrera bioquímica cobra importancia mediante los productos segregados por las células de Paneth, lisozimas, fosfolipasa A2 y pequeños péptidos antimicrobianos.

ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA

En dicho contexto, tiene un papel fundamental la **microbiota intestinal alterada**, con un desplazamiento de la flora saprofita, o un desbalance entre ambas.

Aunque no se ha relacionado con la patogénesis de ECN ninguna especie bacteriana específica, se ha visto que el aumento de la permeabilidad intestinal unido a la anormal colonización bacteriana, altera las señales de traducción normales, a través de mediadores inflamatorios generando la cascada inflamatoria definitoria de la ECN. En la superficie mucosa se establece la relación denominada *cross-talk*, ya citada en apartados previos, entre determinados ligandos, lipopolisacáridos (LPS) y receptores específicos como el Toll-like (TLRs), a través de la cual se produce la activación de dichas señales reguladoras. Éstas pueden dar lugar a una respuesta protectora si son activadas por bacterias comensales (*Rakoff-Nahoum S et al 2004*), o existir una disregulación que genere una respuesta inflamatoria excesiva/apoptosis.

Las bacterias comensales pueden regular la expresión de genes importantes para la función de barrera, digestión y angiogénesis (*Hooper LV et al 2001*).

El recién nacido de bajo peso al nacimiento es especialmente susceptible a la disbiosis. En el recién nacido a término alimentado con leche materna se ha visto un predominio de bifidobacterias y otros anaerobios facultativos en la colonización (*Fanaro S et al 2003*), sin embargo en el prematuro, el contacto con flora nosocomial y la frecuente

exposición a antibióticos en las unidades neonatales favorecen la anormal colonización, entre ellos la presencia de enterobacterias.

En aquellos recién nacidos que desarrollan ECN se ha demostrado una alteración de la microbiota previa al diagnóstico (*Mai V et al 2011*). Del mismo modo se ha demostrado que el uso de antibióticos de amplio espectro más de 10 días, incrementa el riesgo de ECN (*Alexander VN et al 2011*).

INMADUREZ INTESTINAL. *Regulación de la circulación*

La ECN es una enfermedad que afecta a prematuros, siendo rara en recién nacidos a término. En éstos, a menudo se ha asociado con un factor de riesgo específico, tal como enfermedad cardíaca congénita, evento hipóxico-isquémico, policitemia o historia de crecimiento intrauterino retardado (*McElhinney DB et al 2010*).

A pesar de la evidencia de que el evento hipóxico-isquémico está involucrado en la ECN del RNAT, en el RNPT parecen estar involucrados mecanismos distintos.

Recientes estudios muestran que en la microvasculatura del intestino inmaduro hay un fino balance entre vasodilatación y vasoconstricción. Un defecto en la función endotelial o producción de mediadores proinflamatorios puede generar un desbalance entre vasoconstricción (endotelina 1) y vasodilatación (óxido nítrico), generando un estado de isquemia y lesión intestinal.

INMADUREZ INTESTINAL. *Inmunidad innata.*

Se han desarrollado distintos aspectos del intestino inmaduro que predisponen a la lesión intestinal.

El huésped responde a las lesiones induciendo la liberación local de mediadores inflamatorios solubles y agentes quimiotácticos para incrementar la permeabilidad vascular y atraer a células inflamatorias.

En la ECN, el evento final es una necrosis isquémica-hemorrágica consecuencia de dicha disregulación y respuesta inflamatoria exagerada, a través de factores endógenos como factor activador de plaquetas (FAP), citoquinas proinflamatorias (TNF- α , Il 1 e Il 6) y quimiocinas.

ALIMENTACIÓN

Casi todos los niños que desarrollan ECN han recibido **alimentación**. Entre los factores considerados a este respecto están la osmolalidad y la falta de factores inmunoprotectores en la leche, así como la cronología, el volumen y la frecuencia de la alimentación.

Revisiones de la Cochrane respecto a las prácticas de alimentación, incluyendo el retraso en la introducción de la alimentación, así como un avance cauteloso en los volúmenes de la misma, no han establecido una asociación significativa con ECN (*Kennedy KA et al 2000; Morgan J et al 2014*).

Sin embargo, protocolos de alimentación estandarizados o guías clínicas de alimentación, las cuales contemplan el inicio de la alimentación basado en la edad gestacional y un avance gradual tanto en volumen como en concentración han demostrado una menor incidencia de ENC comparada con el inicio de la alimentación no estandarizado (*Kamitsuka MD et al 2000; McCallie KR et al 2011, Christensen RD et al 2010*).

Por otro lado es bien conocido el papel antimicrobiano y antiinflamatorio de la leche humana, aunque por sí sola no evite el desarrollo de ECN (*Christensen RD et al 2010; Frost BL et al 2008*).

El efecto de la leche humana sobre la incidencia de ECN se ve influenciado por las distintas variantes en cuanto a la alimentación con leche humana se refiere (fortificación y tipo de la misma, lactancia mixta, leche donada...). Distintos metaanálisis han sugerido que el uso de leche humana reduce la incidencia de ECN (*McGuire W et al 2003; Boyd CA et al 2007*) y que el fortificante no la aumenta (*Kuschel CA et al 2004*).

4.4.4. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

El diagnóstico precoz de la ECN es el factor más importante que determina la evolución.

Los signos y síntomas típicos de la “clásica” ECN que se produce en 2º semana de vida en el prematuro son la intolerancia alimentaria, distensión abdominal y sangre en las heces. Sin embargo, su presentación clínica puede variar desde un curso lento e indolente a una rápida progresión con desenlace fatal en pocas horas.

Los síntomas más precoces de la ECN suelen ser inespecíficos, tanto a nivel sistémico como digestivos, siendo muy similares a los que podrían presentar otras

enfermedades del tracto digestivo o cualquier proceso séptico. De ahí las dificultades diagnósticas en los estadios tempranos de la enfermedad, que permitan un tratamiento precoz y una mejora en las tasas de morbimortalidad.

Por lo anterior expuesto, es necesario mantener una alta sospecha clínica a través de una observación clínica cuidadosa.

El término de “enterocolitis necrosante” a menudo refleja un espectro de condiciones intestinales que difieren en su patogénesis, y por tanto en las estrategias de prevención y tratamiento, debiendo ser tenidas en cuenta en el diagnóstico diferencial. (*Sharma R et al 2013*).

Actualmente los estadios de Bell (*Bell MJ et al 19787*) con la modificación de Walsh y Kleigman (*Walsh MC et al 1986*) permiten uniformizar el diagnóstico y tratamiento basándose en la gravedad de la ECN (*Eichenwald 2010*).

- **Estadio I (Sospecha de ECN):** Síntomas y signos clínicos, como pueden ser intolerancia alimentaria, distensión abdominal o ambos. Radiografía sin evidencia de neumatosis intestinal, gas venoso portal o aire extraperitoneal.
- **Estadio II (ECN confirmada):** Síntomas y signos cínicos con neumatosis intestinal, gas venoso portal o ambos. Otros signos radiográficos como asas de intestino fijas o dilatadas y el íleo paralítico, hallazgos no patognomónicos, pero altamente sospechosos.
 - a. Enfermedad leve.
 - b. Enfermedad moderada con toxicidad sistémica.
- **Estadio III (ECN avanzada):** Aire libre peritoneal en paciente con signos y síntomas clínicos. Íleo persistente, distensión abdominal y radiografías que muestran ausencia de gas intestinal, junto a un deterioro clínico y analítico.
 - A. Perforación intestinal inminente.
 - B. Perforación intestinal manifiesta.

No siempre es fácil establecer una correlación radiológica con el diagnóstico y severidad de la ECN. Además existe variabilidad interobservador en la interpretación de los hallazgos indicativos de ECN en la radiografía simple de abdomen.

Puede darse el caso de pacientes en los que no se detecten hallazgos radiográficos como neumatosis intestinal o gas portal, y presenten ECN severa que requiere cirugía (*Epelman M et al 2007*).

Del mismo modo el neumoperitoneo es el único hallazgo radiológico que se considera indicación universal de cirugía y NO TODOS los pacientes con necrosis intestinal y perforación presentan gas libre en la radiografía simple de abdomen, llegando hasta un 20%.

El hallazgo de **neumatosis intestinal** es un signo temprano que puede preceder a los signos clínicos (*Rabinowitz JG et al 1976*). A pesar de que puede presentarse en otras patologías neonatales, es el hallazgo más común relacionado con la ECN, habiéndose considerado un signo patognomónico de la misma (*Epelman M et al 2007*).

Sin embargo no se presenta en todos los casos de NEC. En el contexto clínico de NEC la neumatosis intestinal confirma el diagnóstico, pero si no esta presente, no la excluye.

En pacientes con síntomas leves y hallazgos no específicos en la radiografía simple de abdomen, la ecografía puede ser extremadamente útil, pudiendo visualizar gas intramural no detectado en la radiografía así como cambios en el espesor de la pared abdominal, ecogenicidad, peristalsis y perfusión (*Faingold R et al 2005; Kim WY et al 2005*).

Por otro lado, no hay pruebas de laboratorio específicas de la ECN, aunque pueden ser útiles para apoyar el diagnóstico.

La trombopenia, acidosis metabólica persistente y la hiponatremia intensa rebelde constituyen la triada más común de signos y ayudan a confirmar el diagnóstico. Mediciones sucesivas de PCR son también útiles para el diagnóstico y para valorar la respuesta al tratamiento en el curso de la enfermedad.

Tras lo anterior expuesto se necesita un **enfoque de estadificación más fiable** que permite medidas preventivas agresivas, pero probablemente requerirá el **desarrollo de biomarcadores** que predigan con exactitud la expresión completa de la enterocolitis necrotizante (*Neu J et al 2011*).

4.4.5. TRATAMIENTO

El tratamiento médico debe ser inmediato, iniciándose desde el momento en el que se sospecha el diagnóstico de ECN. Se expone a continuación en función del estadio de Bell (*Neu J et al 2011; Eichevald 2010; Sharma R et al 2013*).

- **Estadio I (sospecha de ECN):** Dieta absoluta. Descompresión GIT con sonda nasogástrica. Hidratación intravenosa para mantener estado de euvolemia. Monitorización con analítica (hemograma y electrolitos) y radiografías de

abdomen de forma seriada. Inicio de antibióticos, al menos 48 horas, previa extracción de cultivos.

- **Estadio II (ECN confirmada):** Igual que escalón previo, pero se iniciará nutrición parenteral precoz con un adecuado aporte proteico para mantener un balance nitrogenado positivo. Se prestará especial atención a la necesidad de hemoderivados y corrección de acidosis metabólica. Se establecerá una pauta antibiótica completa, que se mantendrá habitualmente 14 días, teniendo en cuenta la flora predominante de la UCIN en cuestión, los gérmenes asociados con la ECN y sus patrones de resistencia con el fin de ajustar la cobertura antibiótica de un modo adecuado. En este momento se debe consultar con cirugía pediátrica para informar del caso, y/o trasladar al paciente a un centro donde se disponga de cirugía.
- **Estadio III (ECN avanzada):** Respecto al escalón previo cobra especial interés el papel del cirujano infantil. La presencia de neumoperitoneo causado por una perforación intestinal y la presencia de intestino necrótico son dos indicaciones absolutas de intervención quirúrgica. Signos indirectos como la acidosis metabólica severa y persistente y/o trombocitopenia unidos a una refractariedad al tratamiento médico son altamente sugestivos de necrosis intestinal y necesidad de cirugía. El tratamiento quirúrgico consiste en la resección con enterostomía, es decir, exteriorizando los extremos viables como estomas, aunque la anastomosis primaria puede ser útil en determinados casos (*Blakely ML et al Sola JE et al 2010*).

El objetivo es extirpar el intestino necrótico conservando la mayor longitud de intestino posible. Recientemente se ha considerado el drenaje peritoneal primario como una alterativa a la laparotomía. En recién nacidos <1000 g y muy inestables es la primera opción a realizar con anestesia local. En muchos casos sirve de compás de espera para realizar la laparotomía cuando el niño esté estabilizado, aunque en ocasiones no es necesario recurrir a ella. Rao and colleague, en su revisión de dos EC randomizados, que estudia a pacientes con ECN y perforación intestinal, apuntan que no hubo diferencias respecto a mortalidad y duración de la nutrición parenteral entre ambas opciones quirúrgicas (*Rao SC, et al 2011*).

4.4.6. PREVENCIÓN

La única medida realmente eficaz para prevenir la ECN es la reducción del número de partos prematuros. Actualmente las estrategias de prevención incluyen (*Dominguez et al 2012*):

- Optimización de la alimentación enteral. Uso de leche materna y protocolos de alimentación estandarizados.
- Probióticos, microorganismos vivos que son ingeridos con la intención de replicarse y colonizar en el tracto gastrointestinal. Actúan de forma multifactorial, modulando la respuesta inmune, fortaleciendo la barrera intestinal y produciendo sustancias antibacterianas (*Deshpande G et al 2007*). Pueden ayudar a normalizar la microflora de colonización intestinal del prematuro. A pesar de que hay evidencia de una disminución de ECN, no están claros aspectos como la selección de la cepa, dosis, duración de la suplementación, edad de comienzo o consecuencias a largo plazo. Todavía son necesarios estudios para evaluar la seguridad y eficacia del uso de probióticos para la prevención de ECN.
- Los glucocorticoides prenatales median la maduración de la barrera intestinal, considerándose factor protector de ECN (*Smith LM et al 2000*).
- Otras estrategias. Modificación del estado inmunitario del intestino, con suplementación con inmunoglobulinas; ensayos con antagonistas de FAP...

5. CALPROTECTINA

5.1. DEFINICIÓN

La calprotectina pertenece a la familia de proteínas S-100. Tiene un peso molecular de 36,5 kD (*Berntzen HB et al 1990*) y está formada por 2 cadenas pesadas y 1 ligera no glicosiladas. Presente principalmente en el citosol de los neutrófilos y menor cuantía en monocitos y macrófagos.

También ha sido referida en la literatura como S100A8/A9, MRP8/14 (myeloid-related protein), calgranulin A/B, L1 protein, 27E10 antigen, cystic fibrosis antigen, myeloid-histiocyte antigen, and CP-10 (*Yui, S et al 2003; Striz I et al 2004; Stroncek DF et al 2005*).

Los genes que codifican la calprotectina se localizan en el cromosoma 1q21 (*Yui S et al 2003*).

5.2. FUNCIONES

Aunque sus funciones biológicas exactas son bastante desconocidas hoy en día, se conoce que es la encargada **de fijar el calcio y el zinc**. In vitro, la calprotectina ha demostrado tener propiedades **bacteriostáticas y fungostáticas** con una mínima concentración inhibitoria (*Steinbakk M et al 1990*) y estar implicada en la **regulación de los procesos inflamatorios**, esto puede deberse a que la inhibición del crecimiento de los microorganismos se deba principalmente a la competición por el zinc (*Isaksen B et al 2001*). A ésta también se le han adjudicado acciones **antiproliferativas** en varios tipos de líneas tumorales, posiblemente por la inhibición caseína quinasa II (*Murao S et al 1989*). Se ha sugerido que la calprotectina juega un papel en el control de la flora gastrointestinal así como en la prevención de la traslocación bacteriana.

Constituye aproximadamente el 5% del total de las proteínas y cerca del 60% de las proteínas solubles citoplasmáticas de los granulocitos desempeñando un **papel primordial en la defensa neutrofílica**. (*Dale I et al 1985*).

Fue en 1980 cuando se describió por primera vez, y se la nombró L1 (*Fagerhol MK et al 1980*) El nombre de calprotectina fue propuesto más tarde cuando se documentó su actividad como proteína fijadora de calcio y antimicrobiana. Posteriormente se investigó su importancia en procesos inflamatorios como fibrosis quística, procesos reumatológicos, enfermedad inflamatoria intestinal, carcinoma colo-rectal, HIV y otros procesos inflamatorios (*Canani RB et al 2008; Quail MA et al 2008; Hammer HB et al 2007; Karl J et al 2008*).

5.3. MEDICIÓN

Se ha cuantificado sus niveles en suero/plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, y se ha podido ver que la concentración encontrada en heces es 10 veces superior a la hallada en plasma (*Rooseth AG et al 1992; Dale I et al 1985*).

En plasma también se eleva de 5 a 40 veces en situaciones inflamatorias correlacionándose con los índices de actividad clínica, pero pueden descender los niveles si el lugar de extracción está alejado del foco inflamatorio (*Bunn SK et al 2001*).

5.4. CALPROTECTINA FECAL

La calprotectina fecal se origina de la migración transepitelial de los granulocitos hacia la luz intestinal. Sus niveles se relacionan cuantitativamente con la intensidad de dicha migración, reflejo de la actividad antiinflamatoria intestinal y resultado de la activación y muerte de dichas células liberadoras de calprotectina (*Gaya DR, et al 2005; Vermeire S et al 2006 ;Roseth AG et al 1999; Silberer H et al 2005; Sipponen T et al 2008*).

La calprotectina fecal es un buen marcador de actividad inflamatoria intestinal en la práctica clínica ya que es **estable** durante 3-7 días a temperatura ambiente debido a que cuando la calprotectina se encuentra unida a calcio (presente en cantidades suficientes en el contenido intestinal) presenta una elevadísima resistencia al calor y a la degradación metabólica ejercida por enzimas bacterianas y por las propias proteasas intestinales (*Roseth AG et al 1992; Fagerhol MK 1996*). Estas propiedades permiten que se elimine intacta por las heces y le confieren ventaja como marcador bioquímico, no invasivo, para el cribaje de inflamación intestinal frente a otros marcadores utilizados (lactoferrina, elastasa neutrofílica o estearasa leucocitaria) (*Tomas AB et al 2007*).

5.4.1. TEST ELISA

La calprotectina puede ser medida en heces a través de una técnica cuantitativa “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA). Roseth and colleagues describieron el test de ELISA original (*Roseth AG et al 1992*).

Posteriormente tenemos disponibles diferentes kits de test ELISA. El valor exacto de la calprotectina fecal dependerá del tipo de test usado. En un estudio publicado recientemente se demuestra que el test monoclonal de calprotectina fecal es superior al test policlonal en la identificación de pacientes sintomáticos con enfermedad orgánica intestinal (*Burri E et al 2013*).

Entre sus ventajas destacan que el test diagnóstico ELISA requiere una pequeña muestra de heces (50-100 mg).

Cumple los criterios de test ideal: simple, poco costoso, seguro, no invasivo, con buena aceptación por parte de los pacientes y personal sanitario, objetivo y fidedigno.

Se realiza en laboratorio de mano de un facultativo y el tiempo requerido suele ser de 2,5-3 horas. Recientemente, se han desarrollado pruebas para determinar la calprotectina fecal a pie de cama. Estos tests pueden ser realizados en un tiempo inferior a 30 minutos y muestran una buena correlación con el tradicional test de laboratorio ELISA, como Quantum blue® o Calfast®, pero no serían útiles en nuestra cohorte de pacientes ya que no cuantifican valores por encima de 300 mg/kg de CF (*Radillo et al 2016, Benahmed et al 2014, Wassell et al 2012; Kok et al 2012; Sydora et al 2012; Kolho et al 2012*).

5.4.2. NIVELES NORMALES

Los niveles de calprotectina fecal aceptados como normales en niños mayores de un año en la bibliografía son de 50 µg/g con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 83% para correlacionarlos con procesos inflamatorios intestinales (*Canani RN et al 2008, Costa F et al 2003*).

Se describe una dependencia de la edad, siendo en neonatos los niveles normales mayores (*Campeotto F et al 2004*) sin poderse establecerse aún un rango definido y disminuyendo las cifras en primer año de la vida (*Li F et al 2015*).

Sólo los estudios más recientes plantean el estudio de la cinética de la calprotectina en las primeras semanas de la vida, estudios que fueron publicados posteriormente a que este estudio se iniciase (*Olafsdottir E et al 2002; Campeotto F et al 2004 y; Rugtveit J et al 2002; Josefsson S et al 2007*).

Por estos datos nos planteamos averiguar las cifras de calprotectina fecal normales en neonatos sanos pretérmino, y valorar su evolución durante las primeras semanas de vida.

