

Tesi doctoral presentada per En/Na

MARIA TERESA COBO COBO

amb el títol

**"Marcadores inflamatorios predictores de infección
intraamniótica subclínica en gestantes con amenaza de
parto prematuro y bolsa íntegra"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

MEDICINA

Barcelona, 16 de juny de 2009.

Facultat de Medicina
Departament de Medicina



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INDICE

1	INTRODUCCIÓN. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	5
1.1	Introducción al parto pretérmino espontáneo.	7
1.2	Importancia de la infección del tracto genital inferior como causa de parto pretérmino.	10
1.3	Importancia de la infección intraamniótica como causa de prematuridad y mal resultado neonatal.	12
1.4	Prevalencia de la infección intraamniótica.....	15
1.5	Fisiopatología de la infección intraamniótica.	16
1.6	Microbiología de la infección intraamniótica.	20
1.7	Síndrome de respuesta inflamatoria fetal.	21
1.8	Importancia de la inflamación intraamniótica como predictora de la infección intraamniótica.....	25
1.9	Diagnóstico de infección intraamniótica.....	26
1.9.1	<u>Diagnóstico clásico de infección intraamniótica</u>	26
1.9.2	<u>Marcadores de infección/inflamación intraamniótica</u>	27
1.9.2.1	Recuento leucocitario materno y proteína C reactiva.	29
1.9.2.2	Tinción de Gram en líquido amniótico.....	29
1.9.2.3	Concentración de glucosa en líquido amniótico.....	30
1.9.2.4	Interleuquina-6 (IL6) en líquido amniótico.....	31
1.9.2.5	Metalloproteínasa-8 (MMP8) en líquido amniótico.....	32
1.9.2.6	Estudio proteómico en líquido amniótico.	33
1.9.3	<u>Identificación del grupo de riesgo de inflamación / infección intraamniótica mediante parámetros clínicos y ecográficos</u>	36
1.9.3.1	Edad gestacional en el debut clínico de amenaza de parto pretérmino.....	37
1.9.3.2	Longitud cervical ecográfica.	37
1.10	Tratamiento y prevención de la infección intraamniótica.	39
1.11	Planteamiento de los estudios que componen la Tesis Doctoral y justificación de su temática.....	41
2	HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
3	OBJETIVOS.....	49
4	INVESTIGACIONES REALIZADAS. METODOLOGÍA Y RESULTADOS GLOBALES.....	53
5	DISCUSIÓN GENERAL.....	95
6	CONCLUSIONES	107

Índice

7	BIBLIOGRAFÍA	113
8	ANNEXO	127

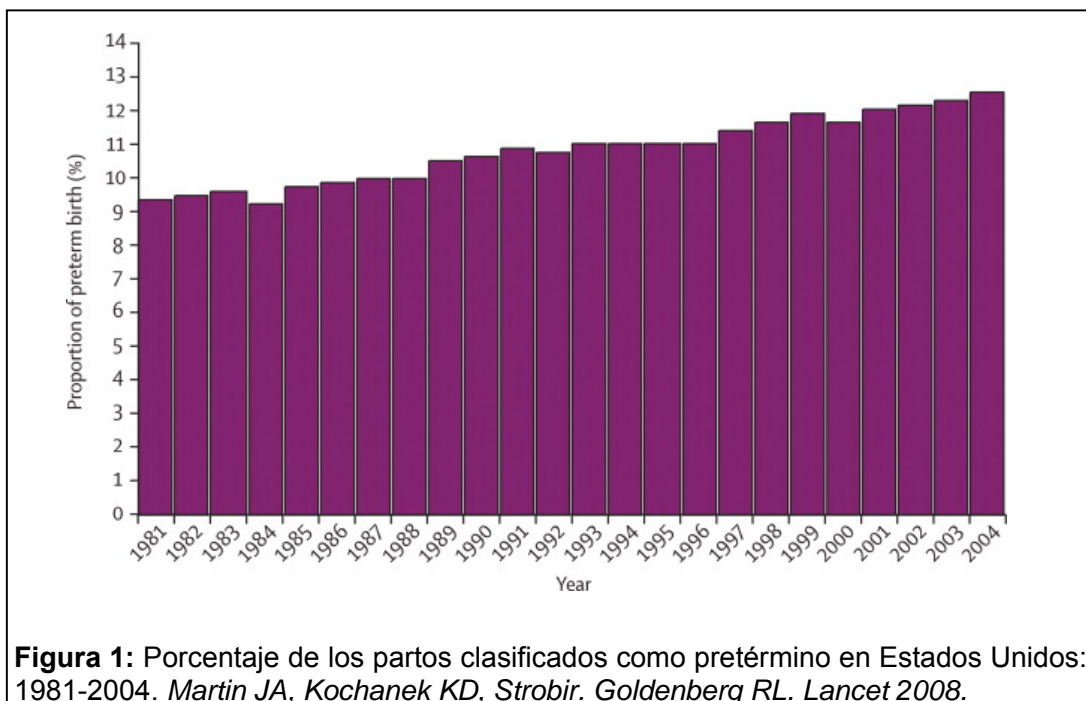
**1 INTRODUCCIÓN. PLANTEAMIENTO
GENERAL DEL PROBLEMA Y
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS**

1.1 Introducción al parto pretérmino espontáneo.

El parto pretérmino, con una prevalencia del 12-13% de las gestaciones en Estados Unidos y del 5-9% en Europa y otros países desarrollados, es la causa más frecuente de morbilidad neonatal [1].

A pesar de la introducción de tocolíticos y del conocimiento actual sobre los factores de riesgo y los mecanismos relacionados con el parto pretérmino, las tasas de prematuridad no sólo no se han reducido sino que, en la mayoría de países industrializados, el porcentaje de partos pretérmino ha experimentado un aumento.

Así, en Estados Unidos la proporción de partos pretérmino en 1981 era del 9.5% incrementándose al 12.7% en 2005, en parte, consecuencia de la prematuridad derivada del aumento en la tasa de gestaciones múltiples por el auge en las técnicas de reproducción asistida [1] (Figura 1).

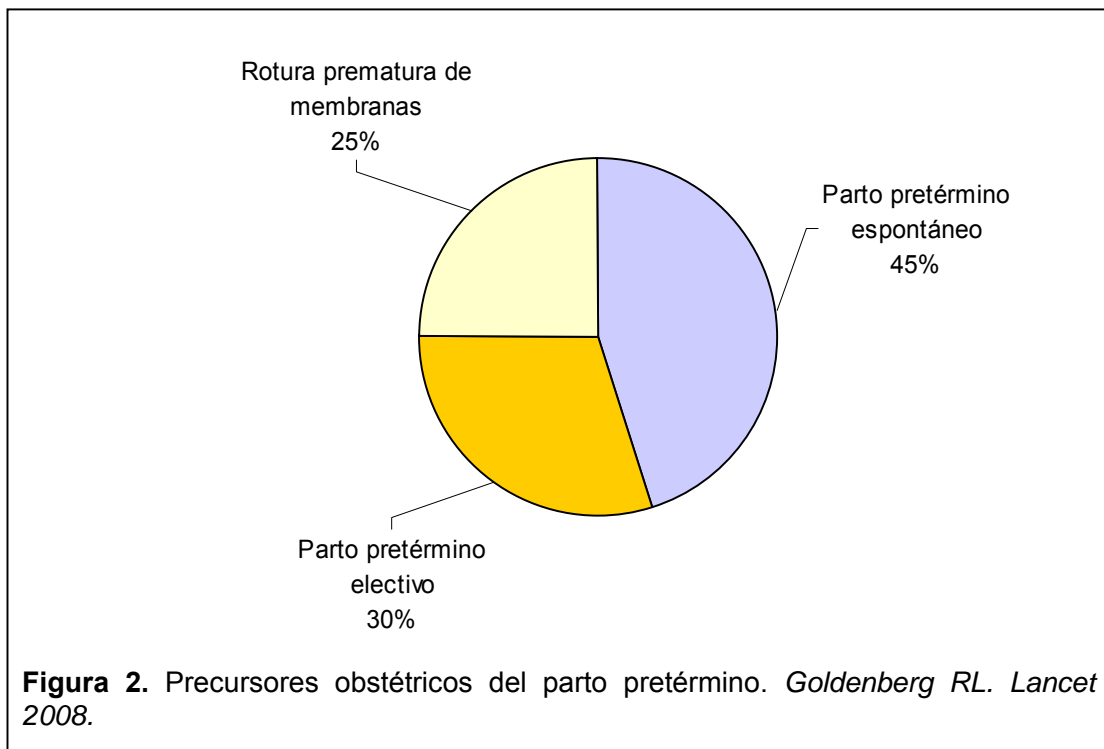


El parto pretérmino es responsable de uno de cada cinco niños con retraso mental, uno de cada tres niños con alteraciones visuales, y casi la mitad de todos los niños con parálisis cerebral [2]. Mejoras prenatales como la maduración pulmonar con corticoides o la introducción de antibióticos en la rotura prematura de membranas, y mejoras postnatales como el surfactante, técnicas de ventilación más efectivas y la nutrición neonatal han permitido, no obstante, mejorar la supervivencia y la morbilidad neonatal de estos prematuros.