5.4.3. INTERPRETACIÓN DE NIVELES DE CALPROTECTINA MEDIDOS EN HECES.

Su concentración en las deposiciones se correlaciona directamente con la intensidad del infiltrado neutrofílico en la mucosa intestinal y por ello con la gravedad de la inflamación (*Adland E et al 2002*). A nivel del tracto gastrointestinal, patologías inflamatorias con distinta etiología provocan un aumento de la **permeabilidad** de la mucosa que induce la migración de granulocitos y monocitos hacia el lumen intestinal (*Johne B et al 1997*) liberando gran cantidad de calprotectina que es excretada en las heces.

¿Pero que ocurre en el recién nacido sano?

Las cifras más elevadas de calprotectina fecal documentadas en el recién nacido sano son reflejo de una inmadurez tanto del sistema inmune adaptativo como de la barrera epitelial intestinal que generan un **aumento de la permeabilidad**, una mayor migración transepitelial a través de la mucosa durante el desarrollo de la tolerancia oral y la colonización por la microbiota específica. Dos principales procesos que intervienen en la adaptación agresiva que sufre el intestino tras el nacimiento.

Todo ello traduce un **estado fisiológico de inflamación intestinal subclínica**.

Con el proceso de madurez intestinal, la permeabilidad disminuye y en consecuencia las cifras de calprotectina fecal.

5.4.4. UTILIDAD CLÍNICA ACTUAL

La determinación de calprotectina en heces se está afianzando en los últimos años como un marcador no invasivo para el diagnóstico diferencial entre patología orgánica y funcional (*Tomas AB, et al 2007*).

Sabemos que es un excelente marcador, con alta sensibilidad, para monitorizar la actividad inflamatoria intestinal tanto en niños como en adultos.

En este punto, hoy día, cobra importancia la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La CF se correlaciona muy bien con la gammagrafía de leucocitos marcados con Indio-111 en la enfermedad inflamatoria intestinal, prueba considerada como técnica de referencia para medir la actividad inflamatoria del intestino (*Roseth AG et al 1999*). Sin embargo este

segundo método requiere la recolección de heces de 4 días y someter al paciente a radiación, además del coste elevado de la prueba. Es por ello la importancia de contar con otro test capaz de reproducir los resultados como ha sido la CF. Henderson and Colleagues realizan un extenso metaanálisis en el que definen a la CF como un marcador con una alta sensibilidad (98%) pero modesta especificidad (68%) para el diagnóstico de EII (*Henderson P. Et al 2014; Lehmann FS et al 2015*).

Cobrando mayor importancia en el seguimiento de la misma, monitorizando el grado de actividad inflamatoria una vez diagnosticada y prediciendo la recaída clínica (*Bunn S et al 2001; Walkiewicz D et al 2008*).

5.4.5. CALPROTECTINA FECAL EN UNA UNIDAD NEONATAL

Pese a lo anteriormente comentado, la utilidad de la calprotectina fecal es cuestionada en las unidades neonatales.

Las complicaciones gastrointestinales, tal como diferentes grados de enteropatía o enterocolitis necrotizante, no son infrecuentes en las primeras semanas de vida. Actualmente los pilares diagnósticos son los hallazgos clínicos y radiológicos pero pueden ser inespecíficos y no concluyentes, especialmente para el diagnóstico de grados leves de enteropatía o sobre todo para realizar un diagnóstico precoz. De aquí parte la necesidad de incorporar a nuestro trabajo diario otras herramientas como marcadores biológicos no invasivos.

Sabemos que el recién nacido prematuro es más susceptible de presentar una alteración en la función de barrera intestinal e inmunidad, pudiendo ser punto de partida para el desequilibrio entre tolerancia inmune y respuesta inflamatoria lo que genera una mayor susceptibilidad a procesos tales como translocación bacteria, inflamación crónica, desarrollo de sepsis y fallo multiorgánico.

Por ello planteamos el papel de la calprotectina fecal como marcador biológico de utilidad diagnóstica en el prematuro enfermo, no solo con afectación intestinal localizada sino también teniendo en cuenta el papel del intestino como punto de partida a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Del mismo modo que es utilizada la calprotectina fecal a día de hoy en niños para monitorizar la actividad inflamatoria en EII y predecir la recaída clínica, enfocamos su uso en prematuros de las unidades neonatales con el mismo fin, correlacionar los valores de

calprotectina fecal con la patología neonatal y establecer su capacidad predictiva en dicho contexto.

La evidencia que tenemos disponible hasta el momento, previo al inicio del presente estudio, es a pequeña escala y bastante limitada. Carrol et al realizan un estudio pequeño no randomizado, de casos y controles, demostrando cifras más elevadas de forma estadísticamente significativa en prematuros con ECN comparados con grupo control (288.4 mg/L [SD 49.1] and 98.0 mg/L [60.6], respectively; $p=0.0006$) (*Carroll D et al 2003*).

Siendo necesarios muchos más estudios para considerar su uso en la práctica clínica diaria en las unidades neonatales.

En contra, los principales problemas que la calprotectina fecal plantea para alcanzar el objetivo de uso planteado es la baja **especificidad** en definir la causa de la inflamación y el **desconocimiento de los niveles normales en los primeros meses de la vida así como su cinética** a lo largo del tiempo.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

PRINCIPALES

- En base a la revisión bibliográfica presentada nos planteamos que las cifras de calprotectina fecal en recién nacidos pretérmino sanos son más elevadas respecto a niños y adultos.
- Las cifras de calprotectina fecal tienen una cinética propia, descendiendo en las primeras semanas de vida, en relación con el proceso de maduración intestinal.
- Es bien conocido el papel de la calprotectina medida en heces como marcador de inflamación intestinal en pediatría. Planteamos que aquellos prematuros afectados de patología digestiva (enterocolitis necrotizante o procesos de enteropatía leve englobados con el término de “distrés intestinal”) tendrán cifras más elevadas respecto a prematuros sanos.
- Del mismo modo, aquellos prematuros con proceso de enfermedad que implique una respuesta inflamatoria sistémica, también se verá reflejado con cifras mayores de calprotectina fecal respecto a prematuros sanos, debido a la implicación del intestino como órgano modulador de respuesta inflamatoria sistémica.

SECUNDARIAS

- Conociendo y teniendo en cuenta la cinética de la calprotectina fecal en el prematuro sano, planteamos que los valores de CF podrían elevarse previamente al diagnóstico de la patología intestinal y otros procesos de enfermedad que desencadenen un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Siendo además un buen marcador evolutivo de la enfermedad.
- Consideramos que la calprotectina fecal puede ser una prueba diagnóstica eficaz de enfermedad sistémica o intestinal en el recién nacido pretérmino, con puntos de corte con aceptable sensibilidad y especificidad, útiles para la práctica clínica diaria.
- Los valores medidos de calprotectina fecal en las primeras semanas de vida pueden verse influenciados por determinadas variables, como son el tipo de parto, el tipo de alimentación (lactancia materna o lactancia artificial de forma predominante), edad gestacional del recién nacido pretérmino o el peso al nacimiento.

2. OBJETIVOS

- Establecer cifras de calprotectina fecal en recién nacidos pretérminos sanos menores o iguales a 35 semanas de edad gestacional y su cinética, midiendo los niveles en distintas muestras a lo largo del tiempo en los primeros dos meses de vida.
- Correlacionar los valores de calprotectina fecal en los recién nacido pretérmino sanos estudiados con el tipo de parto, tipo de alimentación, peso al nacimiento y edad gestacional.
- Medir los niveles de calprotectina fecal en recién nacidos pretérmino menores o iguales a 35 semanas de edad gestacional sanos y enfermos y compararlos.
- Estudiar la relación temporal del incremento de los valores de CF en prematuros con el momento del diagnóstico, clínico o bioquímico, de la enfermedad sistémica o intestinal para evaluar su capacidad predictiva; así como la modificación en el tiempo de los valores según la evolución la misma.
- Establecer puntos de corte diagnósticos de enfermedad en distintos momentos de la evolución temporal de los valores de calprotectina fecal en los prematuros estudiados, que permitan definirla como prueba diagnóstica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio longitudinal prospectivo de seguimiento clínico-analítico realizado en la Unidad de Neonatología del Hospital Materno-Infantil (HRU Carlos Haya) de Málaga. Se han seleccionado de forma aleatorizada los recién nacidos pretérminos menores de 36 semanas de edad gestacional (EG) al nacimiento que hayan ingresado en dicha unidad por algún motivo, cuyas familias hayan aceptado el consentimiento informado.

2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

Unidad de Neonatología del Hospital Regional Universitario de Málaga, cuya población de referencia abarca provincia de Málaga y Melilla. La provincia de Málaga tiene una población de 1621968 habitantes a fecha de diciembre de 2013 y la ciudad autónoma de Melilla una población de 80802 habitantes, con 15505 nacimientos en Málaga y 1509 en Melilla durante en el año 2013.

3. SUJETOS DEL ESTUDIO

Grupo de recién nacidos pretérmino menores 36 semanas de edad gestacional que ingresen en la Unidad de Neonatología, formada por la unidad de cuidados intermedios neonatales y la unidad de cuidados intensivos neonatales.

3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Paciente recién nacido prematuro.
- Edad gestacional inferior a 36 semanas.
- Ingreso en la Unidad de Neonatología entre 1º y 4º día de vida, ambos inclusive.
- Aceptación del consentimiento informado para participar en el estudio por parte de los padres o tutores legales del recién nacido.

3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ingreso en la unidad > 4º día de vida.
- Cromosomopatías y malformaciones fetales complejas, incompatibles con la nutrición enteral en las primeras 72 horas de vida.
- No aceptación del consentimiento informado para participar en el estudio por parte de los padres o tutores legales del recién nacido.

3.3. TAMAÑO MUESTRAL

Selección aleatorizada de pacientes que cumplan criterios de inclusión y no de exclusión que ingresen en la Unidad de Neonatología de Hospital Regional Universitario de Málaga. Se estima incluir a unos 150 pacientes.

Para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula $H_0: \rho=0$ mediante una Prueba T-Student bilateral para el coeficiente de correlación de Pearson entre dos variables, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5%, y asumiendo que la correlación esperada es 0.4, será necesario incluir 137 pacientes en el estudio. El tamaño muestral se ha ajustado dado que se espera tener un 10% de pérdidas por lo que el número de sujetos que sería necesario reclutar para el estudio es de 151.

La participación en el proyecto es voluntaria y la solicitud de participación es realizada como una propuesta de investigación de salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario. A los padres o tutores legales, además de la información verbal, se les informa por escrito a través de un consentimiento informado de la naturaleza de la investigación y del uso que se va a hacer de la información que se obtenga.

El proyecto ha sido evaluado y aprobado por el comité de Ética y de Investigación del Hospital Universitario Carlos Haya.

4. RECOGIDA DE DATOS Y SU ANÁLISIS

Para garantizar la confidencialidad de la información todos los datos recogidos en este estudio se han registrado de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre).

El Laboratorio del Complejo Hospitalario Carlos Haya de Málaga permite la determinación cuantitativa de calprotectina por medio de un simple ELISA en heces (realizado una media de 2 veces a la semana).

A cada niño se le han recogido muestras de heces para la determinación de calprotectina los días 4, 8, 15, 30 y 60. Todas las muestras fueron recogidas de igual manera, por recolección de heces depositadas recientemente en el pañal, sin emplear el sondaje rectal en ningún caso.

Se han considerado por separado las muestras de calprotectina extraídas en días en que el neonato estaba sano y las que se obtuvieron en días de enfermedad (prematuro enfermo considerado como aquel que manifestó cualquier situación que conllevara una respuesta inflamatoria sistémica como sepsis clínica o bioquímica, o patología digestiva (ECN o intolerancia digestiva). Los criterios diagnósticos se ajustaron a los actuales estándares de atención al prematuro propuestos por las Sociedades Científicas.

Hemos definido episodio de enfermedad a aquel que tiene un inicio y un final. No se han cogido como episodios diferentes aquellos que duran el tiempo suficiente para que haya dos muestras de calprotectina (se ha considerado como un episodio único).

Así mismo se han recogido todas las variables de interés de la historia clínica de cada paciente:

1. Clínicas.

- Neonatales:
 - Fecha de nacimiento, días de vida al ingreso, motivo de ingreso.
 - Sexo
 - EG
 - Peso al nacimiento
 - Tipo de alimentación. Se ha considerado lactancia materna predominante en aquellos casos en los que hubiera al menos un 80% de las tomas del día de leche materna.

- Obstétricas:
 - Tipo de parto.
- 2. Determinaciones analíticas:
 - Parámetros de analítica básica utilizados como albúmina y reactantes de fase aguda: PCR, PCT, leucocitos, plaquetas.
 - Calprotectina fecal, medida en microgramos / gramo de heces (Calprest, Eurospital, Italia).
- 3. Evolutivas:
 - Enfermedades asociadas durante su estancia: **Criterios de valoración:**
 - a. Criterios compatibles con SRIS independientemente de la causa que lo desencadene según International pediatric sepsis consensus conference (Goldstein et al 2005), que incluye criterios para el recién nacido, aunque no en prematuros. Nuestro trabajo empieza en 2004. (dentro de lo publicado, a criterio clínico.
 - b. Desarrollo de sepsis neonatal. El diagnóstico de la misma se realizó en base al protocolo establecido en nuestra unidad neonatal basado en las recomendaciones del Grupo de Hospitales Castrillo y del CDC estadounidense (Verani et al 2010).
 - c. Número de episodios de sepsis nosocomial, diferenciados de los de sepsis vertical, durante el ingreso.
 - d. ECN diagnosticada en base a la clasificación modificada de Bell. Desarrollo de $ECN \geq$ estadio IIA clasificación Bell.
 - e. Distrés intestinal/tolerancia digestiva. Se considera mala tolerancia/no tolerancia digestiva la existencia de vómitos y/o restos gástricos de volumen superior al 50% de la toma anterior, que requieran una modificación/suspensión en el ritmo de alimentación enteral.
 - f. Muerte.

Tratamiento de los datos:

Métodos informáticos: para el tratamiento del texto y las gráficas se ha usado “Microsoft Word 2010” y “R commander”.

Métodos estadísticos: para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico R commander. Se creó una base de datos de las variables. Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables con estimación puntual e intervalo de confianza para el

95% de seguridad, tratándose las variables continuas como medias, desviación estándar o medianas según la distribución de la variable. Las variables categóricas se presentan en frecuencias y porcentajes. Se correlacionaron las cifras de calprotectina fecal con el resto de variables.

Análisis multivariante: Se realizó un análisis multivariante y dependiendo del tipo de variable que se compare cada vez, se usó un prueba de asociación estadística u otra. Se ha realizado un análisis de regresión logística multivariante para evaluar de forma conjunta qué variables se relacionan con el resultado (muerte, NEC o SRIS). Se introdujeron en el modelo el grupo de variables que resulten estadísticamente significativas en el análisis bivariante, además de aquellas que tengan relevancia clínicamente. Se han tenido en cuenta para el modelo multivariante los posibles factores de confusión, como el tipo de alimentación. El método de selección de variables ha sido por pasos sucesivos, considerando en cada paso una probabilidad de entrada de 0,05, y 0,10 para salida.

En la evaluación de la precisión de la CF como prueba diagnóstica se emplearon curvas ROC C (Receiver Operating Characteristic), índice de la exactitud diagnóstica que proporciona un criterio unificador en el proceso de evaluación de la prueba. En nuestro estudio orientada a la evaluación cuantitativa de la exactitud de la prueba mediante el área bajo la curva ROC (el valor de 1 clasificaría al 100% de los enfermos como enfermos y al 100% de los sanos como sanos, en cambio con un valor de 0,5 existiría la misma probabilidad de clasificar a un enfermo como sano que como enfermo) y a la selección de niveles de decisión o umbrales según nos interese priorizar sobre sensibilidad vs especificidad.

Cada paciente tiene una hoja de seguimiento individual donde se recogieron todas las variables de estudio. La valoración de efectos esperados como NEC, sepsis nosocomial, fue identificada por el equipo asistencial de neonatólogos responsables de los neonatos incluidos en el estudio.

5. LIMITACIONES

En relación a la recolección de muestras ciertas limitaciones son inherentes al estudio, como es la dependencia de disponer de una muestra de heces el día de vida requerido para cada recién nacido, ya que como hemos dicho previamente no se empleó sondaje rectal en ningún caso. Así como la dificultad de la recolección una vez que el paciente ha sido dado de alta, por el problema de la distancia física del domicilio familiar al hospital.

Por otro lado es de considerar el tiempo transcurrido desde que se envía la muestra hasta que tenemos el resultado de la calprotectina fecal, lo que dependerá mucho del

laboratorio del hospital donde se trabaje. En sí, el test ELISA solo le lleva al facultativo 2,5-3 horas realizarlo. En nuestro laboratorio la limitación viene dada porque dicho test solo se realiza un par de veces a la semana, una vez reunido un volumen suficiente de muestras, por lo que limitaría su uso como marcador precoz y obtención de resultados en pocas horas. Recientemente, y posterior a este estudio, se ha incorporado en nuestro laboratorio, un test inmunturbidimétrico que analiza la calprotectina fecal en unos 30 minutos, realizándose a diario.

En relación a la definiciones para catalogar la enfermedad, concretamente para el SRIS del recién nacido prematuro, dependen del criterio médico del personal de la Unidad de Neonatología, en base a las publicaciones referentes al tema hasta el momento actual.

IV. RESULTADOS

1. EPIDEMIOLOGÍA DE NUESTRA SERIE

El periodo de inclusión de los pacientes en el estudio se prolongó a lo largo de 7 meses en 3 periodos temporales distintos, con un total de 226 ingresos de RN ≤ 35 semanas de EG en nuestra unidad neonatal, siendo seleccionados aleatoriamente un total de 104 recién nacidos que cumplían los criterios de selección, de los cuales 7 se excluyeron del seguimiento por diferentes motivos (4 por fallecimiento antes de comenzar a recoger las heces y 3 por fallo en la extracción de las muestras iniciales), con lo que forman parte del grupo de análisis final 97 recién nacidos. Éstos quedan distribuidos de la siguiente forma: 2004, 4 meses (50 pacientes); 2008, 2 meses (30 pacientes); 2013, 1 mes (17 pacientes).

A cada niño se le solicitó análisis de calprotectina fecal en 5 momentos diferentes (4 días, 8 días, 15 días, 30 días y 60 días), pero no siempre hubo muestra disponible: algunos de ellos no tenían deposiciones en el día correspondiente, en algunos la muestra no fue bien recogida o procesada y en otros casos el paciente había fallecido o sido dado de alta perdiendo el seguimiento con la familia por problemas de distancia física. Se ha generado un total de 311 muestras de heces para la determinación de calprotectina fecal. Si desglosamos las muestras en cada momento de estudio: Al 4º día hubo 72 muestras, al 8º día 82, al 15º día 80 muestras, a los 30 días 56 y a los 60 días hubo 21 muestras (tabla 4).