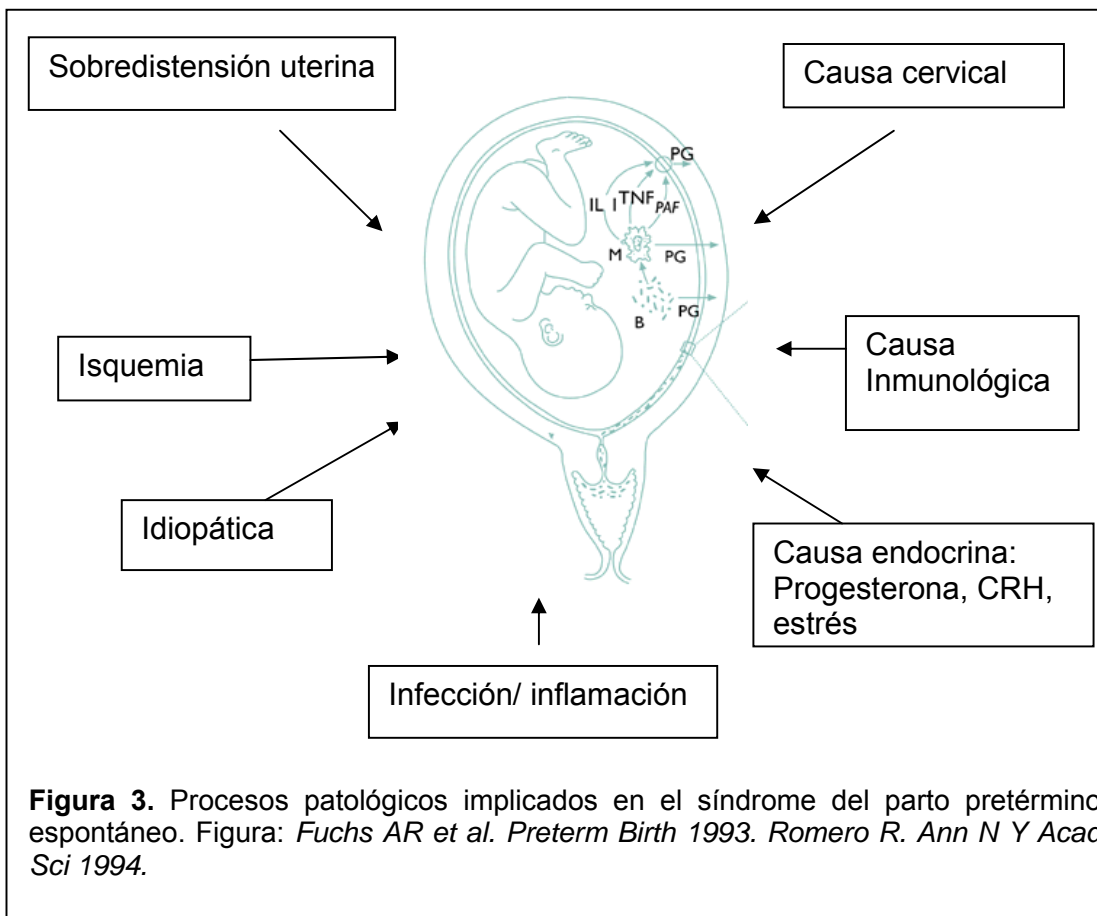
Existen diferentes clasificaciones del parto pretérmino. En función del criterio clínico de la edad gestacional en el momento del parto, definimos: [1]

- (1) **Prematuridad extrema**, al parto pretérmino que ocurre antes de las 28 semanas de gestación. Representa un 5% de los partos prematuros.
- (2) **Prematuridad severa**, al que se produce entre las 28-31 semanas. Representa el 15% de los partos pretérmino.
- (3) **Prematuridad moderada**, al que se produce entre las 32-33 semanas. Representa el 20% de los partos prematuros.
- (4) **Prematuridad leve**, que representa la mayoría de partos pretérminos (60-70%) y define al que se produce entre las 34-36 semanas de gestación.

El parto pretérmino también se clasifica en (1) **electivo** cuando se finaliza de forma prematura por indicaciones maternas o fetales; (2) **espontáneo con membranas íntegras** y (3) **espontáneo secundario a rotura prematura de membranas**. Aproximadamente un 30-35% de los partos pretérmino son electivos, el 40-45% son espontáneos con membranas íntegras y el 25-30%, secundarios a una rotura prematura de membranas (Figura 2).



La etiología del parto pretérmino espontáneo es multifactorial. En la actualidad se define como un síndrome con múltiples mecanismos causales, que incluyen la infección o inflamación, la isquemia uteroplacentaria o hemorragia, la sobredistensión uterina, el estrés y otros procesos mediados inmunológicamente [3] (Figura 3). Sobre la etiología infecciosa/inflamatoria se basará la presente Tesis Doctoral.



1.2 Importancia de la infección del tracto genital inferior como causa de parto pretérmino.

La bacteriuria asintomática, la vaginosis bacteriana y la colonización por *Trichomonas vaginalis* son factores de riesgo infeccioso asociado a parto pretérmino. Por el contrario, la colonización del tracto genital inferior por *Mycoplasmas* genitales, *Candidas* y *Streptococcus agalatae* no han demostrado ser causa de parto prematuro [4].

El tratamiento antibiótico de la bacteriuria asintomática durante la gestación es la única intervención asociada a una reducción en el

porcentaje de parto pretérmino [5]. El tratamiento de la *Trichomonas vaginalis* en pacientes asintomáticas no ha demostrado reducir el riesgo de parto prematuro [6, 7]. Respecto la vaginosis bacteriana, son contradictorios los resultados de diversos ensayos clínicos acerca de la eficacia del tratamiento antibiótico [8-10]. La revisión Cochrane que incluye 15 ensayos clínicos sobre 5888 mujeres [11] concluye que, aunque el tratamiento antibiótico pueda erradicar la vaginosis bacteriana, éste no reduce el riesgo de parto pretérmino o rotura prematura de membranas antes de las 37 semanas, en la población general o en aquellas gestantes con historia previa de parto pretérmino. Una posible explicación del fracaso antibiótico es que su acción se limita al tracto genital inferior sin alcanzar de forma efectiva el espacio corio-decidual y, consecuentemente la cavidad amniótica, de modo que resulta ineficaz en la prevención y/o tratamiento de la corioamnionitis [12]. Sin embargo, existe evidencia que el tratamiento precoz de la vaginosis bacteriana con clindamicina oral, antes de las 20 semanas, reduce de forma significativa el porcentaje de pérdidas fetales tardías en la población obstétrica general [10].

Erradicar la colonización de Mycoplasmas genitales en la vagina, considerados los gérmenes que con más frecuencia se aíslan en la infección intraamniótica, no ha demostrado reducir ni el riesgo de infección ni las tasas de prematuridad [7]. Tampoco es efectivo el tratamiento contra *Streptococcus agalactiae* o *Candidas* en pacientes asintomáticas colonizadas por estos gérmenes [6, 7].

En conclusión, en la actualidad la única medida de cribado eficaz para reducir el parto pretérmino en la población obstétrica general es la detección de la bacteriuria asintomática. Sin embargo, quedan

pendientes definir protocolos de cribado, de seguimiento y de tratamiento óptimos para prevenir el parto prematuro.

1.3 Importancia de la infección intraamniótica como causa de prematuridad y mal resultado neonatal.

Hasta en un 31-40% de los casos, según las series [1, 3], la causa más frecuente de parto pretérmino espontáneo continúa siendo la idiopática. De las causas conocidas, la más frecuente es la infección intraamniótica, responsable, en un 10-12% de los casos, del parto prematuro espontáneo con bolsa íntegra y hasta en un 30-50% de los casos, de la rotura prematura de membranas [3, 6, 13, 14]. La mortalidad neonatal relacionada directamente con la infección intraamniótica es superior al 10% en estos prematuros [15, 16].

La infección intraamniótica es causa no sólo de parto pretérmino, sino también de rotura prematura de membranas, corioamnionitis clínica, corioamnionitis histológica, funisitis, test de Apgar más bajo, mayor porcentaje de admisión a Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, distrés respiratorio neonatal, neumonía, sepsis, hemorragia intraventricular, displasia broncopulmonar, bajo peso al nacimiento y morbilidad a largo plazo como la parálisis cerebral, diversas alteraciones cognitivas y la enfermedad crónica pulmonar [15-24].

A nivel materno, la infección intraamniótica incrementa el riesgo de hemorragia posparto y de otras complicaciones quirúrgicas como la infección de herida quirúrgica, el absceso pélvico y la endometritis posparto [25-27]. Complicaciones más graves como el shock séptico y

el síndrome de distrés respiratorio del adulto son infrecuentes en nuestro medio debido a la disponibilidad que en la actualidad se tiene de la antibioterapia de amplio espectro y del manejo intrahospitalario de este tipo de infecciones [26].

Uno de los principales desafíos en el manejo de la infección intraamniótica en pacientes con amenaza de parto prematuro es su predicción ya que, en la mayoría de casos, el curso es subclínico y requiere, para su diagnóstico, del análisis de líquido amniótico.

Hasta el momento actual, el diagnóstico de infección intraamniótica es microbiológico. Es un método diagnóstico tardío cuyos principales inconvenientes son la necesidad de realizar una amniocentesis para su estudio y que necesita de al menos 48 horas de incubación, por lo que generalmente no suele estar disponible para la toma de decisiones en el manejo clínico de este grupo de pacientes [28-30].

La amniocentesis es un procedimiento invasivo. Aunque se considera una técnica con baja morbilidad, la incidencia de complicaciones descrita clásicamente en la literatura es del 1-9% e incluye un mayor riesgo de parto pretérmino, rotura prematura de membranas, hemorragia feto-materna, alteraciones en la frecuencia cardíaca fetal, desprendimiento de placenta y rotura uterina [31, 32]. Sin embargo, con la introducción de la ecografía como guía del procedimiento, las series recientes reportan una incidencia de complicaciones del 0.7% en el tercer trimestre [33, 34].

Sobre la patogénesis del parto pretérmino de origen infeccioso, existe evidencia de la presencia de cambios en la flora microbiana vagino-cervical normal y alteraciones de las propiedades bioquímicas

del fluido vaginal, responsables del sobrecrecimiento de determinados microorganismos en el tracto genital inferior. Las toxinas producidas por estos microorganismos activan, a nivel de las membranas fetales (decidua y amnios), la producción de citoquinas. Esta respuesta inflamatoria es conocida como inflamación intraamniótica y actualmente se conoce que precede a la infección, de manera que es posible la detección de marcadores inflamatorios en el líquido amniótico antes que los microorganismos atraviesen la barrera del corion-decidua-amnios y alcancen el líquido amniótico colonizando al feto [7, 14, 30].

Aunque la literatura es escasa, sugiere que el diagnóstico de inflamación intraamniótica, independientemente del resultado del cultivo de líquido amniótico, está asociado a una mayor tasa de prematuridad, mayor riesgo de corioamnionitis clínica y mayor morbilidad neonatal [35]. Es por ello que la investigación actual se centra en la búsqueda de marcadores de inflamación intraamniótica, más precoces que el cultivo, para proporcionar una información diagnóstica rápida en el subgrupo de pacientes con amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas.

No obstante, asumir que el diagnóstico y tratamiento precoces de la inflamación intraamniótica reduce las tasas de prematuridad y mejora los resultados perinatales, está aún por demostrar.

1.4 Prevalencia de la infección intraamniótica.

La prevalencia de invasión microbiana dependerá de la presentación clínica y la edad gestacional. Así, en pacientes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra, el porcentaje de invasión microbiana del líquido amniótico es del 10-12% [6]. En pacientes con rotura prematura de membranas, el porcentaje es del 30-50% [6]. En pacientes con cuadro clínico sugestivo de insuficiencia cervical, la prevalencia es superior al 51% [36]. En los casos de pacientes asintomáticas con longitud cervical medida por ecografía transvaginal inferior a 25 mm, la infección intraamniótica ocurre en el 9% de los casos [37]. Finalmente, en gestaciones gemelares con amenaza de parto pretérmino, el riesgo es del 11.9% [38].

La edad gestacional ha demostrado ser un factor independiente de infección y de inflamación intraamniótica [39] (Figura 4).