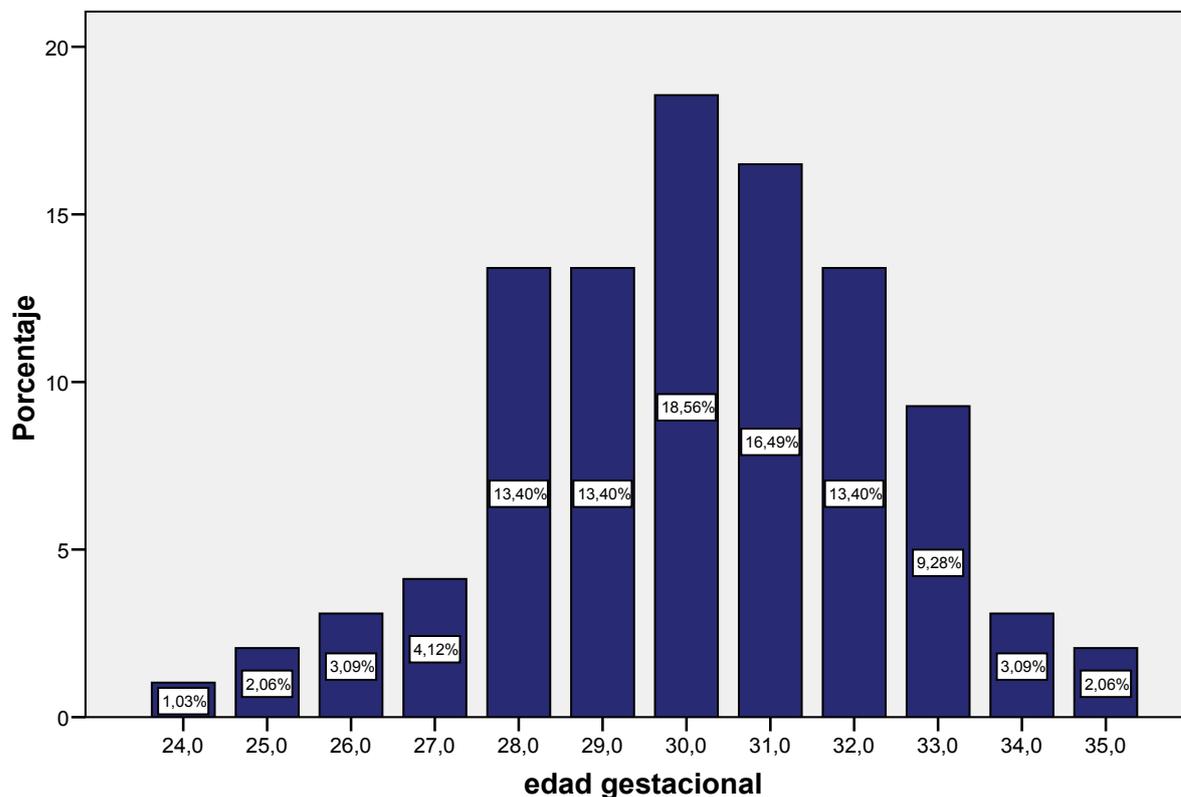
Tabla 4. Tabla de frecuencias con el número de muestras válidas e inválidas para el estudio en cada momento de determinación

<i>Día</i>	<i>Válidos</i>	<i>No válidos</i>
4	72	25
8	82	15
15	80	17
30	56	41
60	21	76

Un 48% del global son varones y un 52% son mujeres, sin diferencias significativas al realizar comparaciones en cada grupo de edad gestacional ni tampoco al analizar los datos de forma agrupada según la edad gestacional sea mayor o menor de 30 o de 28 semanas.

En lo referente a la edad gestacional al nacimiento de los recién nacidos incluidos en este trabajo, la media está en $30,1 \pm 2,2$ semanas (figura 7), siendo una distribución que sigue la normalidad, dado que el test de Shapiro-Wilk nos lo indica así (mediana de 30,0 (rango 24,0 - 35,0) semanas). Se aprecia que la mayoría se encuentran en el grupo de mayores de 28 semanas (75'3% vs 23'7%), siendo más de la mitad del total de 30 semanas o más (63'9%).

Figura 7. Gráficos de barras de las edades gestacionales de los recién nacidos incluidos.



Si atendemos al peso al nacimiento, el peso medio fue de $1321,4 \pm 351,1$ gramos, siendo muy similar a la mediana de peso (1295 gr (RIC 1090 – 1565)), lo que determina que es una muestra que sigue la normalidad, lo cual se comprueba mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se puede ver (figura 8) que la mayoría de los casos son menores de 1500 g (66,0%).

Si dividimos la muestra según la edad gestacional en menores de 30 semanas y mayores o igual a 30 semanas, se aprecia que el peso medio de los primeros es de $1086,1 \pm 265,2$ gramos y el de los mayores de 30 semanas es de $1458,7 \pm 322,2$ gramos (figura 9), siendo las diferencias entre ambos grupos estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Si hacemos el corte en 28 semanas de edad gestacional, los de 28 o menos tienen un peso medio de $972,3 \pm 237,3$ gramos y los mayores lo tienen de $1435,6 \pm 307,4$ gramos (figura 10), con diferencias igualmente significativas estadísticamente ($p < 0,0001$).

Figura 8. Gráfico de barras con pesos al nacimiento agrupados en menores o mayores de 1500 g

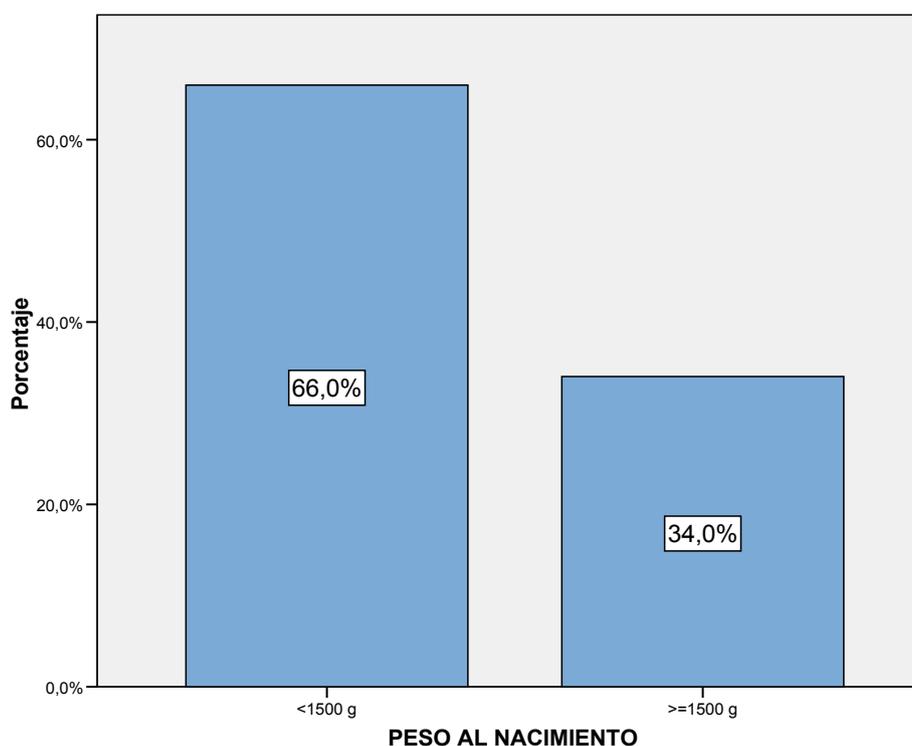


Figura 9. Gráficos de barras de pesos al nacimiento según la edad gestacional sea menor o mayor de 30 semanas.

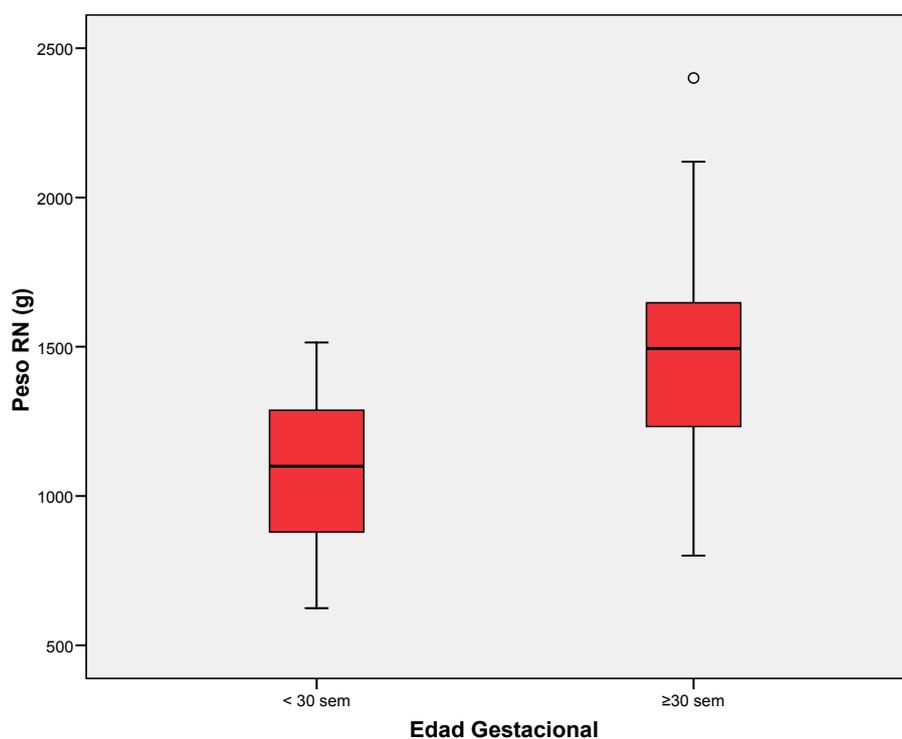
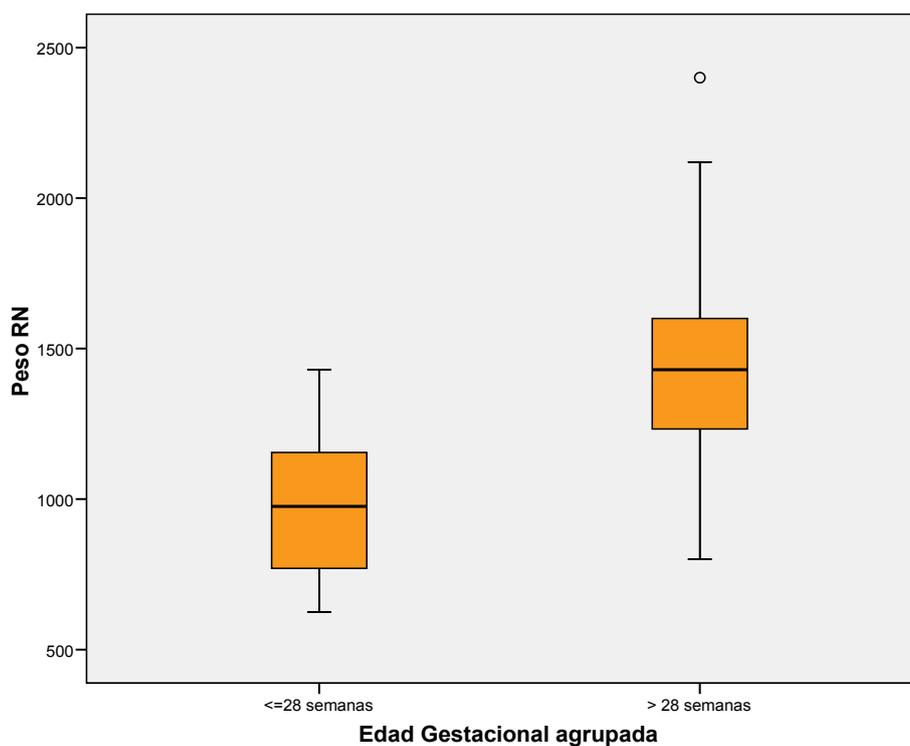


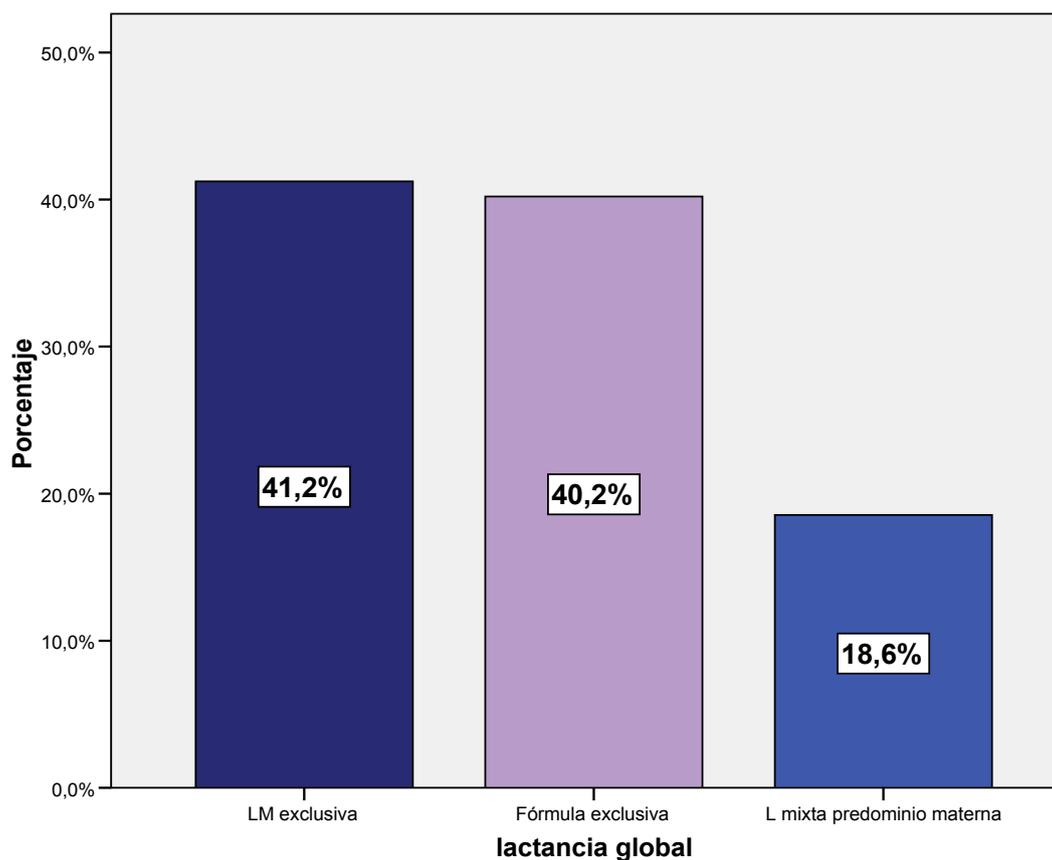
Figura 10. Gráficos de barras de pesos al nacimiento según la edad gestacional sea menor o mayor de 28 semanas.



Atendiendo al tipo de parto, la gran mayoría fueron mediante cesárea, siendo sólo 8 por vía vaginal (8,24%).

Poco más de la mitad de los recién nacidos estudiados tomaba lactancia materna de forma exclusiva (41,2%) o predominante (18,6%) frente a un 40,2% de fórmula adaptada exclusiva (figura 11), que en un 80% de casos correspondió a fórmula de prematuro, frente a un 20% de hidrolizado extenso.

Figura 11. Gráficos de barras de tipo de lactancia predominante en los primeros 30 días de vida.



En nuestra serie, un total de 38 pacientes tienen criterios de enfermedad en algún momento, lo cual supone un 39,1% del global.

Esos 38 pacientes suponen un total de 59 muestras de calprotectina cursadas estando con enfermedad, en diferentes momentos. En el día 4 hay muestras de 14 niños enfermos, en el día 8 hay 16 neonatos con criterios de enfermedad, en el día 15 hay 20 casos con enfermedad, en el 30 hay 7 de ellos y, finalmente, en el 60 hay 2.

Entre las enfermedades presentes en nuestros pacientes destacan: 21 sepsis (19 son nosocomiales y 2 son verticales) siendo el germen más frecuente los *Staphilococcus sp* con un 41'4% de casos; 8 pacientes con SDR-I graves; 6 cuadros de distrés intestinal y 2 ECN confirmadas y para terminar un cuadro de infección del tracto urinario.

Del total de pacientes, 28 estaban con algún criterio de enfermedad sólo en una de las determinaciones, teniendo sólo un proceso (1 ITU, 4 distrés, 2 ECN, 8 SDRI, 13 sepsis) y 10 de ellos han tenido proceso de enfermedad en dos o más momentos de extracción de heces, (8 sepsis nuevas y 2 niños que tenían distrés mantenido en dos momentos determinados).

2. CALPROTECTINA EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO SANOS Y ENFERMOS, ASÍ COMO LA VALORACIÓN DE SU CINÉTICA

En la tabla 5 se han agrupado todas las muestras de heces de RN extraídas en días en los que estaban sanos y las de RN en días en los que estaban enfermos, y comparado sus CF, logrando encontrar diferencias estadísticamente significativas.

No se encontraron diferencias significativas en las calprotectinas medias de los distintos episodios de enfermedad considerados, independientemente de cual fuese su causa.

En nuestro trabajo se ha comprobado que la calprotectina del prematuro enfermo tarda unos 10-20 días en descender a cifras similares a pretérminos sanos, destacando que en ambos procesos de ECN permanece elevada durante 20-30 días, más prolongado que en el resto de patologías.

Tabla 5. Comparación de cifras de calprotectina entre RN pretérminos sanos y enfermos.

Grupo de RNPT	Nº de episodios	Nº de muestras de heces	Media	DE	Mediana	p25	p75	p
No enfermos	92	252	204,61	111,98	177,25	127,33	278,62	0,001
Enfermos	38	59	552,82	402,83	473,50	322,12	671,00	

En la tabla 6 se describe el número de muestras aportadas por los pacientes en cada día de estudio y se muestran sus estadísticos analíticos principales (media, mediana, desviación típica), sin diferenciar a los niños según estuvieran o no enfermos en cada momento de extracción de muestra de heces, con el objetivo de apreciar la cinética de la calprotectina en los primeros dos meses de vida de los recién nacidos pretérminos

Tabla 6. Número de muestras en cada día de análisis y principales parámetros estadísticos analíticos.

		día-4	día-8	día-15	día-30	día-60
Nº de muestras	Válidos	72	82	80	56	21
	Perdidos	25	15	17	41	76
Media		353,43	240,74	303,31	227,61	169,81
Mediana		295,00	155,00	228,00	132,00	153,00
Desv. típ.		243,31	238,45	292,93	326,92	101,05

Es evidente que a partir del día 8 hay un primer descenso en las cifras de calprotectina fecal en los RNPT, habiendo un nuevo ajuste a la baja a los 30 y 60 días, sin ser aún en esas fechas cifra como en los niños mayores de un año, donde se considera normal por debajo de 50-100 µg/g.

Se han representado en la tabla 7 y en la figura 12 las cifras de calprotectina en los días 4, 8, 15, 30 y 60 y finalmente de forma global, diferenciando las muestras de prematuros sanos y enfermos, reflejando las medias, medianas y desviación típica. Cabe destacar la clara elevación, con diferencias significativas desde el punto de vista estadístico, de la calprotectina de los RNPT enfermos frente a los sanos en todos los días. A los 60 días, los resultados son poco valorables para enfermos pues sólo dos pacientes tuvieron algún episodio significativo de enfermedad (intestinal o sistémica). Por último, realizando las medias de calprotectina de los recién nacidos prematuros agrupándolos según estén enfermos o sanos, se obtiene una comparación de medias que demuestra que las diferencias no se deben al azar, como apuntamos previamente.

Tabla 7. Estadísticos descriptivos de las calprotectinas en los diversos días diferenciando entre RNPT sanos y enfermos

	Estadísticos	Calprotectina en RNPT SANOS	Calprotectina en RNPT CON PATOLOGÍA
DÍA 4	Nº muestras	58	14
	Media	289,24	619,36
	Mediana	242,50	630,50
	D. típica	183,659	284,420
	P25	148,25	402,25
	P75	432,50	797,50
	p	0,001	
DÍA 8	Nº muestras	66	16
	Media	176,82	504,44
	Mediana	139,50	470,50
	D. típica	132,469	372,643
	P25	67,75	130,25
	P75	241,25	710,75
	p	0,013	

DÍA 15	Nº muestras	60	20
	Media	219,75	545,85
	Mediana	178,00	401,00
	D. típica	171,839	429,239
	P25	96,25	287,75
	P75	312,75	664,75
	p	0,001	
DÍA 30	Nº muestras	49	7
	Media	163,27	678,00
	Mediana	128,00	539,00
	D. típica	125,17	764,13
	P25	72,50	120,00
	P75	236,00	881,00
	p	0'0001	
DÍA 60	Nº muestras	19	2
	Media	154,74	313,00
	Mediana	134,00	313,00
	D. típica	92,281	74,953
	P25	94,00	260,00
	P75	195,00	366,00
	p	0,374	
Todos los días	Nº episodios	92	38
	Nº muestras	252	59
	Media	204,61	552,82
	Mediana	177,25	473,50
	D. típica	402,83	111,98
	P25	127,33	322,12

	P75	278,62	671,00
	p	0,0001	

En la tabla 8 se aprecian los estadísticos descriptivos de las calprotectinas, separando los sanos de los enfermos entre sí y aplicando comparaciones entre sanos en los diferentes momentos.

La media de calprotectina a los 4 días de vida es discretamente más elevada que en los demás días siguientes, con diferencias estadísticamente significativas frente a los días 8 y 30. La calprotectina en el día 8 en los RNPT sanos es mayor de forma estadísticamente significativa que a los 15 días.

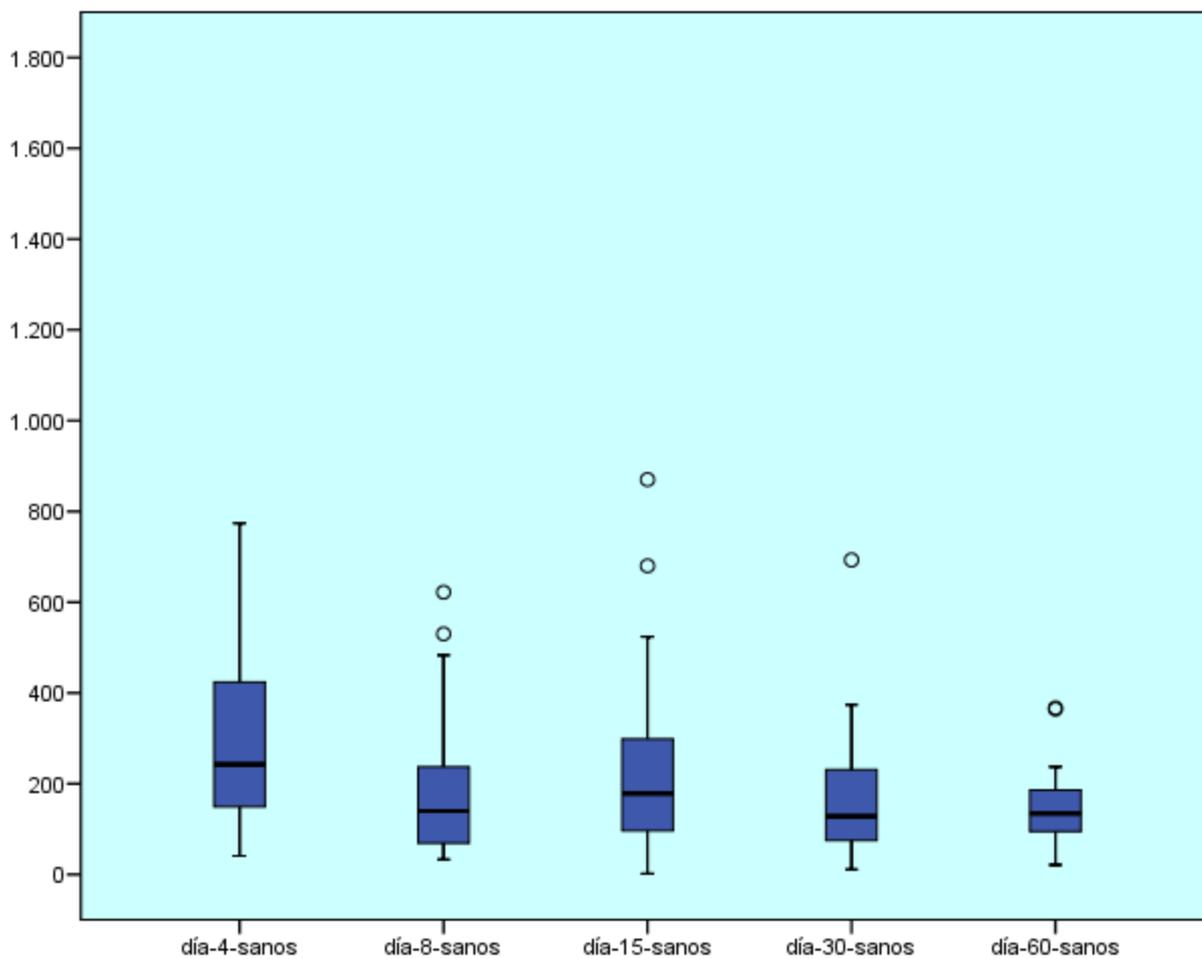
Teniendo en cuenta los periodos de tiempo en los que se reclutaron los pacientes, y de cara a una mejor reproductibilidad de los resultados, se analizaron por separado las muestras de pacientes sanos pertenecientes a los 3 periodos de recogida de las mismas en cada día por separado, siendo las medias de CF comparables en los días 4, 8 y 15.

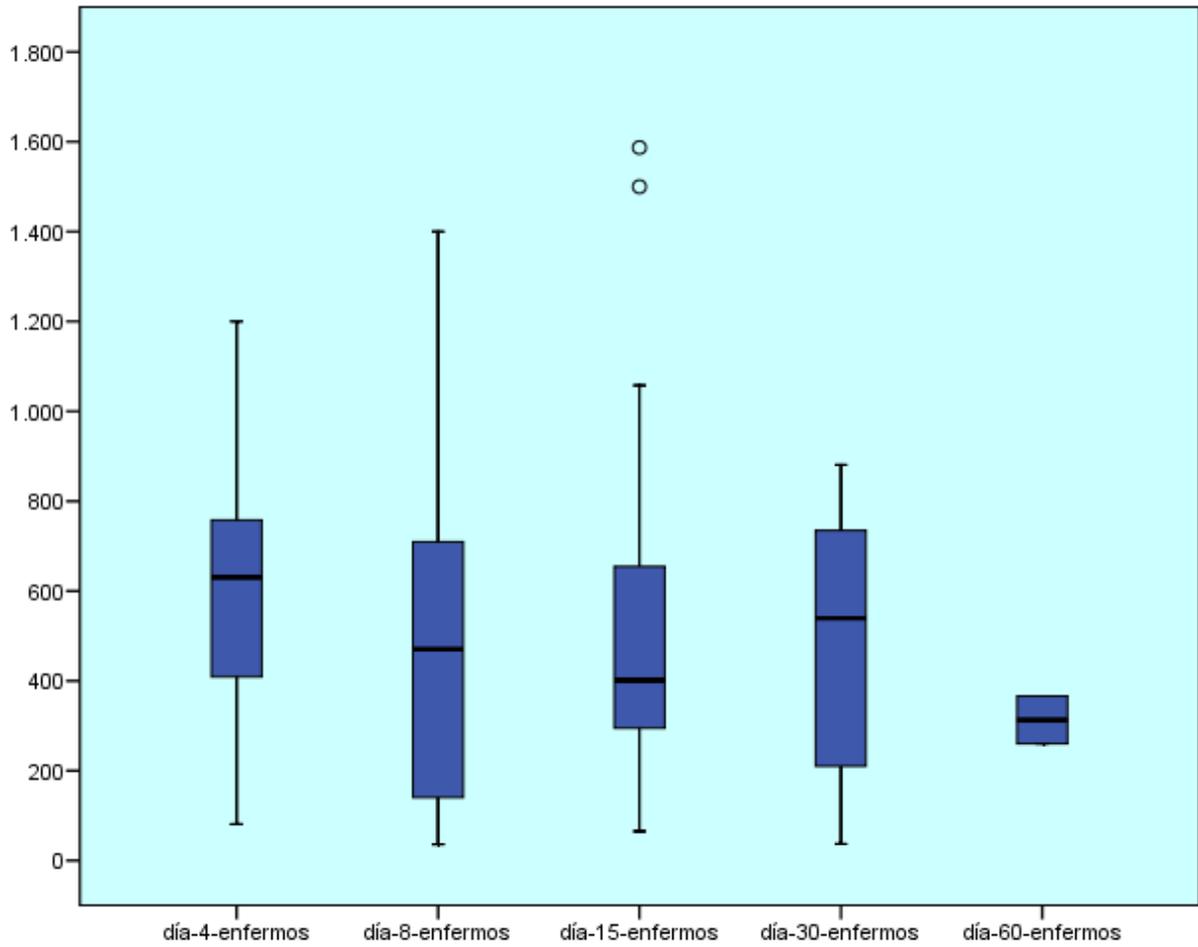
Tabla 8. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT enfermos y en RNPT sanos

	RNPT ENFERMOS				
	Día 4	Día 8	Día 15	Día 30	Día 60
Nº pacientes enfermos	14	16	20	7	2
Media	619,36	504,44	545,85	678,00	313,00
Mediana	630,50	470,50	401,00	539,00	313,00
Desviación típica	284,42	372,64	429,23	764,13	74,95
P25	402,25	130,25	287,75	120,00	260,00
P75	797,50	710,75	664,75	881,00	366,00
p sólo enfermos	ns				
	RNPT SANOS				
	Día 4	Día 8	Día 15	Día 30	Día 60
Nº pacientes sanos	83	81	77	90	95
Media	289,24	176,82	219,75	163,27	154,74
Mediana	242,50	139,50	178,00	128,00	134,00
Desviación típica	183,65	132,46	171,83	125,17	92,28
P25	148,25	67,75	96,25	72,50	94,00
P75	432,50	241,25	312,75	236,00	195,00
p sólo para los RNPT sanos	<p>p (día 4, día 8) = 0,001</p> <p>p (día 4, día 15) = 0,409</p> <p>p (día 4, día 30) = 0,008</p>				

	<p>p (día 4, día 60) = 0,081</p> <p>p (día 8, día 15) = 0,025</p> <p>p (día 8, día 30) = 0,758</p> <p>p (día 8, día 60) = 0,667</p> <p>p (día 15, día 30) = 0,543</p> <p>p (día 15, día 60) = 0,359</p> <p>p (día 30, día 60) = 0,883</p>
--	--

Figura 12. Valores de calprotectina en los diferentes días de extracción en RNPT sanos (A) y en RNPT enfermos (B)





3. CORRELACIÓN DE VARIABLES ESTUDIADAS CON CIFRAS DE CALPROTECTINA FECAL EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINOS SANOS.

Se ha representado en las tablas 9 a 13 las cifras de calprotectina en los días 4, 8, 15 y 30, reflejando las medias y desviaciones típicas, y se han puesto en correlación con diversas variables clínicas como edad gestacional, alimentación predominante y peso al nacimiento. Para la edad gestacional se han hecho en dos cortes, uno según el recién nacido fuera mayor de 28 semanas y el otro según fuera menor de 30 semanas.

Tabla 9. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según tipo de parto

Tipo de parto	Estadísticos	día-4-sanos	día-8-sanos	día-15-sanos	día-30-sanos
cesárea	Media	277,93	182,59	253,33	125,59
	Desv. típ.	174,35	157,39	223,96	92,40
vaginal	Media	381,67	171,00	130,50	184,33
	Desv. típ.	306,06	165,46	16,26	98,33
Total	Media	288,30	181,79	243,88	134,40
	Desv. típ.	186,32	154,88	217,42	93,11
p		ns	ns	ns	ns

Tabla 10. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según tipo de lactancia predominante

LM o FP	Estadísticos	día-4-sanos	día-8-sanos	día-15-sanos	día-30-sanos
LM	Media	302,47	155,38	227,08	154,96
	Desv. típ.	190,03	112,77	185,88	109,09
Fórmula adaptada	Media	267,59	214,33	207,09	174,33
	Desv. típ.	174,85	156,89	147,71	145,99
Total	Media	289,24	176,82	219,75	163,27
	Desv. típ.	183,65	132,46	171,83	125,17
p		ns	ns	ns	ns

Tabla 11. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según Corte de edad gestacional en 30 semanas

EG > 0 < 30 semanas		día-4- sanos	día-8-sanos	día-15- sanos	día-30-sanos
< 30 sem	Media	261,00	153,04	204,73	162,05
	Desv. típ.	203,20	137,29	163,46	108,11
≥ 30 sem	Media	299,09	189,53	228,45	164,26
	Desv. típ.	177,84	129,65	178,07	139,58
Total	Media	289,24	176,82	219,75	163,27
	Desv. típ.	183,65	132,46	171,83	125,17
p		ns	ns	ns	ns

Tabla 12. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos corte de edad gestacional en 28 semanas.

EG < o > 28 semanas		día-4- sanos	día-8- sanos	día-15-sanos	día-30-sanos
≤ 28 semanas	Media	314,50	184,43	165,75	145,71
	Desv. típ.	247,73	164,40	194,17	111,00
> 28 semanas	Media	283,69	177,16	233,25	170,29
	Desv. típ.	175,68	124,34	165,26	131,27
Total	Media	288,02	178,72	219,75	163,27
	Desv. típ.	185,05	132,58	171,83	125,17
p		ns	ns	ns	ns

Tabla 13. Estadísticos descriptivos de los diversos días en RNPT sanos según el peso al nacimiento fuera mayor o menor de 1500 gramos

Peso < o > de 1500 g		día-4-sanos	día-8-sanos	día-15-sanos	día-30-sanos
<1500 g	Media	284,90	156,20	166,95	171,49
	Desv. típ.	179,22	139,67	135,47	135,73
≥1500 g	Media	294,22	210,64	333,68	131,20
	Desv. típ.	191,93	114,42	189,61	65,90
Total	Media	289,24	176,82	219,75	163,27
	Desv. típ.	183,65	132,46	171,83	125,17
p		ns	ns	0,0002	ns

4. CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA CALPROTECTINA FECAL EN SEPSIS NOSOCOMIAL

En la tabla siguiente se aprecian los pacientes que han tenido algún proceso de enfermedad más allá del día 4, fecha del primer cierre intestinal, y que tenían muestra de heces en la fecha inmediatamente anterior, con el objetivo de ver si antes del diagnóstico del proceso patológico ya había elevación de la calprotectina. Se aprecia que de los 38 pacientes que han sufrido enfermedad, hay 19 pacientes con cuadros de sepsis nosocomial bajo criterios actuales (19,58% de incidencia de sepsis nosocomial en nuestra serie) y 12 de ellos han tenido sepsis nosocomial en los primeros 60 días de vida y han tenido recogida una muestra de heces para calprotectina en los días inmediatamente anteriores. De esos 12 casos (tabla 14), hay dos con calprotectinas previas normales (una de 136 $\mu\text{g/g}$ extraída 5 días antes y una de 123 $\mu\text{g/g}$ extraída 9 días antes) y dos con calprotectinas levemente elevadas para la media de la fecha correspondiente (una de 242 $\mu\text{g/g}$ sacada 5 días antes del cuadro infeccioso y otra de 281 $\mu\text{g/g}$ sacada 2 días antes), siendo en los 8 casos restantes cifras bastante por encima de la media para la fecha (mediana de 723 $\mu\text{g/g}$), extraídas entre 1 y 7 días previos al inicio del cuadro infeccioso sistémico.

Tabla 14. RNPT con proceso de enfermedad por sepsis más allá del día 4 y que tuvieran muestra de calprotectina en la fecha inmediatamente anterior. Días en que estaban enfermos y cifra de calprotectina.

Número de paciente	Fecha de inicio de sepsis	Día de calprotectina inmediatamente anterior	Días entre muestra de heces y debut de proceso séptico	Cifra de calprotectina inmediatamente anterior (µg/g)
14	20	15	5	1500
16	20	15	5	242
20	34	30	4	365
21	18	15	3	327
22	17	15	2	281
29	37	30	7	881
31	33	30	3	2281
34	39	30	9	123
47	35	30	5	622
54	20	15	5	136
77	18	15	3	318
84	9	8	1	825

5. CURVAS ROC

En cuanto a la aplicación de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) en la calprotectina, se ha elegido los valores que puedan servir de posibles marcadores de riesgo de enfermedad en los diferentes días de vida, anticipándose a la aparición de la misma. En la tabla 15 se puede apreciar que en todos los casos el área bajo la curva (AUC) está por encima de 0,5 y para los puntos de corte representados se ha adjuntado la mejor sensibilidad y especificidad correspondientes posibles.

Tabla 15. Datos de la curva ROC para calprotectina a los 4, 8, 15 y 30 días, representando el punto de corte, su sensibilidad y especificidad aportada.

Marcador		Área bajo la curva	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad
Calprotectina	4 días	0,843	368,5	92,9%	72,4%
	8 días	0,786	388,0	71,4%	92,5%
	15 días	0,845	249,0	94,4%	73%
	30 días	0,969	297,5	100%	88,2%

V. DISCUSIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA

La prematuridad es la primera causa de morbimortalidad neonatal e infantil. El índice de nacimientos prematuros en Europa se sitúa en torno a un 5-10%, y es que no sólo varía entre distintos países sino que puede variar entre las diferentes Comunidades autónomas y entre los diferentes hospitales, llegando en Málaga a ser del 10 % del total de recién nacidos. El aumento paulatino de la tasa de prematuridad registrado es sobre todo debido al aumento de los denominados prematuros tardíos con EG de 34+0 a 36+6 s, manteniéndose relativamente estable el nacimiento de prematuros de EG inferiores (*Shapiro-Mendoza CK et al 2012*).

En el tiempo de duración de nuestro trabajo hubo unos 226 recién nacidos pretérmino que ingresaron, pero en algunos de ellos hubo falta de conocimiento por el equipo investigador y no pudieron ser reclutados, siendo finalmente seleccionados aleatoriamente 104 recién nacidos durante un periodo de recogida de 7 meses (repartido en distintos momentos temporales), que cumplieron los criterios de inclusión. Siete de ellos cumplía algún criterio de exclusión, siendo en 97 pacientes en los que pudo realizarse la recogida de las muestras a lo largo del periodo de seguimiento, obteniendo un total de 311 muestras válidas. A pesar de ello, tenemos un porcentaje no despreciable de muestras inválidas, el 35,8%, bien porque no hubiesen podido ser recoleccionadas por el personal sanitario, por haber sido recogida una cantidad insuficiente de heces, por fallecimiento del paciente una vez iniciada la recogida de muestras o por imposibilidad de seguimiento una vez dado el alta hospitalaria, siendo éste el principal motivo de las muestras no recogidas en el día 60 de análisis, donde se concentra casi la mitad de las muestras inválidas (43,6%), según podemos ver en la tabla 4.

Como ya describieron otros autores, hay una gran variación interindividual en las muestras, dependiendo de cómo sean recogidas, principalmente en lo relacionado con la absorción del líquido por el pañal, aunque autores como Olafsdottir et al refieren que eso incrementa en menos de un 30% la concentración de calprotectina fecal. En nuestro estudio este posible sesgo se solventa parcialmente ya que todas las muestras fueron recogidas de igual manera, por recolección de heces depositadas recientemente en el pañal, sin emplear el sondaje rectal en ningún caso.

Los recién nacidos incluidos en el estudio se encuentran en sus variables antropométricas dentro de los valores normales, pudiendo ser comparados con otras poblaciones similares. No hubo diferencias entre sexos. Según podemos ver en la figura 7, la edad gestacional media está en $30,1 \pm 2,2$ semanas, siguiendo una distribución normal con una

media de peso de 1321 ± 351 g acorde a la media de EG. Podemos apreciar que la frecuencia de prematuros tardíos incluidos en el estudio es menor que el grupo 28-33 semanas de EG, probablemente por la corta estancia o incluso la no necesidad de ingreso en la unidad neonatal. Aún así, más de la mitad de los prematuros incluidos en el estudio, el 63,9%, tienen una edad gestacional de 30 semanas o más.

Respecto al tipo de parto, la gran mayoría se realizó mediante cesárea, solo un 8,24 % fueron vía vaginal. Nuestro porcentaje de cesáreas es superior a lo publicado en la literatura, a pesar de la variabilidad entre distintas regiones y de que el número de cesáreas realizadas en los últimos años en partos prematuros ha ascendido. Según el proyecto MOSAIC (*Zeitlin et al 2010*) que abarca las tasas de cesárea en 10 regiones Europeas, el porcentaje medio de cesáreas realizadas en prematuros de 28 a 31 semanas de EG es del 65% , variando desde un 48,7% registrado en zona central y este de Holanda, al 87,4% de Hesse, en Alemania. Dicho porcentaje disminuye a mayor edad gestacional como muestra un estudio multicéntrico realizado en Australia entre 2007 y 2011 con porcentajes de cesárea del 50.9% a las 32– 33 semanas de EG (12 hospitales, rango 43.4–58.1%); y 36.4% a las 34–36 semanas (51 hospitales, rango 17.4–48.3%) (*Bannister et al 2015*).

En relación a la alimentación del recién nacido en los primeros 30 días de vida, según muestra la figura 11, poco más de la mitad de los recién nacidos estudiados tomaba lactancia materna de forma exclusiva (41,2%) o predominante (18,6%) frente a un 40,2% de fórmula adaptada exclusiva. Las cifras de lactancia materna exclusiva son inferiores a las deseadas puesto que en la época de realización del estudio no estaba implantado el suministro de leche materna donada procedente de banco, siendo en el año 2014 las cifras de lactancia materna exclusiva al alta en RNMBP de un 59%, y mixta del 76%.