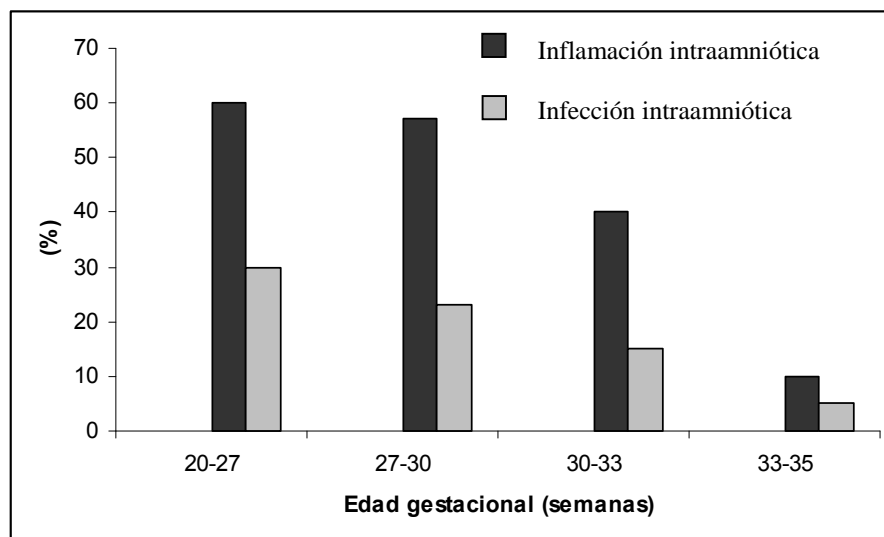


Figura 4. Frecuencia de infección intraamniótica y de inflamación intraamniótica (cultivos negativos pero niveles altos de IL6) en función de la edad gestacional. Yoon BH. *Am J Obstet Gynecol* 2001.

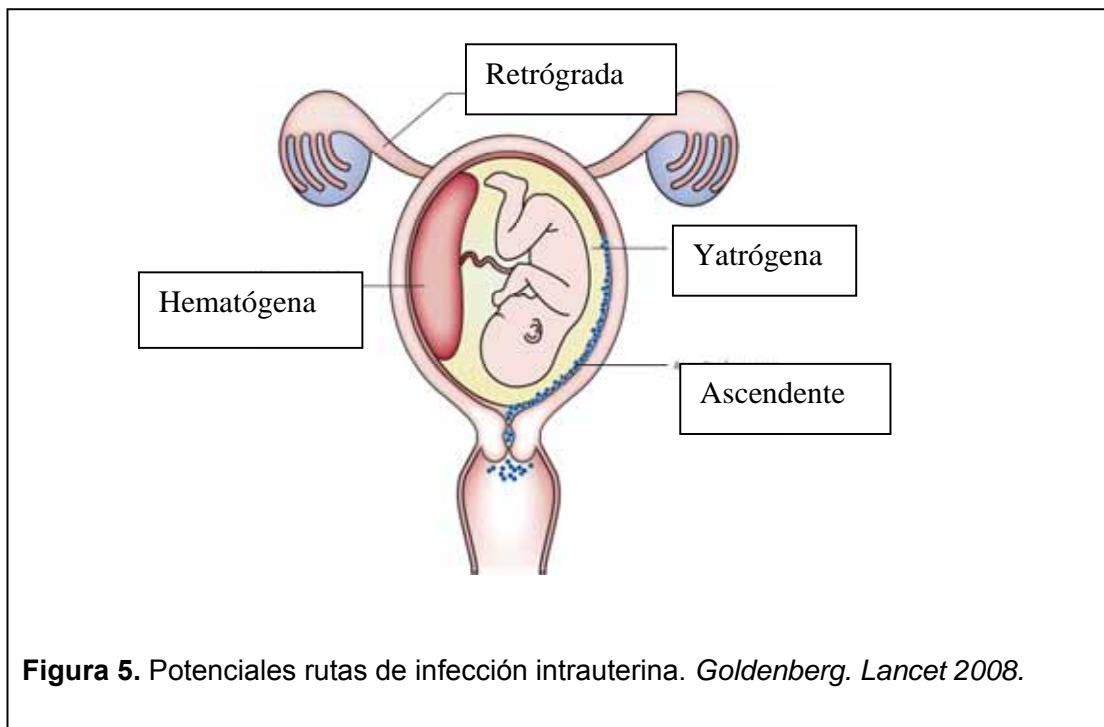
Se ha descrito un 18% de infección intraamniótica en pacientes a término [6]. Sin embargo, no existen diferencias en el porcentaje de corioamnionitis clínica, dilatación cervical y resultados neonatales entre las gestantes a término con cultivos positivos versus las gestantes con cultivos negativos [6]. Una posible explicación es que la invasión microbiana de la cavidad amniótica en estas gestantes a término se produce probablemente durante el momento del parto, incluso con las membranas íntegras. Explicaría además que la frecuencia de afectación fetal sea extremadamente baja así como la intensidad de la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas [6].

Aunque la literatura sugiere que a menor edad gestacional, mayor el riesgo de inflamación e infección intraamniótica [35, 39, 40], aún no se ha establecido un punto de corte de edad gestacional a partir del cuál el riesgo de inflamación / infección intraamniótica sea bajo.