2. CIFRAS NORMALES MÁS ELEVADAS EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO SANOS RESPECTO A NIÑOS-ADULTOS.

Los niveles de calprotectina fecal aceptados como normales en niños mayores de un año en la bibliografía son de $50 \mu\text{g/g}$ con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 83% para correlacionarlos con procesos inflamatorios intestinales (*Berni Canani R et al 2004, Costa F et al 2003*).

Como primer resultado destacable hemos de señalar, según se muestra en la tabla 5, la comprobación de las cifras más elevadas de calprotectina fecal en los primeros meses de la vida en los RNPT (92 episodios de salud; media 204,61 $\mu\text{g/g}$), lo cual coincide con lo publicado por numerosos estudios que corroboran estas cifras más elevadas en neonatos sanos, tanto a término como pretérminos (*Kapel et al 2010*). Dichos valores, medidos en distintos momentos, de calprotectina fecal por diversos estudios se muestran a continuación: RNAT: en las semanas 2-10 de vida en 27 RNAT sanos (media 277 $\mu\text{g/g}$) por Olafsdottir y col. (*Olafsdottir et al 2002*); en los días 3-7 en 69 RNAT sanos (mediana de 167 $\mu\text{g/g}$) por Campeotto y col (*Campeotto et al 2004*); en la 6ª semana en 20 RNAT sanos (mediana de 269 $\mu\text{g/g}$) por Rugtveit y col. (*Rugtveit et al 2002*). RNPT: en las semanas 1-8 en 52 RNPT <1500 gramos sanos (mediana de 253 $\mu\text{g/g}$, 9-1867) por Josefsson y col (*Josefsson et al 2007*); en la semana 2-7 en 19 RNPT <35 semanas sanos (mediana de 160 $\mu\text{g/g}$, 15-650) por Campeotto y col. (*Campeotto et al 2007*). Vemos con estas cifras la amplia variabilidad interindividual existente.

Los valores mayores de CF en los primeros meses de la vida comparados con niños mayores o adultos son el reflejo de una mayor permeabilidad intestinal que conduce a migración transepitelial de neutrófilos, resultando en un estado de **inflamación intestinal subclínica fisiológico**. En el RNPT se ha objetivado una permeabilidad mayor respecto al RNAT solo en primeros días de vida, no estando relacionada con la edad gestacional ni con el peso al nacimiento, igualándose posteriormente debido a la rápida adaptación intestinal del intestino del prematuro (*Van Elburg et al 2003*). No habiendo diferencias en las cifras publicadas en la literatura de CF en el RNPT y el RNAT en los primeros meses de vida.

3. CINÉTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL EN EL RECIÉN NACIDO PRETÉRMINO EN LOS PRIMEROS MESES DE VIDA

La variación de las cifras de calprotectina fecal en los primeros meses de la vida, consecuencia de la maduración intestinal y proceso de cierre intestinal que finaliza en tercer trimestre de la vida, ha sido muy estudiada en numerosos estudios en los últimos años, actualmente se siguen publicando estudios para evaluarla desde la prematuridad hasta el primer año de vida.

Desde los primeros en objetivarla en sus estudios como Olafsdottir y colaboradores en 2002 encontrando en el RNAT un descenso significativo de las cifras de CF medidas desde

la semana 2 a la semana 10, seguido por Rugtveit y col. en 2002 quienes plantearon la necesidad de establecer valores de referencia en diferentes grupos de edad estudiando niños desde las 6 semanas a los 5 años de edad, encontrando diferencias significativas en los distintos grupos de edad siendo las cifras más elevadas en los más jóvenes. Hasta artículos muy recientes que denotan la misma tendencia, como Li F y col. en 2015 quienes estudian las cifras de CF en 288 niños sanos de 1 a 18 meses ,estableciendo distintos grupos de edad, con valores promedio de 375.2 $\mu\text{g/g}$ (1–3 meses) y 217.9 $\mu\text{g/g}$ (3–6 meses) en los lactantes más pequeños, después los valores se reducen hasta aproximadamente 100 $\mu\text{g/g}$ (6–18 meses) en los lactantes mayores y niños pequeños. Las cifras de CF mostraron variar con la edad con una correlación negativa de forma significativa.

Si nos centramos en el RNPT, ha sido estudiada la cinética de CF desde Campeotto y col. en 2007 (posterior al inicio de nuestro estudio), en RNPT <35 semanas de EG con una muestra semanalmente desde ingreso al alta, no encontrando cambios significativos en los valores de CF a lo largo del primer mes de vida.

Por el contrario nuestro estudio, sí que muestra una cinética bien definida. Los valores de CF descienden a lo largo de los dos primeros meses de vida, lo que podría estar explicado por el proceso de maduración intestinal partiendo de un estado de permeabilidad intestinal aumentada de forma fisiológica en el recién nacido.

Tanto si tenemos en cuenta todas las muestras de nuestro estudio, considerando muestras pertenecientes a pacientes enfermos y sanos como se muestra en la tabla 6; como si consideramos sólo muestras pertenecientes a pacientes sanos según figura en la tabla 8; los datos muestran en ambos casos la misma cinética. Detalladamente en la tabla 8 vemos que en el grupo de pacientes sanos queda reflejada por una media de calprotectina a los 4 días de vida (media: 289 $\mu\text{g/g}$) más elevada que en los días siguientes, con diferencias estadísticamente significativas frente a los días 8 (media: 176 $\mu\text{g/g}$), momento que traduce un primer cierre intestinal, y posteriormente frente al día 30 (media: 163 $\mu\text{g/g}$).

Coincidiendo con lo publicado por Josefsson et al en 2007, nuestro estudio muestra un incremento de la calprotectina en el día 15 (219 $\mu\text{g/g}$) de forma estadísticamente significativa respecto al día 8 que podría estar justificado por una estimulación fisiológica de antígenos como son la alimentación enteral y colonización bacteriana intestinal. Josefsson et al evalúa a 52 RNPT <35 semanas de EG sin enfermedad gastrointestinal grave. Su estudio muestra un descenso significativo de los valores en la primera semana de vida (valores en semana 0 a semana 1: mediana 332 $\mu\text{g/g}$ vs 190 $\mu\text{g/g}$) seguido de un incremento significativo de la semana 1 a la 8 (mediana 253 $\mu\text{g/g}$). Nosotros, tras un primer tiempo de cierre intestinal, a

pesar de dicho ascenso del día 15, las cifras de calprotectina continúan descendiendo aún sin llegar a equiparse a las cifras de normalidad para niños mayores de un año.

4. INFLUENCIA DE VARIABLES COMO EL TIPO DE PARTO, TIPO DE ALIMENTACIÓN PREDOMINANTE, EDAD GESTACIONAL O PESO AL NACIMIENTO.

No podemos obviar variables tan importantes en este grupo de edad, como son el tipo de parto, el tipo de alimentación predominante, la edad gestacional o el peso al nacimiento.

Atendiendo al tipo de parto, como hemos comentado previamente, en nuestra muestra la gran mayoría se realizó mediante cesárea. Tras analizar las cifras de CF en cada día por separado, como muestra la tabla 9, no hay diferencias estadísticamente significativas atendiendo al tipo de parto. Estos resultados deben ser interpretados con cautela por el bajo porcentaje de partos vía vaginal.

Del mismo modo Rouge y col. en 2010 no encuentran correlación entre CF y tipo de parto en muestras analizadas en torno a 2ª semana de vida (47 RNPT: 16 cesáreas; 31 parto vaginal). Sin embargo, una correlación positiva entre las cifras de CF y el parto mediante cesárea fue corroborada por otros autores como Josefsson (52 RNPT: 24 cesárea; 10 parto vaginal), pero sólo en muestras recogidas a partir de la primera semana no siendo así en la primera muestra meconial tras el nacimiento, justificando esto por el retraso en una colonización por flora comensal documentada principalmente en el RNAT con parto por cesárea (*Josefsson S et al 2007*).

Atendiendo al tipo de lactancia predominante, son numerosos los estudios en la bibliografía que intentan relacionarla con las cifras de CF, sin ser dichos resultados esclarecedores. En nuestra muestra poco más de la mitad de los recién nacidos estudiados tomaba lactancia materna de forma exclusiva (41,2%) o predominante (18,6%) frente a un 40,2% de fórmula adaptada exclusiva (figura 11). Consideramos importante su análisis por el papel que juega la alimentación enteral en el proceso de adaptación y maduración intestinal.

Como muestra la tabla 10, tras analizar en cada uno de los días por separado, las cifras de CF según correspondiesen a muestras de recién nacidos que tomaban fórmula adaptada o lactancia materna de forma predominante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo las cifras de CF menores en grupo de lactancia materna comparado con el de fórmula sólo en los días 8 y 30.

El hecho de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, refleja que más que el tipo de alimentación enteral es la situación de inanición intestinal, frecuente en unidades neonatales, la que perjudica de forma directa al trofismo intestinal.

Del mismo modo, son numerosos los estudios que mantienen que las cifras de CF no dependen del tipo de alimentación, tanto en RNAT (*Campeotto F et al 2004; Rosti L et al 2011*) como en RNPT (*Josefsson S et al 2007; Yang Q et al 2008; Campeotto F et al 2007*).

Por el contrario hay estudios que sí que establecen una influencia del tipo de alimentación en las cifras de CF, sin un sentido claro.

Por un lado, autores como Rouge y col. 2010 en 47 RNPT describen cifras de CF más elevadas en alimentados con fórmula exclusiva o predominante vs lactancia materna (266 vs 126 $\mu\text{g/g}$). Esto iría en consonancia con lo publicado anteriormente por Catassi y col. 1995 en RNAT y Taylor y col. en 2009 en RNPT respecto a la relación de la permeabilidad intestinal y tipo de alimentación durante el primer mes de vida. Establecen que aquellos recién nacidos alimentados exclusivamente con lactancia materna tienen cifras menores de permeabilidad intestinal respecto a los alimentados con fórmula, debido a los factores de la leche humana que favorecen el desarrollo de las uniones estrechas, y/o al daño que la fórmula artificial pueda ejercer en la mucosa intestinal.

Sin embargo, por otro lado hay autores que establecen una relación contraria. Ya sea en lactantes en primeros meses de vida donde el subgrupo con lactancia materna exclusiva tiene cifras de CF más elevadas respecto a aquellos con fórmula artificial, o mixta (Savino et al 2010, Feng Li et al 2014, Lee Y et al 2017; Asgarshirazivc M et al 2017); o en recién nacidos pretérmino, siendo Yoon JM y col. en 2014 quienes objetivan cifras de CF más alta en RNPT con alimentación mixta respecto a los alimentados exclusivamente con fórmula de forma estadísticamente significativa.

Otros parámetros también son estudiados en la literatura respecto a la alimentación. Se describe una correlación positiva de las cifras de calprotectina fecal con el volumen de alimentación enteral tolerada tras la primera semana de vida, una vez producido el primer

cierre intestinal (*Rouge C et al 2010; Josefsson S et al 2007*). Se argumenta que dichos resultados son consistentes con la teoría de que “antígenos” de la luz intestinal, como podrían ser la colonización por bacterias comensales y los antígenos de la dieta, inducen un estado de inflamación intestinal subclínica.

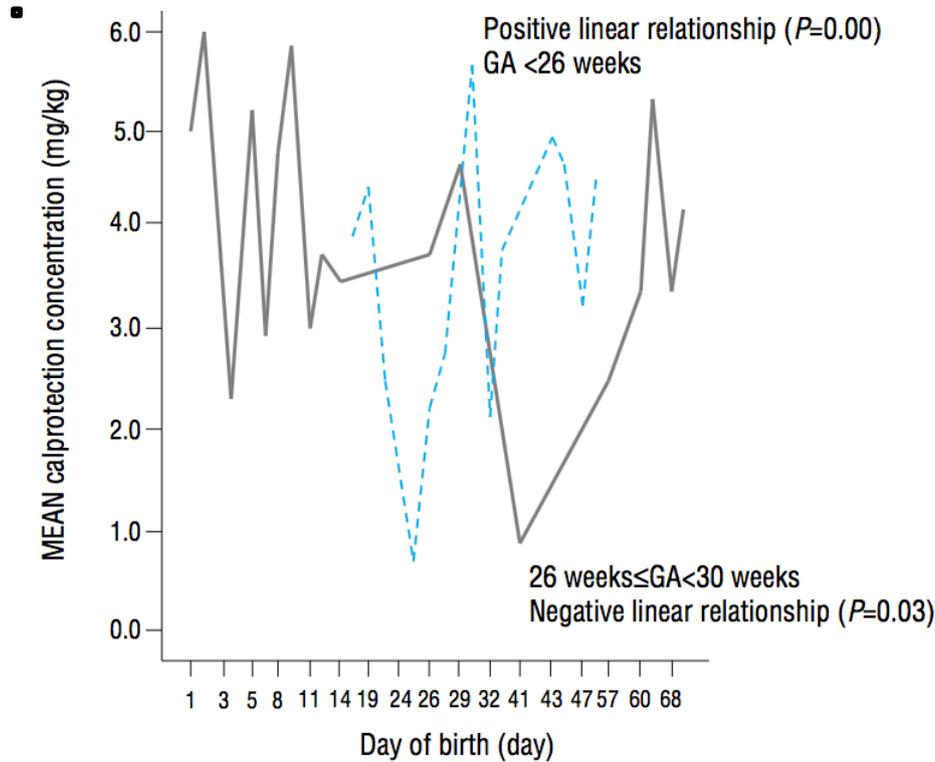
Atendiendo a la edad gestacional, la media de los recién nacidos incluidos en nuestro trabajo se sitúa en las $30,1 \pm 2,2$ semanas (Figura 7), siguiendo una distribución normal. La mayoría pertenece al grupo de $>28s$ (75,3% vs 23,7%), con un peso medio de 1435 g. Más de la mitad del total de los recién nacidos fueron ≥ 30 semanas (63,9%) con un peso medio de 1458 g.

Analizamos nuestros datos en cada uno de los días por separado y realizamos dos cortes en 28 y 30 semanas. Por un lado comparamos las cifras de CF en los recién nacidos ≤ 28 semanas respecto a los >28 semanas y por otro comparamos las cifras de los recién nacidos <30 semanas respecto a los ≥ 30 semanas. En cada uno de los grupos hubo una diferencia de peso en el corte establecido estadísticamente significativa (Figuras 9 y 10). En ningún caso se encontró una relación estadísticamente significativa de las cifras de CF con la edad gestacional según muestran las tablas 11 y 12, coincidiendo con lo publicado en la mayoría de los estudios en RN pretérminos (*Campeotto F et al 2007 y 2009; Aydemir O et al 2012, Yang Q et al 2008*).

Por el contrario un estudio reciente multicéntrico, HELIOS (*Zopelli L et al 2012*), tras estudiar la CF a 140 prematuros sanos $<1500g$, con muestras recogidas a días alternos durante 28 días, muestra la dependencia tanto de la edad gestacional como postnatal. Respecto a la cinética de la CF, las cifras descienden hasta el 8º día, y luego van en ascenso, a excepción de los prematuros <26 s cuyas cifras de CF continúan bajando, hecho que especulan podría ser por inadecuada respuesta inmune en los más prematuros. Respecto a la dependencia de CF con la edad gestacional hacen 3 grupos: <26 semanas; ≥ 26 y <29 s; ≥ 29 y <32 s; en primera semana de vida los prematuros mas extremos tienen cifras de CF más elevadas respecto a los prematuros de mayor edad gestacional, hecho que podría ser explicado por la inmadurez intestinal.

Un estudio más pequeño realizado por Yoon JM y col. en 2014 muestra la correlación entre cifras de CF y los días de vida tras el nacimiento en función de la edad gestacional (seguimiento durante 2 meses en 142 muestras de 12 RNPT), estableciendo una correlación positiva en el grupo de <26 s y negativa en el de $\geq 26s$ y $<30s$, contraria a lo comentado en el estudio anterior (figura 13).

Figura 13. Correlación de cifras de CF y días de vida según publicación de Yoon et al 2014.



Por último, y en lo referente al **peso al nacimiento**, el peso medio de los pacientes incluidos en nuestra muestra es de $1.321,2 \pm 531,1$ g siguiendo una distribución normal. La mayoría de los casos son <1500g (66%) (Figura 8).

Mostramos en la tabla 13 el análisis de las cifras de CF en cada día por separado, comparando prematuros con peso < o \geq de 1500 g. Se obtienen cifras de CF inferiores en los <1500 g respecto a los \geq 1500 g, en los días analizados dentro de las 2 primeras semanas de vida, siendo estadísticamente significativo únicamente en el día 15 de vida con cifras medias de 166,95 μ g/g vs 333,68 μ g/g hecho de que forma aislada en día 15 no le damos una interpretación relevante.

De la misma forma, el resto de estudios publicados (Aydemir O et al 2012; Campeotto F et al 2007) no encuentran relación entre las cifras de CF y el peso al nacimiento, a excepción de Campeotto y col. en 2009, que afirmando que no hay correlación significativa entre las cifras de CF y el peso al nacimiento, halla cifras significativamente inferiores de CF en RNPT con peso < 1800 g comparado con peso >1800 g (mediana de 200 vs 279 μ g/g).

En resumen, en nuestro trabajo los valores de calprotectina fecal en los recién nacido pretérmino sanos estudiados no se relacionan con el tipo de parto, tipo de alimentación predominante (lactancia materna o fórmula artificial), edad gestacional ni peso al nacimiento, a excepción de que, solo en el día 15, los RN de peso mayor o igual a 1500 gr tienen cifras de CF más elevadas respecto a los menores de 1500 g al nacimiento de forma estadísticamente significativa, no siendo así en el resto de días estudiados.

5. CIFRAS DE CALPROTECTINA FECAL EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINOS ENFERMOS RESPECTO A SANOS.

La calprotectina fecal, siendo un excelente marcador, con alta sensibilidad para monitorizar la actividad inflamatoria intestinal tanto en niños como en adultos, además cumple los criterios de test ideal: simple, poco costoso, seguro, no invasivo, con buena aceptación por parte de los pacientes y personal sanitario, objetivo, fidedigno y se modifica ante intervenciones terapéuticas pudiendo de ese modo valorar así su respuesta.

A día de hoy, y considerando su uso en las unidades neonatales, el principal inconveniente es la alta **variabilidad interindividual** en recién nacidos a término y prematuros sanos en el contexto de la **cinética** definida en esta etapa de la vida; y por otro su **menor especificidad** en definir la causa de la inflamación intestinal, hecho que cobra especial importancia en el neonato.

En nuestra serie el 39,1% (38/97) de los recién nacidos presentaron criterios de enfermedad, aportando la mayoría de ellos sólo una muestra al estudio (73,6%).

Si analizamos la patología representada por el grupo enfermo, la mitad de los pacientes enfermos (19/38) corresponden a pacientes que sufrieron episodios de sepsis nosocomial, seguidos por un 21% (8/38) de casos de SDR-I grave. Respecto a patología gastrointestinal (GIT), hubo un 15,7% de procesos de distres intestinal (6/38) y 2 ENC confirmada con estadio \geq IIA según la Clasificación de Bell modificada. Por último un caso de infección del tracto urinario. En esta distribución vemos que el peso recae principalmente en las sepsis nosocomiales.

En nuestro trabajo hemos corroborado que la media de las calprotectinas en RNPT en estado de salud es menor que en RNPT con patología intestinal o aquella que desencadena un SRIS. Sin encontrar diferencias en las cifras de CF de los enfermos en función de la patología presentada.

Tras analizar de forma conjunta todas las muestras de calprotectina extraídas en RNPT en condiciones adecuadas de salud y compararlas con las extraídas en condiciones de enfermedad se constata que las cifras en los enfermos son mayores a los sanos con gran significación estadística (tabla 5).

Teniendo en cuenta la cinética estudiada, analizamos las muestras correspondientes a pacientes sanos y enfermos en cada uno de los días analizados, corroborando cifras más altas de calprotectina fecal en muestras pertenecientes a pacientes enfermos de forma estadísticamente significativa tal y como podemos ver en la tabla 7; existiendo además una mayor dispersión de los datos en el grupo de enfermos respecto al grupo de sanos, no siendo en éste tampoco despreciable (figura 12). De esta forma excluimos el factor de la cinética estudiada, al comparar sanos y enfermos. Si comparamos la media de calprotectina de cada RNPT según sea sano o enfermo se puede comprobar igualmente que la de los enfermos es más elevada y con significación estadística.

Yang et al en 2007 fue el primero en correlacionar cifras elevadas de CF con prematuro enfermo o sano, sin centrarse en lo que a enfermedad GIT se refiere. A pesar de trabajar con una muestra pequeña de 14 RNMBP, de los cuales hubo 8 enfermos (<1500 gr; EG 23-30 s) y 114 muestras analizadas (recogidas diariamente o cada dos días, y agrupadas según la condición clínica) obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre sanos y enfermos. Objetivaron un incremento en las cifras de CF en respuesta a infección GIT o sistémica, o a una situación de estrés. Situaciones que traducían un aumento de permeabilidad en la mucosa intestinal. Al igual que en nuestro trabajo, las cifras de CF presentaron una mayor dispersión en el grupo enfermo. Obtuvieron cifras de CF<350 µg/g en 3 pacientes con síntomas menores (postoperatorio de ductus arterioso persistente, intolerancia alimentaria e infección de tracto urinario) y cifras de CF>350 µg/g en 5 pacientes con lesión gastrointestinal más grave (rectorragia, perforación intestinal, distensión abdominal con hipotensión y estudio digestivo alto con contraste), mostrando dichas cifras un descenso tras inicio de tratamiento. Sugiriendo dichos resultados que la CF podría indicar la severidad del proceso GIT y monitorizar la respuesta al tratamiento en el RNMBP.

6. DISTRÉS INTESTINAL Y ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE

Desde el inicio de nuestro estudio la mayoría de los trabajos publicados posteriormente sobre calprotectina fecal como biomarcador diagnóstico, se han centrado en la patología gastrointestinal, teniendo como punto de mira la ECN.

En nuestro trabajo tenemos 2 casos confirmados de ECN según la clasificación modificada de Bell y 6 catalogados como distrés intestinal.

Hemos de destacar que en ambos procesos de ECN la CF permanece elevada durante 20-30 días hasta igualarse a la de los prematuros sanos, más prolongado que en el resto de patologías, donde permanece elevada durante 10-20 días.

Debemos tener en cuenta que la recogida de muestras se realizó en distintos periodos separados ampliamente en el tiempo, por lo que son diversos los factores que influyen, principalmente los cambios en la práctica clínica diaria por parte de los profesionales sanitarios; y es que son los protocolos de alimentación estandarizados uno de los factores clave en las estrategias de prevención de ECN.

De hecho, los 2 casos confirmados se produjeron en los dos primeros periodos de recogida de muestras, que abarca una muestra de 80 pacientes, mientras que no tenemos ningún caso registrado en el último periodo realizado en 2013 con una muestra de 17 pacientes, en el cual se había introducido un nuevo protocolo de alimentación para los RNMBP adaptándolo a las últimas recomendaciones (*Espinosa Fernández et al 2014*). Todo esto interpretado con cautela, debido al bajo número de casos.

A continuación haremos referencia a los principales estudios llevados a cabo en los últimos años, que estudian a la calprotectina como biomarcador diagnóstico y de ayuda en el manejo clínico de la enterocolitis necrotizante.

Numerosos estudios de la literatura sitúan a la CF como un **marcador de inflamación intestinal** tanto en el recién nacido a término (*Olafsdottir E et al 2002; Rhoads JM et al 2009; Baldassare ME et al 2010; Kapel N et al 2005*) como en el pretérmino (*Carroll D et al 2003; Josefsson S et al 2007; Campeotto F et al 2007 y 2009; Yang Q et al 2008*).

En el recién nacido pretérmino, dentro del llamado distrés intestinal, son numerosos los hechos que conducen a la interrupción de la alimentación enteral, como distensión abdominal, sangrado GIT, u otros. Las pruebas clínicas y radiológicas pueden fortalecer el diagnóstico, pero en otros casos son inconcluyentes, particularmente cuando se trata de

diferenciar estadios tempranos de NEC y otras enfermedades gastrointestinales.

Las cifras de CF se elevan en prematuros con intolerancia alimentaria. (Moussa et al 2016). Campeotto et al en 2009 establece una **correlación entre las cifras de CF y la severidad del distres intestinal**. De un total de 126 pretérmino <33 semanas recoge muestras semanalmente desde primera semana hasta completar 1º mes de vida (Sanos: 95; Enteropatía leve: 24; ECN IIB o III: 7). Establece puntos de corte para diferenciar enteropatía leve vs sanos (363 µg/g, sensibilidad 65%, especificidad 82%); y NEC vs sanos (636 µg/g, sensibilidad 72%, especificidad 95%), con sensibilidades que no podemos considerar lo suficientemente altas si queremos excluir de forma razonable el diagnóstico de ECN. Otros autores como Josefsson y col. en 2007 proponen un punto de corte mucho más alto, CF>2000 µg/g, para diferenciar ECN en población de RNMBP sin enfermedad GIT grave.

Dicha correlación de las cifras de CF con la gravedad del proceso intestinal, puede verse también dentro del grupo de ECN, Albanna EA y col. en 2014 tras estudiar un grupo de recién nacidos con diagnóstico de ECN, evidenció un incremento en los niveles de CF según aumentaba la severidad de la misma.

Todos los estudios publicados (*Albanna EA et al 2014; Campeotto F et al 2009; Josefsson S et al 2007; Carroll D et al 2003; Yoon JM et al 2014; Aydemir O et al 2014; Zoppelli Let al 2012*) encuentran cifras más altas de CF en pacientes con ECN respecto a controles sanos. Sin embargo Selimoglu y col. en 2012 no encuentran diferencias en las cifras de CF en RN con ECN (14 RN, de ellos 12 pretérmino) vs controles sanos de la misma EG, y apuntan que podría ser por el estadio temprano de la enfermedad ya que recogen las muestras justo tras la sospecha clínica, siendo 11 de los 14 pacientes ECN estadio I de Bell (sospecha de ECN).

Destacamos a Reisinger KW y col. en 2012 quienes plantean el papel de la CF como **marcador diagnóstico de ECN en pacientes con sospecha clínica previa**. Encuentran valores de CF significativamente más altos en el grupo de ECN respecto al grupo con otro diagnóstico final, con un punto de corte de CF > 286,3 µg/g (S 81%; E 79%), área bajo la curva de 0,82. La asociación de CF con I-FABP, proteína intestinal unida a ácidos grasos, aumenta el AUC a 0,95 con un punto de corte con S 94% y E 79%. Es de mencionar que en el grupo No-ECN la mitad de los diagnósticos son sepsis confirmadas, lo que difiere de los resultados encontrados en nuestro estudio donde no objetivamos diferencia alguna en las cifras de CF entre los distintos grupos de enfermedad. Datos mejores de sensibilidad respecto al estudio anterior aportó Zopelli et al en 2012, para discriminar una ECN al inicio de los síntomas de otros trastornos intestinales con punto de corte más bajo en 210 µg/g (S 89%; E 84%) considerando RNPT ≤26 semanas, que en base a los valores predictivos concluye en la

utilidad de la CF como biomarcador para descartar ECN, no para confirmarla.

El factor fundamental para el éxito del tratamiento de la ECN es el diagnóstico precoz, realizado hasta el momento en base a datos clínicos y radiológicos poco específicos. Con el objeto de usar la CF en ese **diagnóstico precoz**, distintos estudios como Zoppelli et al 2012 y Däbritz et al 2012 analizan la capacidad predictiva de la CF estudiando en RNMBP las cifras de CF horas previas al diagnóstico clínico de ECN moderada-grave. Objetivan una elevación estadísticamente significativa 12-48 h previas al inicio de la clínica en ECN respecto a controles sanos, excepto Zoppelli y col. que no encuentran elevación en las cifras de CF en ECN de curso fulminante, ni previamente ni una vez diagnosticada; con puntos de corte de CF $>110 \mu\text{g/g}$ 24 h antes del inicio de la clínica para diferenciar ECN moderada de pacientes sanos con un alto valor predictivo negativo y de $<24 \mu\text{g/g}$ para diferenciar ECN fulminante diagnosticada vs pacientes sanos.

Hemos de destacar que las cifras arrojadas en el estudio de Zoppelli et al son considerando grupo de RN <26 semanas de edad gestacional. Establecen una dependencia de la CF con la EG, siendo este grupo los que muestran cifras más bajas de CF, comparado con los de mayor edad gestacional, deducimos que por dicho motivo sus puntos de corte son más bajos, si los comparamos con el resto de estudios.

Del mismo modo, ningún estudio establece una edad postnatal para el punto de corte establecido, lo que se vería influenciado por la cinética descrita previamente.

Ha sido evaluado el papel de la CF no solo en el diagnóstico, sino también como **marcador pronóstico**, es decir para predecir la severidad de la ECN. Aydemir O y col. en 2012 estudian a un grupo de 25 RNMBP con diagnóstico de ECN y los empareja con controles por peso al nacimiento, EG y edad al diagnóstico (todos en primer mes de vida). Recoge muestras al inicio de la clínica y 3-5 días más tarde. Concluye que la CF no es útil para predecir la severidad de la enfermedad al inicio del diagnóstico (obtienen cifras similares en ECN estadio II y III en las muestras recogidas al inicio de la clínica) sin embargo, en el seguimiento **se correlaciona bien con la progresión de la enfermedad** (obtienen cifras menores de CF en las muestras extraídas de 3-5 días más tarde pertenecientes a ECN estadio II respecto a las pertenecientes a estadio III de forma estadísticamente significativa), coincidiendo en esto con otros autores (*Yang Q et al 2008*). Por otro lado, establecen una correlación entre las cifras de CF y otros marcadores de inflamación sistémicos como Il-6 y proteína C reactiva en recién nacidos con ECN.

Josefsson et al no establece correlación entre cifras de CF y PCR en su grupo control (no enfermedad GIT severa), sugiriendo que la infección sistémica no afecta a las concentraciones de CF en ausencia de enfermedad GIT severa, justamente lo que sí se

demuestra con nuestros datos.

Como hemos podido ver la evidencia actual sobre el uso de la CF en la unidades neonatales se basa principalmente en su utilidad como marcador diagnóstico de ECN, siendo la mayoría de los estudios a pequeña escala con una evidencia bastante limitada.

Nuestro estudio evidencia la inespecificidad de la CF como marcador diagnóstico de enfermedad GIT de modo exclusivo, elevándose igualmente en procesos sépticos. Por ello creemos que son necesarios más estudios con una perspectiva del uso de CF como marcador diagnóstico no solo de enfermedad gastrointestinal sino también de procesos que desencadenen un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en el prematuro. Orientados hacia una detección precoz en pacientes asintomáticos y monitorización de la evolución.

7. SEPSIS NOSOCOMIAL

La infección nosocomial (IN) es una de las principales causas de morbilidad prevenibles en el recién nacido prematuro; incrementa la gravedad de las patologías, la estancia y el gasto hospitalario, y afecta negativamente a su desarrollo y crecimiento.

Es por ello que son distintos los sistemas de vigilancia de infección nosocomial distribuidos a nivel mundial. A nivel nacional en 1995 se creó en España el grupo de Hospitales Castrillo dedicando su actividad al estudio de las infecciones peri-neonatales. Otros son National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS), European Neonatal Network (EuroNeoNet) EuroNeoKiss, Vermont-Oxford Neonatal Network, Neonatal Research Network (NICHD)... todas con un mismo objetivo la prevención de la IN.

La incidencia de la IN está inversamente relacionada con la edad gestacional y el peso al nacimiento. El grupo de los recién nacidos de muy bajo peso (RNMBP) (<1.500 g) es el que presenta una mayor susceptibilidad frente a las infecciones. La sepsis nosocomial en este grupo es una complicación frecuente y grave, que aumenta la mortalidad, la morbilidad, la necesidad de intervenciones de soporte vital invasivo, las discapacidades a largo plazo y el tiempo de hospitalización (Stoll BJ et al 2002). En los RNMBP, la sepsis representa aproximadamente la mitad de las muertes después de la segunda semana de vida (Stoll BJ et al 2003). En España, un estudio multicéntrico mostró una tasa de incidencia de sepsis nosocomial del 15,6% en RNMBP (donde éstos suponen el 6,7% de los recién nacidos estudiados), frente al 1,16% en los niños con un mayor peso al nacer ingresados en servicios

de neonatología, y una tasa de mortalidad más alta, del 17,3 frente al 6,5% (*López Sastre JB et al 2002*).

En nuestro trabajo, con una muestra donde el 66% son <1500gr, observamos que el porcentaje de neonatos pretérminos y, al menos, una IN durante su estancia es de 19,5%. Otros estudios centrados en RNMBP, como el informe anual de SEN 1500 de 2015 recoge una incidencia del 31,3% de sepsis tardías (confirmadas 26,7%) o el de Geffers y col. (*Geffers C et al 2008*) (NEO-KISS) señala un porcentaje de IN del 25,7%, con una densidad de incidencia de 8,3 sepsis/1.000 días por paciente, que desciende a 4,7/1.000 días por paciente en un estudio más reciente (*Leistner R et al 2013*). En el artículo de Stoll et al 2003, el NICHD presenta unas cifras de sepsis nosocomial de entre el 10,6 y el 31,7%, según los centros (media de un 21% de RNMBP, con al menos una infección nosocomial durante su estancia), con densidades de incidencia 5,4-1,87/1.000 días de hospitalización, según la estratificación por peso.

Esta gran variabilidad entre los resultados se puede explicar por las distintas definiciones de IN que cada grupo adopta para su estudio.

En nuestro caso hemos incluido como IN las que **se presentan a partir de las 72 horas de vida, y que cumplen una serie de criterios clínicos y de laboratorio, entre los cuales no es imprescindible el aislamiento de un germen en un cultivo de un líquido corporal estéril** (sospecha clínica de sepsis), dada la escasa rentabilidad de los hemocultivos en este grupo de pacientes (sólo se identifica un patógeno en el 45-50% de todas las IN) (*Schwab F et al 2007*) y su difícil interpretación en algunos casos. En nuestro estudio se identificó un patógeno en el 57% de las sepsis, y el más frecuente fue *S. epidermidis*.

Debido a la relevancia del problema, ya que como anteriormente se ha expuesto, es una de las causas más importantes de morbimortalidad y prolongación de estancia en las unidades de cuidados intensivos neonatales, es muy importante su correcto diagnóstico. Aunque el inicio de la enfermedad suele ser discreto, el curso clínico puede ser fulminante, llevando a un shock séptico, coagulación intravascular diseminada y muerte dentro de las primeras horas del inicio de las manifestaciones clínicas. El diagnóstico precoz no es tarea fácil. Los signos y síntomas tempranos son a menudo sutiles e inespecíficos pudiendo ser malinterpretados a causa de una taquipnea transitoria del recién nacido, una fluctuación de la temperatura corporal inducida ambientalmente, apneas de la prematuridad...; y el cultivo sanguíneo como prueba gold estándar, tiene una escasa rentabilidad y su resultado no está disponible hasta pasadas al menos 48 horas. Es por ello, que un amplio espectro de marcadores diagnósticos ha sido evaluado para el diagnóstico de sepsis neonatal. Sin embargo, la mayoría de dichos marcadores son mediadores de la respuesta inmune adquirida,

la cual es todavía muy inmadura en el periodo neonatal (P Ng 2004). Por el contrario, la calprotectina es liberada por células de la inmunidad innata tras el contacto con el patógeno de forma inmediata (Striz I et al 2004). Hasta el momento solo se ha estudiado el papel de la calprotectina sérica, medida con un test ELISA (no en heces), para el diagnóstico de sepsis neonatal, una vez ésta es sospechada.

Terrin G y col. en 2011 fueron los primeros en plantear la calprotectina sérica como marcador diagnóstico en RNMBP de >72 h de vida con alta sospecha de sepsis y compararlo con otros marcadores comúnmente usados (recuento de leucocitos, ratio de neutrófilos inmaduros, plaquetas y PCR). Confirmaron valores de calprotectina sérica significativamente más elevados en pacientes con sepsis (no siendo imprescindible para su diagnóstico el cultivo de sangre positivo) respecto a grupo control en muestras recogidas dentro de la primera hora del inicio de los síntomas, con mayor sensibilidad y especificidad que el resto de marcadores diagnósticos estudiados. No encontraron influencia de variables como el peso al nacimiento, edad gestacional o la edad postnatal entre otras. Por tanto, se propone como un buen marcador para el manejo diagnóstico de RNMBP con sospecha de sepsis.

Del mismo modo, posteriormente Abdel-Maaboud M et al en 2012 reafirmaron la utilidad de la calprotectina sérica como marcador diagnóstico de sepsis, en este caso sepsis de inicio tardío en neonatos a término.

En neonatos con sospecha de sepsis, si diferenciamos aquellos con cultivo sanguíneo positivo de los que no se obtiene crecimiento de germen en el cultivo, también se objetivan cifras mayores de calprotectina sérica en los primeros de forma estadísticamente significativa (Decembrino L et al 2015).

En nuestro trabajo investigamos la utilidad de la calprotectina medida en heces en neonatos pretérmino clasificados como enfermos. La medición en heces es una técnica menos invasiva si la comparamos con una extracción sanguínea en un RNMBP. Nuestro objetivo no es sólo demostrar cifras más elevadas de dicho biomarcador en aquellos prematuros enfermos que apoyen el diagnóstico de sospecha, sino evaluar su capacidad predictiva de enfermedad de una forma no invasiva, teniendo en cuenta la cinética de la misma que traduce el proceso de maduración intestinal.

Es por ello que realizamos una evaluación de nuestra muestra de pacientes enfermos, atendiendo a las muestras recogidas de forma previa al inicio de los síntomas clínicos que hicieron sospecharla.

Como podemos ver en la tabla 14, de los 19 pacientes con cuadros de sepsis nosocomial, 12 de ellos tienen recogidas muestras previas al inicio de los primeros síntomas,

que como hemos repetidos en varias ocasiones son muy inespecíficos en el neonato tanto a término como pretérmino. Destacamos que el 66% (8/12) tienen cifras de calprotectina fecal muy por encima de la cifra normal para la fecha de extracción (mediana de 723), entre 1 y 7 días previos al inicio de los síntomas.

Esto abre una línea de trabajo para posteriores estudios de mayor envergadura, que planteen el uso de este biomarcador no invasivo para monitorizar a una población seleccionada de prematuros de riesgo para la detección precoz de procesos tan sutiles en su inicio como devastadores en su evolución como lo es la sepsis nosocomial.

8. CALPROTECTINA FECAL: EFICACIA COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA

Una vez que concluimos que los valores de CF son más elevados en los prematuros enfermos respecto a los prematuros sanos y que conocemos la cinética de dicho biomarcador, podemos calcular la eficacia de la calprotectina fecal como prueba diagnóstica de enfermedad sistémica o intestinal en dicha población de pacientes y en un momento determinado.

La utilización de curvas ROC sirve para establecer puntos de corte de las variables independientes que sirvan de predicción de aparición de enfermedad en el prematuro, con sensibilidades y especificidades que sean ajustadas al modelo.

Para la elección entre dos pruebas diagnósticas distintas, se recurre a las curvas ROC, ya que es una medida global e independiente del punto de corte. Por esto, en el ámbito sanitario, las curvas ROC también se denominan curvas de rendimiento diagnóstico. La elección se realiza mediante la comparación del AUC de ambas pruebas. Esta área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica. A modo de guía para interpretar las curvas ROC se han establecido los siguientes intervalos para los valores de AUC:

- [0.5, 0.6): Test malo.
- [0.6, 0.75): Test regular.
- [0.75, 0.9): Test bueno.
- [0.9, 0.97): Test muy bueno.
- [0.97, 1): Test excelente.

Destacamos la importancia de establecer los puntos de corte en función del momento de extracción de la muestra de heces, ya que como hemos podido comprobar los valores, tanto en pacientes sanos como enfermos, varían en los primeros meses de vida siguiendo una cinética bien definida.

Es por ello, que nosotros evaluamos la curva ROC para cada día en el que recogimos las muestras de CF, teniendo con ello en consideración la cinética marcada por la misma. Obteniéndose en todos los casos valores de AUC que califican a la calprotectina fecal como un buen test (0,78 - 0,96) para discriminar el proceso de enfermedad en el recién nacido pretérmino.

En función de dichas curvas presentamos los puntos de corte elegidos optimizando tanto sensibilidad (la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo) como especificidad (probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo) los cuales definen la validez del test (tabla 15):

En el día 4, con una probabilidad de que un determinado RNPT enfermo tenga una calprotectina mayor que uno sano del 84,3%, definimos un punto de corte en 368,5 $\mu\text{g/g}$ para clasificar como enfermo o sano con una sensibilidad del 92,9% y una especificidad del 72,4%.