1.5 Fisiopatología de la infección intraamniótica.

Los microorganismos pueden alcanzar la cavidad amniótica y al feto a través de diferentes vías de entrada [30] (figura 5):

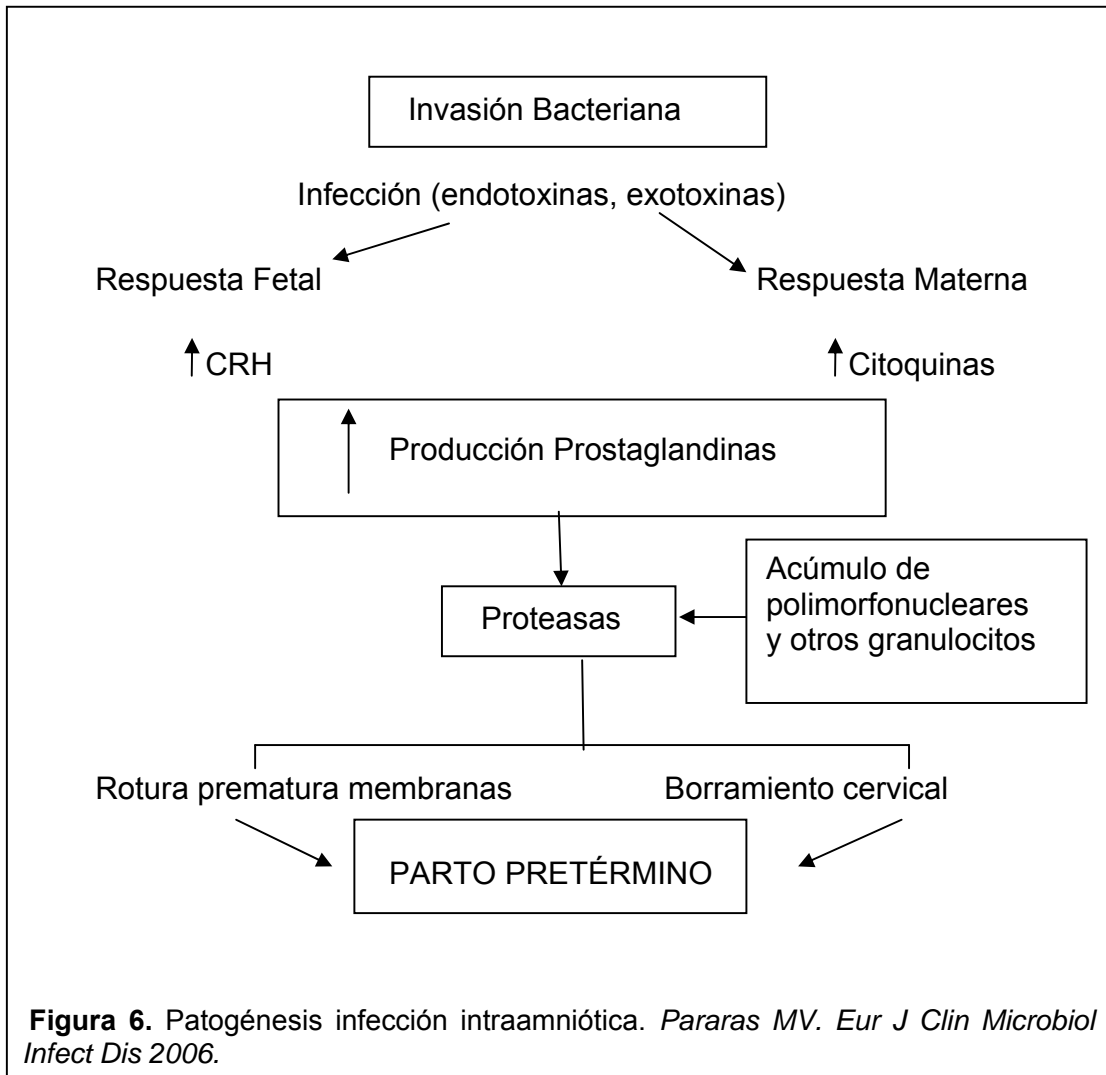
- (1) la vía más común es la vía ascendente procedente de la vagina y el cérvix,
- (2) vía hematológica a través de la placenta,
- (3) vía retrógrada desde la cavidad peritoneal a través de las trompas de falopio e
- (4) inoculación accidental en el momento de un procedimiento invasivo (vía iatrogénica).



Los mecanismos por los cuales la infección intraamniótica provoca un parto prematuro se relacionan con la activación del sistema inmune innato [7].

Inicialmente, se genera un sobrecrecimiento de determinados microorganismos en el tracto genital inferior ya sea por alteraciones en la flora microbiana normal vagino-cervical y/o por modificaciones en las propiedades bioquímicas del fluido vaginal. Como alteraciones bioquímicas se describen la elevación en el pH vaginal y el incremento en la concentración de diamidas, poliaminas y diversas enzimas tipo mucinasas, proteasas y fosfolipasas [7].

Estos cambios microbiológicos y bioquímicos generan un sobrecrecimiento microbiano, responsable de la invasión bacteriana posterior (Figura 6).

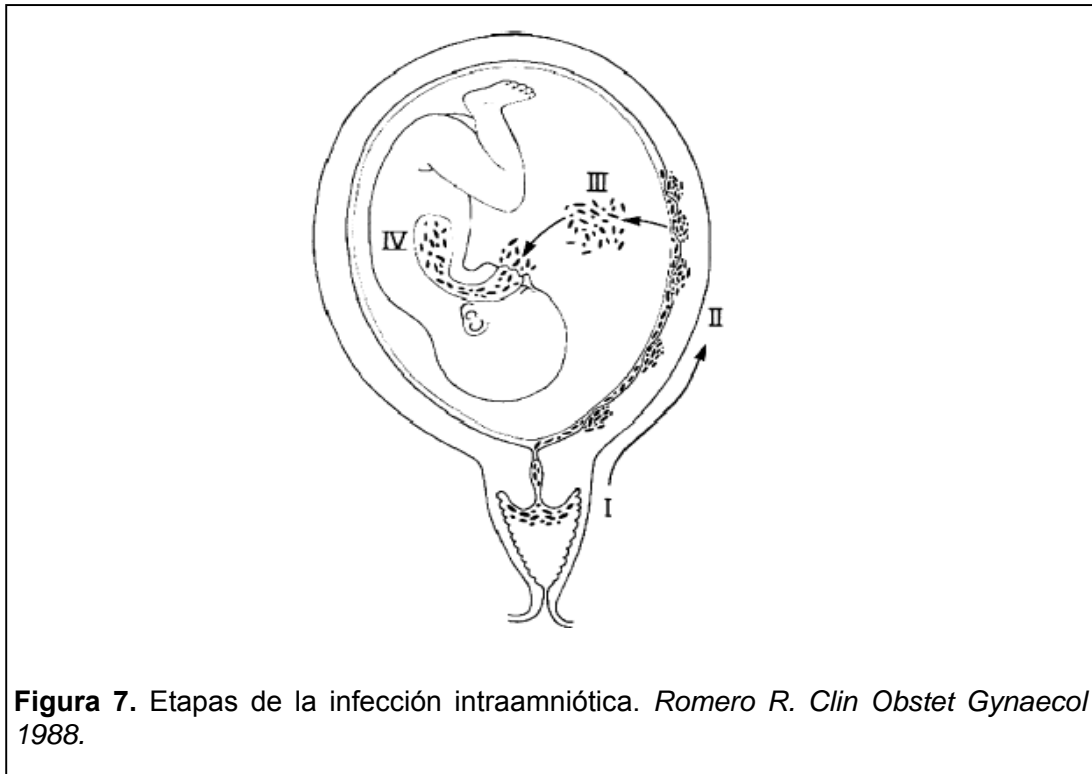


En una fase inicial, las toxinas producidas por estos microorganismos (etapa 1) alcanzan vía ascendente la decidua y activan, a nivel de ésta y las membranas fetales, una respuesta inflamatoria local a través del reclutamiento de leucocitos, que se traduce en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL2, IL6, IL18, IL8, IFN- γ , TNF α) y mediadores inflamatorios (metaloproteinasa-8 (MMP-8), factores de activación plaquetar, prostaglandinas, leucotrienos, óxido nítrico, etc.). Estos factores inflamatorios estimulan la producción de prostaglandinas en el amnios, corion, decidua y

miometrio que permiten la contractibilidad uterina, la dilatación cervical y la exposición de las membranas a la entrada de microbios en la cavidad uterina (etapa 2).

En los espacios extrauterinos, las prostaglandinas regulan la liberación de citoquinas inflamatorias que actúan de forma sinérgica con la IL8 en aumentar la quimiotaxis de los neutrófilos y estimular la liberación de metaloproteinasas (MMP). Las MMP están implicadas en los procesos de borramiento cervical y en la degradación de las membranas fetales. Degradan el tejido conectivo permitiendo la ruptura de las membranas e induciendo el parto pretérmino.

Los microorganismos, al atravesar las membranas amnióticas íntegras, estimulan la producción de mediadores inflamatorios por parte de macrófagos y otras células del sistema inmunológico procedentes del corion-amnios-líquido amniótico (etapa 3), que entran a la circulación fetal y pueden desarrollar una respuesta inflamatoria en el feto conocida como síndrome de respuesta inflamatoria fetal (etapa 4) [14, 30, 41] (Figura 7).



1.6 Microbiología de la infección intraamniótica.

La infección es, en el 50% de los pacientes, polimicrobiana, provocada por una combinación de microorganismos aerobios y anaerobios [28-30].

El microorganismo más frecuentemente implicado en la infección intraamniótica es el *Mycoplasma genital* y en particular el *Ureaplasma urealyticum*, presente en el tracto genital inferior en más del 80% de las mujeres embarazadas [28, 42]. Son gérmenes de baja virulencia que debutan con escasa clínica sistémica materna.

Otros microorganismos frecuentes se aíslan comúnmente en cuadros de vaginosis bacteriana como el *Peptostreptococci* y el *Bacteriodes species*. También son gérmenes comunes, el

Streptococcus agalactiae, la *Escherichia coli*, el *Fusobacterium species* y la *Gardnerella vaginalis* [28, 30].

1.7 Síndrome de respuesta inflamatoria fetal.

La condición de síndrome de respuesta inflamatoria se describió originalmente en adultos con el acrónimo de SIRS. SIRS se introdujo en el 1992 por el *American College of Chest Physicians* y *The Society of Critical Care Medicine* para describir un complejo síndrome resultado de la activación sistémica del sistema inmunitario innato [43]. Estos cambios, caracterizados por taquicardia, fiebre, hiperventilación y un elevado recuento leucocitario, se atribuían al efecto de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios.

Gómez et al [21] definieron FIRS en fetos como síndrome de respuesta inflamatoria fetal por primera vez en 1998 usando el mismo parámetro bioquímico propuesto en adultos, la elevación de la concentración de IL6 pero en sangre fetal (IL6 > 11 ng/mL) [21].

El FIRS se asocia a fallo multisistémico fetal e incluye la afectación del sistema hematopoyético (incremento del número de hematíes, leucocitosis, etc.), hiperactividad de la glándula adrenal, disfunción cardíaca, inmunodeficiencia y daño endotelial.