En el día 8, con una probabilidad de que un determinado RNPT enfermo tenga una calprotectina mayor que uno sano del 78,6%, definimos un punto de corte en 388 $\mu\text{g/g}$ para clasificar como enfermo o sano con una sensibilidad del 71% y una especificidad del 92,5%.

En el día 15, con una probabilidad de que un determinado RNPT enfermo tenga una calprotectina mayor que uno sano del 84,5%, definimos un punto de corte en 249 $\mu\text{g/g}$ para clasificar como enfermo o sano con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 73%.

En el día 30, con una probabilidad de que un determinado RNPT enfermo tenga una calprotectina mayor que uno sano del 96,9%, definimos un punto de corte en 297,5 $\mu\text{g/g}$ para clasificar como enfermo o sano con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 88%.

Vemos que dichos puntos de corte, sobre todo en días 4, 15 y 30, se definen por un perfil de sensibilidad muy bueno, lo que nos discrimina fiablemente al grupo de RNPT al que tenemos que vigilar y monitorizar más de cerca valorando el conjunto de condiciones clínicas, de aquel prematuro realmente sano.

VI. CONCLUSIONES

1. Los niveles de calprotectina fecal en recién nacidos pretérminos sanos menores o iguales a 35 semanas de edad gestacional son mayores en comparación con las cifras de normalidad publicadas en niños y adultos.
2. Los valores de CF en la población estudiada en estado de salud, descienden en la primera semana de vida de forma significativa, para tras un leve incremento en el día 15, continuar su descenso progresivo hasta el día 60 momento en el que finaliza el seguimiento; sin llegar a equipararse a los valores de normalidad establecidos para niños.
3. Los valores de calprotectina fecal en los recién nacido pretérmino sanos estudiados no se relacionan con el tipo de parto, tipo de alimentación predominante (lactancia materna o fórmula artificial), edad gestacional ni peso al nacimiento.
4. Las cifras de calprotectina fecal son mayores en los prematuros enfermos, ya sea por un evento que desencadena un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica como por un proceso gastrointestinal, respecto a las cifras correspondientes a los prematuros sanos.
5. Se define a la calprotectina fecal como un buen test diagnóstico para el proceso de enfermedad gastrointestinal o aquel que desencadena un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en el prematuro. Se presentan distintos puntos de corte para el diagnóstico de enfermedad en función del momento temporal en el que se extrajo la muestra.
6. La calprotectina fecal podría ayudar al manejo clínico de determinadas enfermedades del neonato, precediendo su alteración a la clínica. Los valores de calprotectina fecal en nuestro trabajo se elevan entre 1 y 7 días antes de la aparición de los hallazgos que nos llevan al diagnóstico de sospecha de sepsis nosocomial.

7. Puede ser útil medir seriadamente la calprotectina fecal en una población seleccionada de riesgo para identificar precozmente a aquel recién nacido pretérmino enfermo y poder actuar en consecuencia con el objetivo de mejorar el pronóstico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014; 6:237-65.
2. Abdel-Maaboud M, El-Mazary AM, Osman AM. Serum calprotectin as a diagnostic marker of late onset sepsis in full-term neonates. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol* 2012;10(1):19–24.
3. Adland E, Fagerhol MK. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14(8):823-825.
4. Alexander VN, Northrup V, Bizzarro MJ. Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2011; 159(3):392–7.
5. Albanna EA, Ahmed HS, Awad HA. Stool calprotectin in necrotizing enterocolitis. *J Clin Neonatol* 2014;3:16–19.
6. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One* 2014; 9:e90784.
1. Asgarshirazivs M, Shariat M, Nayeri F, DaliliH, Abdollah A. Comparison of fecal calprotectin in exclusively breastfed and formula or mixed fed infants in the first six months of life. *Acta Medica iranica* 2017;55(1):53-58.
2. Aydemir O, Aydemir C, Sarikabadayi YU, Emre Canpolat F, Erdeve O, Biyikli Z, et al. Fecal calprotectin levels are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(11):2237-41.
3. Baldassare ME, Laforgia N, Fanelli M, Laneve A, Grosso R, Lifschitz C. Lactobacillus GG improves recovery in infants with blood in the stools and presumptive allergic colitis compared with extensively hydrolysed formula alone. *J Pediatr* 2010;156:397-401.
4. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J Pediatr* 1990;117(1 PT 2):6–13.

5. Bannister-Tyrrell M, Patterson JA, Ford J, Morris JM, Nicholl MC, Roberts CL. Variation in hospital caesarean section rates for preterm births. *The Australian and New Zealand Journal of obstetrics and Gynaecology* 2015; 55:350-356.
6. Bajwa NM, Berner M, Worley S, Pfister RE. Swiss Neonatal Network. Population based age stratified morbidities of premature infants in Switzerland. *Swiss Med Wkly* 2011;141:w13212.
7. Beach RC, Menzies IS, Clayden GS, Scopes JW. Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate. *Arch Dis Child* 1982; 57: 141-145. Editorial. Intestinal permeability. *Lancet*. 1985; 1:256-8.
8. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Kretinng JP, Marshall R, Barton L et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978;187:1-7.
9. Benahmed NA, Manene D, Barbot-Trystram L, Kapel N. Evaluation of Calfast immunochromatographic quantitative assay for the measurement of calprotectin in faeces. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*. 2014; 52 :143-145.
10. Berntzen HB, Fagerhol MK. L1, a major granulocyte protein; isolation of high quantities of its subunits. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990; 50: 769–774.
11. Berrington JE, Harn RI, Bythell M, Wright C, Emblton ND. Deaths in preterm infants: Changing pathology over 2 decades. *J Pediatr*. 2012; 160:49-531.
12. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev* 2010; 86(1):13–5.
13. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012;379:2162–72.

14. Blakely ML, Tyson JE, Lally KP, McDonald S, Stoll BJ, Stevenson DK et al. Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation in extremely low birth weight infants: outcomes through 18 months adjusted age. *Pediatrics* 2006; 117(4):680–7.
15. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1992;20:724-726.
16. Boyd CA, Quigley MA, Brocklehurst P. Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and metaanalysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2007;92(3):169–75.
17. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2001; 32:171-177.
18. Burri E, Manz M, Rothen C, Rossi L, Beglinger C, Lehmann FS. Monoclonal antibody testing for fecal calprotectin is superior to polyclonal testing of fecal calprotectin and lactoferrin to identify organic intestinal disease in patients with abdominal discomfort. *Clin Chim Acta* 2013; 416:41-7.
19. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derrieux S, Aubert-Jacquin C, Barbot L et al. High faecal calprotectin concentrations in newborns infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004;89: F353–F355.
20. Campeotto F, Kalach N, Lapillonne A, Butel MJ, Dupont C, Kapel N. Time course of faecal calprotectin in preterm newborns during the first month of life. *Acta Paediatr* 2007; 96: 1531–1533.
21. Campeotto F, Baldassarre M, Butel MJ, Viallon V, Nganzali F, Soulaines P, et al. Fecal calprotectin: cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48: 507–510.

22. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotizing enterocolitis. *Lancet* 2003;361:310 – 1.
23. Canani RB, Terrin G, Rapacciuolo L, Miele E, Siani MC, Puzone C, et al Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008 ;40(7):547-53.
24. Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1995;21(4):383-6.
25. Christensen RD, Gordon PV, Besner GE. Can we cut the incidence of necrotizing enterocolitis in half–today? *Fetal Pediatr Pathol* 2010;29(4):185–98.
26. Colomé G. Estudio de la permeabilidad intestinal en pretérminos y lactantes sanos menores de 4 meses [tesis doctoral]. Málaga: Universidad de Málaga; 2007.
27. Corpeleijn WE, Van Vliet I, Gast-Bakker DA, Van der Schoor SR, Alles MS; Hoijer M, et al. Effect of enteral IGF-1 supplementation on feeding tolerance, growth, and gut permeability in enterrally fed premature neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46:184-90.
28. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis* 2003;35:642-647.
29. Dabritz Jan, Jenke Andreas, With Stefan, Foell Dirk. Fecal phagocyte-specific S100A12 for diagnosing necrotizins entercolitis. *J Pediatr* 2012; 161:1059-64.
30. Dai D, Walker WA. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Advances in Pediatrics* 1999;46:353-382.

31. Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK, Scott H. Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin. *Am J Clin Pathol* 1985;84(1): 24-34.
32. Dharmani P, Srivastava V, Kisson-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens *J Innate Immun* 2009; 1(2): 123-135.
33. Decembrino L, De Amici L, Pozzi M, De Silvestri A, Stronati M. Serum Calprotectin: A Potential Biomarker for Neonatal Sepsis. *J Immunol Res* 2015;2015:147973.
34. Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2007;369(9573):1614–20.
35. Di Mauro A, Neu J, Riezzo G, Raimondi F, Martinelli D, Francavilla R, et al. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr* 2013; 39:15.
36. Dimmitt RA, EM Staley G, Chuang SM, Tanner TD, Soltau, RG Lorenz. Role of postnatal acquisition of the intestinal microbiome in the early development of immune function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51: 262-273.
37. Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, Fick GH, Verhoef M, Meddings JB. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(2):444-451.
38. Dominguez KM, Moss RL. Necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 2012;39:387-401.
39. Duffy, L.C. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *Journal of nutrition* 2000;130:432-436.
40. Eichenwald EC. Enterocolitis necrosante. En: Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR. *Manual de neonatología*. 6 ed:Barcelona: Wolters Kluwe Health España: 2010; p600-607.

41. Epelman M, Daneman A, Navarro OM, Morag I, Moore AM, Kim JH, et al. Necrotizing enterocolitis: review of state-of-the-art imaging findings with pathologic correlation. *Radiographics* 2007; 27:285-305.
42. Escobar GJ. What have we learned from observational studies on neonatal sepsis? *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:138-45.
43. Escobar GJ, Li DK, Armstrong MA, Gardner MN, Folck BF, Verdi JE, et al. Neonatal sepsis workups in infants $\geq 2,000$ grams at birth: A population-based study. *Pediatrics*. 2000;106:256-63.
44. Espinosa MG, Sánchez-Tamayo T, Moreno MC, Fernández V, Vallejo J, Tapia E, et al. New clinical practice guideline on enteral feeding in very low birth-weight infants; second part. *Nutr Hosp* 2014 Aug 1;30(2):329-37.
45. EXPRESS group. Incidence of and risk factors for neonatal morbidity after active perinatal care: extremely preterm infants study in Sweden (EXPRESS). *Acta Paediatr* 2010;99(7):978–92.
46. Fagerhol MK, Dale I, Andersson T. Release and quantitation of a leucocyte derived protein (L1). *Scand J Haematol* 1980;24:393–398.
47. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: Is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol* 1996;49(2): M74-M79.
48. Faingold R, Daneman A, Tomlinson G, Babyn PS, Manson DE, Mohanta A, et al. Necrotizing enterocolitis: assessment of bowel viability with color Doppler US. *Radiology* 2005;235:587–594.
49. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V, et al: Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 91:4855, 2003.
50. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkrans EA, Stark AR et al. NICHD Neonatal Research Network. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birth

- weight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(2):1471–8.
51. Feng Li, Jingqiu Ma, Shanshan Geng, Junli Wang, Fang Ren, Xiaoyang Sheng. Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin. *Early Hum Dev* 2014;90(9):471–475.
 52. Fischer JE, Seifarth FG, Baenziger O, Fanconi S, Nadal D. Hindsight judgement on ambiguous episodes of suspected infection in critically ill children: Poor consensus amongst ex-perts? *Eur J Pediatr*. 2003;162:840-3.
 53. Fitzgibbons SC, ChingY, Yu D, Carpenter J, Kenny M Weldon C et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg* 2009;44(6):1072–5.
 54. Forchielli. ML, Walker WA. The effect of protective nutrients on mucosal defense in the immature intestine. *Acta Paediatrica* 2005;94 (449) 74-83.
 55. Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of proinflammatory signaling in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32(2):100–6.
 56. Gaya DR, Lyon TD, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, et al. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *QJM* 2005;98: 435–441.
 57. Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, Gastmeier P. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. *J Hosp Infect* 2008; 68:214-221.
 58. Goldstein B, Giroir B, 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
 59. Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome* 2014; 2:38.

60. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(1):3-20.
61. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(1):2-8.
62. Haque KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:45-9.
63. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1093-7.
64. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *JPediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:61–7.
65. Henderson, P., Anderson, N. and Wilson, D. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:637–645.
66. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291(5505):881-884.
67. Horbar D, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, LaCorte M, et al. Trend in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics* 2002;110:143-51.

68. Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V. Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC). *Pediatr Res* 2008;63(2):117–23.
69. Henry MC, Moss RL. Necrotizing enterocolitis. *Annu Rev Med* 2009;60:111–24.
70. Indrio F, Neu J. The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics. *Curr Opin Pediatr* 2011;23(2):145–50.
71. Isaksen B, Fagerhol MK. Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *Mol Pathol* 2001;54:289-292.
72. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 2014; 63:559–66.
73. Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005;51:270–4.
74. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50(3):113-23.
75. Josefsson S, Bunn SK, Domellof M: Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:407–413.
76. Kamitsuka MD, Horton MK, Williams MA. The incidence of necrotizing enterocolitis after introducing standardized feeding schedules for infants between 1250 and 2500 grams and less than 35 weeks of gestation. *Pediatrics* 2000;105(2):379–84.
77. Kapel N, Campeonotto F, Kalach N, Baldassare M, Butel M-J, Dupont C. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *JPGN* 2010;51:542-547.
78. Kapel N, Roman C, Caldari D, Sieprath F, Canioni D, Khalfoun Y et al. Fecal tumor

- necrosis alfa and calprotectin as differential diagnostic markers for severe diarrhea of small infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:396 – 400.
79. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, et al. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6(10):1122-8.
80. Kelly D and Coutts. Early nutrition and the developmen of immune function in the neonate. *Proceedings of the nutrition Society* 2000;59:177-185
81. Kennedy KA, Tyson JE, Chamnanvanakij S. Rapid versus slow rate of advance- ment of feedings for promoting growth and preventing necrotizing enterocolitis in parenterally fed low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2:CD001241.
82. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica.* 3 ed. Barcelona: Elseviers; 2012.p 14.
83. Kim WY, Kim WS, Kim IO, Kwon TH, Chang W, Lee EK. Sonographic evaluation of neonates with early-stage necrotizing enterocolitis. *Pediatr Radiol* 2005;35:1056–1061.
84. King C. Enteral feeding. In: Jones E, King C, editors. *Feeding and nutrition in the preterm infant.* 1 ed. Oxford: Churchill Livingstone (Elsevier); 2005.p 103-112.
85. Kok L, Elias SG, Witteman BJ, Goedhard JG, Muris JW, Moons KG, et al. Diagnostic accuracy of point-of-care fecal calprotectin and immunochemical occult blood tests for diagnosis of organic bowel disease in primary care: the Cost-Effectiveness of a Decision Rule for Abdominal Complaints in Primary Care (CEDAR) study. *Clin Chem.* 2012 Jun; 58(6):989-98.
86. Kolho K, Turner D, Veereman-Wauters G, Sladek M, de Ridder L, Shaoul R, et al. Rapid test for fecal calprotectin levels in children with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:436–439.
87. Kramer MS and Kahuma R. The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2004;554:63-77.

88. Kudsk KA. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surg* 2002;183(4):390-398.
89. Kuschel CA, Harding JE. Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1:CD000343.
90. Langhoff-Roos J, Kesmodel U, Jacobsson B, Rasmussen S, Vogel I. Spontaneous preterm delivery in primiparous women at low risk in Denmark: Population based study. *BMJ* 2006; 332 (7547): 937-939.
91. Lee Y, Min C, Choi YJ, Jeong SJ. Delivery and feeding mode affects fecal calprotectin levels in infants <7 months old. *Early Human development* 2017;108:45-48.
92. Lehmann FS, Burri E, Beglinger C. The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. *Ther Adv Gastroenterol* 2015;8(1): 23–36.
93. Leistner R, Piening B, Gastmeier P, Geffers C, Schwab F. Nosocomial infection in very low birthweight infants in Germany: current data from de National Surveillance System NEO-KISS. *Klinische Pädiatrie* 2013;225:75-80.
94. Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Liu J, Zhang J, et al. Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months. *PLoS ONE* 2015;10(3): e0119574. doi:10.1371/journal.pone.0119574.
95. Lifschitz C, Shulman RJ. Intestinal permeability test: are the useful?. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;10:283-87.
96. Lin J. Too much short chain fatty acids cause neonatal necrotizing enterocolitis. *Med Hypotheses* 2004;62:291-293.
97. Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: Recent Scientific Advances in Pathophysiology and revention. *Semin Perinatol* 2008; 32:70-82.

98. López JB, Coto CD, Fernández CB. Grupo de Hospitales Castrillo. Neonatal sepsis of nosocomial origin: an epidemiological study from the Grupo de Hospitales Castrillo. *J Perinat Med* 2002;30:149-157.
99. López JB, Coto CD, Fernández CB, Grupo de Hospitales Castrillo. Neonatal sepsis of vertical transmission: An epidemiological study from the Grupo de Hospitales Castrillo. *J Perinat Med* 2000;28:309-15.
100. Lopez JB, Fernández B, Coto GD, Fraile M. Sepsis en periodo neonatal. *Ev Pediatr* 2008;4:68.
101. López JB, Pérez D. Definiciones de sepsis neonatal: un largo camino por recorrer. *An Pediatr (Barc)* 2006;65:525-8.
102. López-Sastre J, Fernández-Colomer B. Sepsis en el recién nacido. *An Pediatr Contin* 2005;3(1):18-27.
103. Madan JC, Farzan SF, Hibberd PL, Karagas MR. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. *Curr Opin Pediatr* 2012;24:753-9.
104. Stewart CJ, Marrs EC, Nelson A, Lanyon C, Perry JD, Embleton ND, et al. Development of the preterm gut microbiome in twins at risk of necrotising enterocolitis and sepsis. *PLoS One* 2013; 8:e73465.
105. Maheshwari A. Role of cytokines in human intestinal villous development. *Clin Perinatol* 2004;31:1-11.
106. Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, et al. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PLoS* 2011;6(6):e20647.
107. Martin CR, Caicedo RA, Walker WA. Development of the intestinal mucosal barrier. In: Neu J. *Gastroenterology and nutrition. Neonatology Questions and Controversies*. 2 ed. USA: Elsevier; 2012. p 39-58.
108. Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in

- necrotising enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal med* 2006;11: 369-377.
109. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Mathews TJ, Osterman MJ. Births: Final data for 2008. *National Vital Statistics Reports*. 2010; 59 (1).
110. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979; 95:89-98.
111. McCallie KR, Lee HC, Mayer O, Cohen RS, Hintz SR, Rhine WD. Improved outcomes with a standardized feeding protocol for very low birth weight infants. *J Perinatol* 2011;31(Suppl 1):S61-7.
112. McClure RJ, Newell SK. Randomized controlled study of digestive enzyme activity following trophic feeding. *Acta Paediatr* 2002;91:292-296.
113. McElhinney DB, Hedrick HL, Bush DM, Pereira GR, Stafford PW, Gaynor JW, et al. Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease: risk factors and outcomes. *Pediatrics* 2000;106(5):1080-1087.
114. McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003;88(1):F11-4.
115. Moreno JM. Flora bacteriana intestinal. *An Pediatr* 2006; 4(1):12-9.
116. Morgan J, Young L, McGuire W. Delayed introduction of progressive enteral feeds to prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;12:CD001970.
117. Morowitz MJ, Poroyko V, Caplan M, Alverdy J, Lu DC. Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 2010;125(4):777-85.
118. Murao S, Collart FR, Huberman E. A protein containing the cystic fibrosis antigen is an inhibitor of protein kinases. *J Biol Chem* 1989;264 (14):8356-60.

119. Neu J, Mackey AD. Neonatal gastrointestinal innate immunity. *Neoreviews* 2003;4(1):13-19.
120. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 2011; 364:255-4.
121. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* 2002;91:45–50.
122. Pastores SM, Katz DP, Kvetan V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Gastroenterol* 1996;91(9):1697-1710.
123. P Ng. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004; 89(3): F229–F235.
124. Putignani L, DelChierico F, Petrucca A, Vernocchi P, Dallapiccola B. The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res* 2014; 76:2–10.
125. Quail MA, Russell RK, Van Limbergen JE, Rogers P, Drummond HE, Wilson DC, et al. Fecal calprotectin complements routine laboratory investigations in diagnosing childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;15(5):756-9.
126. Rabinowitz JG, Siegle RL. Changing clinical and roentgenographic patterns of necrotizing enterocolitis. *AJR Am J Roentgenol* 1976; 126: 560–566.
127. Radillo O, Pascolo L, Martelossi S, Dal Bo S, Ventura A. Fecal Calprotectin: Diagnostic Accuracy of the Immunochromatographic CalFast Assay in a Pediatric Population. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(5):500-5.

128. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118(2):229-241.
129. Rao SC, Basani L, Simmer K, Samnakay N, Deshpande G, et al. Peritoneal drainage versus laparotomy as initial surgical treatment for perforated necrotizing enterocolitis or spontaneous intestinal perforation in preterm low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(6):CD006182.
130. Reisinger KW, Van der Zee DC, Brouwers HA, Kramer BW, Van Heurn LW, Buurman WA et al. Noninvasive measurement of fecal calprotectin and serum amyloid A combined with intestinal fatty acid-binding protein in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2012;47:1640-5.
131. Rhoads JM, Fatheree NY, Norori J, Liu Y, Lucke JF, Tyson JE, et al. Altered fecal microflora and increased fecal calprotectin in infants with colic. *J Pediatr* 2009;155:823-8.
132. Rooseth AG, KFareghol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectina in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27(9):793-8.
133. Ronnestad A, Abrahmsen TG, Medbo S, Reigstad H, Lossius K, Kaaresen PI et al. Late onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics*. 2005;115:269-76.
134. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of 111-indium labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroentrol* 1999;34:50-54.
135. Rosti L, Braga M, Fulcieri C, Sammarco G, Manenti B, Costa E. Formula milk feeding does not increase the release of the inflammatory marker calprotectin, compared to human milk. *Pediatr Med Chir* 2011;33:178-81.

136. Rouwe EV, Heineman E, Buurman WA, Ter Riet G, Ramsay G, Blanco CE. Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period. *Pediatr Res* 2002;51:64-70.
137. Rouge C, Butel MJ, Piloquet H, Ferraris L, Legrand A, Vodovar M, et al: Fecal calprotectin excretion in preterm infants during the neonatal period. *PLoS One* 2010; 5(6):e11083.
138. Rugtveit J, Fagerhol MK. Age-dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:323–324.
139. Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* 1999;69(5):1028S-34S.
140. Savino F, Castagno E, Calabrese R, Viola S, Oggero R, Miniero R. High Faecal Calprotectin Levels in Healthy, Exclusively Breast-Fed Infants. *Neonatology* 2010;97:299-304.
141. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T et al. Tight junctions and human diseases. *Med electron microsc* 2003;36:147-156.
142. Schelonka RL, Yoder BA, DesJardins SE, Hall RB, Butler J. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr* 1994;125:603-6.
143. Schwab F, Geffers C, Barwolff S, Ruden H, Gastmeier P. Reducing neonatal nosocomial bloodstream infections through participation in a national surveillance system. *J Hosp Infect* 2007; 65: 319-325.
144. Selimoğlu MA, Temel I, Yıldırım Ç, Ózyalın F, Aktas M, karabiber H. The role of fecal calprotectin and lactoferrin in the diagnosis of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Crit Care Med* 2012;13:452–4.

145. Sevastiadou S, Malamitsi-Puchner A, Costalos C, Skkouroliakou M, Briana DD, Antsaklis A et al. The impact of oral glutamine supplementarion on the intestinal permeability and incidence of NEC/septicemia in premature neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; 24:1294-300.
146. Shapiro-Mendoza CK, Lackritz EM. Epidemiology of late and moderate preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012;17(3): 120-154.
147. Sharma R, Hudak ML, Tepas JJ, Wludyka PS, Marvin WJ, Bradshaw JA et al. Impact of gestational age on the clinical presentation and surgical outcome of necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 2006;26(6):342-7.
148. Sharma R, Tepas JJ 3rd, Hudak ML, Mollitt DL, Wludyka PS, Teng RJ et al. Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007;42(3):454-61.
149. Shulman RJ, Schanler RJ, Lau C, et al. Early feeding, antenatal glucocorticoids, and human milk decrease intestinal permeability in preterm infants. *Pediatr Res.* 1998;44:519-523.
150. Sharma R, Lawrence Hudak. A clinical perspeticve of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatolo* 2013;40:27-51.
151. Silberer H, Kuppers B, Mickisch O, Baniewicz W, Drescher M, Traber L, et al. Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin Lab* 2005; 51:117-126.
152. Sipponen T, Savilahti E, Karkkainen P, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1392-1398.
153. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Farkkila M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:40-46.

154. Shulman RJ, Schamler RJ, Lau C, Heitkemper M, Ou CN, Smith EO.. Early feeding, antenatal glucocorticoids, and human milk decrease intestinal permeability in preterm infants. *Pediatr Res* 1998;44:519-23.
155. Simmer K. Aggressive nutrition for preterm infants-benefits and risks. *Early Hum Dev* 2007;83:631-4.
156. Smith LM, Qureshi N, Chao CR. Effects of single and multiple courses of antenatal glucocorticoids in preterm newborns less than 30 weeks' gestation. *J Maternal Fetal Med* 2000;9:131-135.
157. Sola JE, Tepas JJ 3rd, Koniaris LG. Peritoneal drainage versus laparotomy for necrotizing enterocolitis and intestinal perforation: a meta-analysis. *J Surg Res* 2010;161(1):95–100.
158. Soler A, Madrid M, Geffers C, Hummler HD. International perspectives: preventing sepsis in VLBW infants: experience from neonatal networks and voluntary surveillance systems. *NeoReviews* 2010;11:403-408.
159. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, et al. Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte Li protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336 (8718):763-5.
160. Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* 2005; 57:404–11.
161. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2010;126(3):443-56.
162. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110: 285-291.

163. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol* 2003; 27: 293-301.
164. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin—a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiological Research* 2004;53(3):245–253.
165. Stroncek DF, Shankar, RA, Skubitz KM. “The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in human neutrophils,” *Journal of Translational Medicine* 2005;3:36.
166. Sydora MJ, Sydora BC, Fedorak RN Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *J Crohns Colitis* 2012;6(2):207-14.
167. Taylor SN, Basile LA, Ebeling M, Wagner CL. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk versus formula. *Breastfeed Med* 2009;4:11–5.
168. Taylor SN, Ross J, Wagner CL. Intestinal development and permeability: Role in nutrition of preterm infants. In: Watson RR, Grimble G, Preedy CR, Zibadi Sherma, editors. *New York: Humana Press; 2013. P 135-145.*
169. Teitelbaum JE, and Alland Walker W. The development of mucosal immunity. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005; 17:1273-1278.
170. Terrin G, Passariello A, Manguso F, Salvia G, Rapacciuolo L, Messina F, et al. Serum calprotectin: an antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:291085.
171. Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs* 2008;68(9):1227–38.

172. Tomas AB, Vidal MV y Camps AR. Calprotectina fecal como marcador diferencial en patología gastrointestinal orgánica y funcional. *Revista española de enfermedades digestivas* 2007;99(12): 689-693.
173. Tyson JE, Kennedy KA. Trophic feedings for parenterally fed infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (issue 3) CD00504.
174. Van del Berg A, Fetter WP, Westerbeek EA, Van der Vegt IM, Van der Molen HR, Van Elburg RM. The effect of glutamine-enriched enteral nutrition on intestinal permeability in very-low-birth-weight infants: a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30:408-14.
175. Van Elburg RM, Fetter WP, Bunkers CM, Heymans HS. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003;88:52-5.
176. Verani JR, McGee L, Schrag SJ; Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR* 2010;59(RR-10):22.
177. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: An international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2005;90:220-4.
178. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55:426–431.
179. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin rev Allergy Immunol* 2008;34:191-204.
180. Walkiewicz D, Werlin SL, Fish D, Scanlon M, Hanaway P, Kugathasan S. Fecal calprotectin is useful in predicting disease relapse in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(5):669-73.

181. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986;33:179-201.
182. Wassell J, Wallage M, Brewer E. Evaluation of the Quantum Blue® rapid test for faecal calprotectin. *Ann Clin Biochem* 2012 Jan; 49(Pt 1):55-8.
183. Westerbeek EA, Van den Berg A, Lafeber HN, Knol J, Fetter WP, Van Elburg RM. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clinical nutrition* 2006;25: 361-368.
184. Westerbeek EA, Stahl B, Van Elburg RM. Human milk and intestinal permeability. In: Zibadi S, Watson RR, Preedy VR, editors. *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. 1 ed. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2013. p 99-117.
185. Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yamori Y, Nara Y, Itoh S. Polyunsaturated fatty acids induce tight junctions to form in brain capillary endothelial cells. *Neuroscience* 2003;116: 649-656.
186. Yang Q, Smith PB, Goldberg RN, Cotten CM. Dynamic change of fecal calprotectin in very low birth weight infants during the first month of life. *Neonatology* 2008; 94: 267-271.
187. Yee WH, Soraisham AS, Shah VS, Aziz K, Yoon W, Lee SK. Canadian Neonatal Network. Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatrics* 2012;129(2):298-304.
188. Yoon JM, Park JY, Ko KO, Lim JW, Cheon EJ, Kim HJ. Fecal calprotectin concentration in neonatal necrotizing enterocolitis. *Korean J Pediatr* 2014;57(8):351-356.
189. Yui, S, Nakatani, Y, Mikami, M. Calprotectin (S100A8/ S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2003;26(6):753-760.

190. Zhang Y, Ortega G, Camp M, Osen H, Chang DC, Abdullah F. Necrotizing enterocolitis requiring surgery: outcomes by intestinal location of disease in 4371 infants. *J Pediatr Surg* 2011;46(8):1475–81.
191. Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L et al. Preterm birth time trend in Europe: a study of 19 countries. *BJOG* 2013;120:1356-1365.
192. Zeitlin J, Di Lallo D, Blondel B, Weber T, Schmidt S, Künzel W, et al. Variability in caesarean section rates for very preterm births at 28–31 weeks of gestation in 10 European regions: results of the MOSAIC project. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;149:147–152.
193. Zopelli L, Güttel C, Bittrich H-J, Andree C, Wirth S, Jenke A. Fecal calprotectin concentrations in premature infants have a lower limit and show postnatal and gestational age dependence. *Neonatology* 2012;102:68-74.

VIII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

El trabajo descrito en la presente memoria se encuentra recogido en las siguientes comunicaciones a congresos:

1. Comunicación oral Internacional: TIME COURSE OF FAECAL CALPROTECTIN (FC) IN sick and healthy PRETERM NEWBORNS. 42nd Annual Meeting of ESPGHAN en Budapest en 2009.
2. Póster con defensa: CINÉTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL EN NEONATOS PRETÉRMINO SANOS Y ENFERMOS. XXIV Congreso de neonatología y medicina perinatal en Barcelona en 2013.
3. Comunicación oral Internacional: OC-72 FAECAL CALPROTECTIN IN PRETERM NEWBORN AND ITS ELEVATION IN SEVERE ILLNESS. 8th Europaediatrics congress, junio 2017, Bucarest, Rumanía. Publicado en Archives of Disease in Childhood 2017;102:A28

TIME COURSE OF FAECAL CALPROTECTIN IN SICK AND HEALTHY PRETERM NEWBORNS

J. Blasco[†], J. Serrano[†], V.M. Navas[†], C. Sierra[†], D. Alfageme[‡], I. Vicioso^{*}, E. Salguero[‡], A. Barco[‡]

[†] Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Unit
[‡] Neonatology Unit
^{*} Laboratory Department
 Hospital Materno-Infantil, Málaga

ESPGHAN

CINÉTICA DE LA CALPROTECTINA FECAL EN NEONATOS PRETÉRMINO SANOS Y ENFERMOS

J. Blasco[†], J. Serrano[†], V.M. Navas[†], C. Sierra[†], D. Alfageme[‡], I. Vicioso^{*}, E. Salguero[‡], A. Barco[‡]

[†] Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Unit
[‡] Neonatology Unit
^{*} Laboratory Department
 Hospital Materno-Infantil, Málaga

INTRODUCCIÓN
 La calprotectina fecal (CF) es una glicoproteína que constituye más del 80% de proteínas citosólicas de los neutrófilos, desempeñando un papel fundamental en la defensa neutrofílica. Ante un proceso inflamatorio se produce una migración leucocitaria a través de la mucosa inflamada o la luz intestinal, liberando calprotectina, aumentando la concentración de ésta en heces.
 Las cifras de CF en neonatos sanos, o término y pretérmino (ENPT), son elevadas respecto a niñas y adultos, y disminuyen en primer mes de vida. En neonatos enfermos (ENFE) existe una variación en la relación entre CF y enfermedades intestinales, su nivelándose relacionado con otros procesos de respuesta inflamatoria sistémica.

OBJETIVO
 Determinar los niveles normales de CF en ENPT y correlacionarlos con datos patológicos (ECG) señal patológica, tasa de alimentación, peso al nacimiento y la condición clínica comprobando si los niños se elevan días antes de aparición de síntomas.

MATERIA Y MÉTODOS
 Estudio clínico-analítico observacional longitudinal prospectivo.
 Selección aleatoria (n=114) representativa en la unidad de neonatología.
 Recogida de muestras de heces a las 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336, 360, 384, 408, 432, 456, 480, 504, 528, 552, 576, 600, 624, 648, 672, 696, 720, 744, 768, 792, 816, 840, 864, 888, 912, 936, 960, 984, 1008, 1032, 1056, 1080, 1104, 1128, 1152, 1176, 1200, 1224, 1248, 1272, 1296, 1320, 1344, 1368, 1392, 1416, 1440, 1464, 1488, 1512, 1536, 1560, 1584, 1608, 1632, 1656, 1680, 1704, 1728, 1752, 1776, 1800, 1824, 1848, 1872, 1896, 1920, 1944, 1968, 1992, 2016, 2040, 2064, 2088, 2112, 2136, 2160, 2184, 2208, 2232, 2256, 2280, 2304, 2328, 2352, 2376, 2400, 2424, 2448, 2472, 2496, 2520, 2544, 2568, 2592, 2616, 2640, 2664, 2688, 2712, 2736, 2760, 2784, 2808, 2832, 2856, 2880, 2904, 2928, 2952, 2976, 3000, 3024, 3048, 3072, 3096, 3120, 3144, 3168, 3192, 3216, 3240, 3264, 3288, 3312, 3336, 3360, 3384, 3408, 3432, 3456, 3480, 3504, 3528, 3552, 3576, 3600, 3624, 3648, 3672, 3696, 3720, 3744, 3768, 3792, 3816, 3840, 3864, 3888, 3912, 3936, 3960, 3984, 4008, 4032, 4056, 4080, 4104, 4128, 4152, 4176, 4200, 4224, 4248, 4272, 4296, 4320, 4344, 4368, 4392, 4416, 4440, 4464, 4488, 4512, 4536, 4560, 4584, 4608, 4632, 4656, 4680, 4704, 4728, 4752, 4776, 4800, 4824, 4848, 4872, 4896, 4920, 4944, 4968, 4992, 5016, 5040, 5064, 5088, 5112, 5136, 5160, 5184, 5208, 5232, 5256, 5280, 5304, 5328, 5352, 5376, 5400, 5424, 5448, 5472, 5496, 5520, 5544, 5568, 5592, 5616, 5640, 5664, 5688, 5712, 5736, 5760, 5784, 5808, 5832, 5856, 5880, 5904, 5928, 5952, 5976, 6000, 6024, 6048, 6072, 6096, 6120, 6144, 6168, 6192, 6216, 6240, 6264, 6288, 6312, 6336, 6360, 6384, 6408, 6432, 6456, 6480, 6504, 6528, 6552, 6576, 6600, 6624, 6648, 6672, 6696, 6720, 6744, 6768, 6792, 6816, 6840, 6864, 6888, 6912, 6936, 6960, 6984, 7008, 7032, 7056, 7080, 7104, 7128, 7152, 7176, 7200, 7224, 7248, 7272, 7296, 7320, 7344, 7368, 7392, 7416, 7440, 7464, 7488, 7512, 7536, 7560, 7584, 7608, 7632, 7656, 7680, 7704, 7728, 7752, 7776, 7800, 7824, 7848, 7872, 7896, 7920, 7944, 7968, 7992, 8016, 8040, 8064, 8088, 8112, 8136, 8160, 8184, 8208, 8232, 8256, 8280, 8304, 8328, 8352, 8376, 8400, 8424, 8448, 8472, 8496, 8520, 8544, 8568, 8592, 8616, 8640, 8664, 8688, 8712, 8736, 8760, 8784, 8808, 8832, 8856, 8880, 8904, 8928, 8952, 8976, 9000, 9024, 9048, 9072, 9096, 9120, 9144, 9168, 9192, 9216, 9240, 9264, 9288, 9312, 9336, 9360, 9384, 9408, 9432, 9456, 9480, 9504, 9528, 9552, 9576, 9600, 9624, 9648, 9672, 9696, 9720, 9744, 9768, 9792, 9816, 9840, 9864, 9888, 9912, 9936, 9960, 9984, 10000.

RESULTADOS
 114 Niños.
 53 niñas (46,5%) y 61 niños (53,5%).
 Edad media: 127,00 (± 420,15) días.
 37 niños enfermos (32,5%) y 77 niños sanos (67,5%).
 27 niñas sanas (50,9%) y 27 niños sanos (44,1%).

CF en sanos

Edad (días)	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza (IC) 95%
12	279,36	187,35	104,22 - 454,50
24	188,22	141,42	10,82 - 365,62
48	147,24	102,24	10,82 - 301,66
72	108,00	72,00	0,00 - 216,00

CF en enfermos

Edad (días)	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza (IC) 95%
12	1080,00	1080,00	0,00 - 2160,00
24	1080,00	1080,00	0,00 - 2160,00
48	1080,00	1080,00	0,00 - 2160,00
72	1080,00	1080,00	0,00 - 2160,00

CONCLUSIÓN
 La CF en ENPT sanos es mayor en los primeros 4 días de vida de forma significativa, con descenso posterior y estabilización durante los primeros meses.
 Puede ser útil medir seriamente CF para identificar precozmente, y monitorizar evolución, en procesos de inflamación intestinal o sepsis sistémica.
 El dinamismo de las cifras en periodo neonatal obliga a conocer su cinética y establecer varios puntos de corte.

IX. ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO SOBRE
ESTUDIO DE CALPROTECTINA FECAL NEONATAL

Estimados familiares, las Unidades de Gastroenterología Infantil y Neonatología están llevando a cabo un estudio sobre niños recién nacidos prematuros para averiguar las cifras normales de calprotectina fecal. Ésta es una proteína que aparece en cifras aumentadas en las heces de los neonatos respecto a los niños mayores de un año, pero aún no se sabe qué cifras se deben considerar normales.

Con el presente estudio se pretende encontrar unas cifras que estimen un rango de normalidad para poder estudiar posteriormente su aplicabilidad en la determinación precoz de inflamaciones-infecciones intestinales en estos niños.

Para llevar a cabo este estudio en su hijo sólo se requerirá el análisis de diversas muestras de heces, sin necesidad de analítica sanguínea o exploraciones más cruentas. Asimismo necesitaremos su asistencia a determinadas revisiones clínicas a realizar en este Hospital, en los 2 primeros meses de vida. Las revisiones se realizarán a los 4, 8, 15, 30 y 60 días de vida, únicamente requiriéndose un examen clínico y una muestra de heces en cada una.

De la realización del estudio no se derivarán efectos adversos para su hijo. Para garantizar la confidencialidad de la información todos los datos recogidos en este proyecto serán registrados de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre).

Las muestras serán anonimizadas y destruidas finalmente tras su utilización.

En caso de cualquier duda pueden contactar en la Unidad de Gastroenterología y Nutrición Infantil (consulta nº 4) o en el número de teléfono correspondiente con la misma. H. Materno-Infantil, Málaga. Tlfno. Contacto: 951292374.

Fdo.
Javier Blasco
Carlos Sierra
Sandra Díaz

Fdo. Padre o Tutor