Los fetos con FIRS presentan mayor morbilidad en forma de distrés respiratorio, sepsis, neumonía, displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular, leucomalacia periventricular y enterocolitis necrotizante. Como morbilidad a largo plazo, presentan un mayor riesgo de parálisis cerebral y de enfermedad pulmonar crónica [21].

La infección intraamniótica puede ser causa de encefalopatía hipoxico-isquémica de tipo infeccioso ya que el FIRS estimula la producción de citoquinas fetales que atraviesan la barrera hematoencefálica y facilitan la entrada de productos microbianos y citoquinas al cerebro (Figura 8) [44].

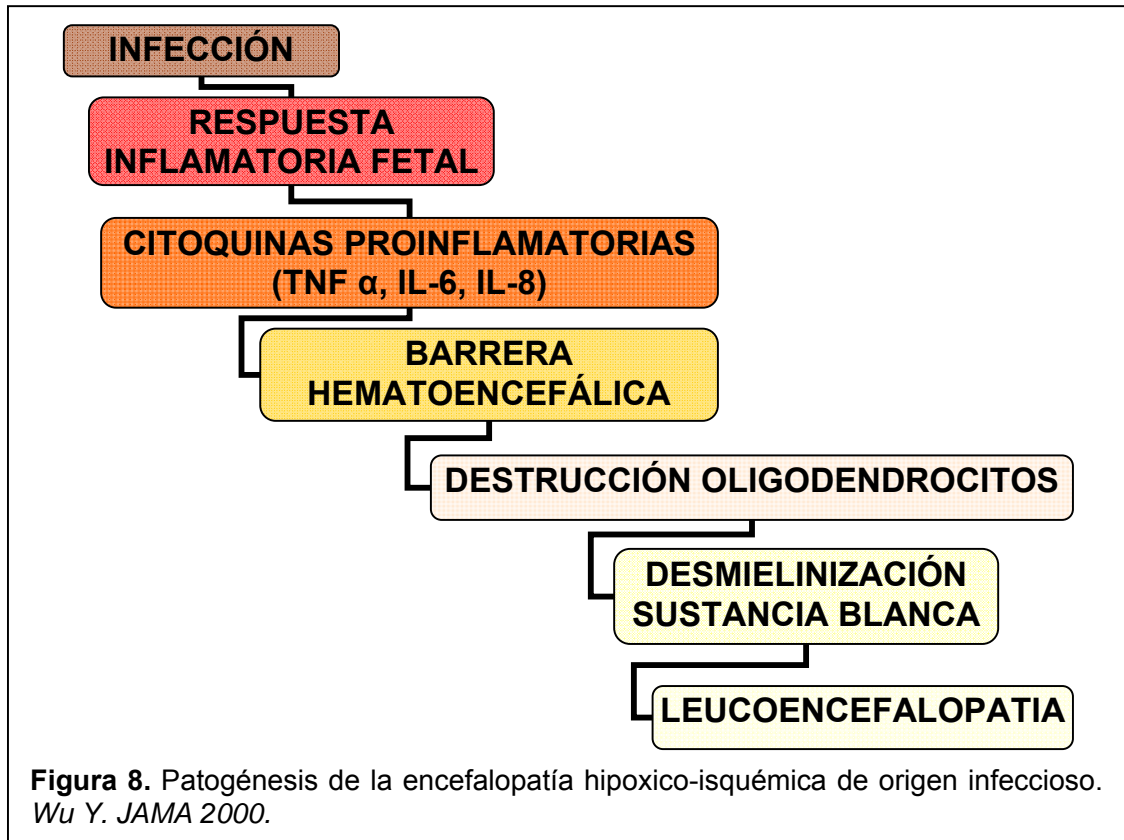
Las citoquinas se consideran neurotóxicas ya que:

- (1) tienen un efecto citolítico directo sobre las neuronas y los precursores de los oligodendrocitos, los cuáles son sensibles a los efectos de la isquemia y la infección, provocando una desmielinización de la sustancia blanca,
- (2) inducen la liberación de aminoácidos excitadores,
- (3) inducen apoptosis,
- (4) alteran la cascada de la coagulación y
- (5) producen hipotensión fetal.

Además, la presencia de factores maternos, como la pirexia, incrementan el metabolismo cerebral fetal y hacen al cerebro más vulnerable a la hipoxia.

La encefalopatía hipoxico-isquémica secundaria a la infección se puede traducir en la presencia de procesos de resorción y gliosis que dan lugar a la necrosis de la sustancia blanca en la región periventricular produciendo un cuadro de atrofia de la sustancia blanca, ventriculomegalia y formación de quistes, que dan lugar a un cuadro clínico conocido como leucomalacia periventricular. La leucomalacia periventricular es considerada la principal causa de daño isquémico en

los neonatos prematuros y es causa de parálisis cerebral, déficit motores espásticos o epilepsia [24].



Existe una relación estadísticamente significativa entre la corioamnionitis clínica y el riesgo de leucomalacia periventricular (Riesgo relativo (RR) 3.0, Intervalo Confianza (IC) 95% 2.2-4.0) y de parálisis cerebral (RR 1.9; IC 95% 1.4-2.5) en prematuros [24]. También se ha demostrado que no sólo la infección sino también la inflamación intraamniótica, definida por la presencia de niveles altos de citoquinas en el líquido amniótico, se asocia a un mayor riesgo de parálisis cerebral a largo plazo [45].

No obstante, a pesar de considerarse factor de riesgo clásico de encefalopatía hipóxico-isquémica, la frecuencia de estas alteraciones

neurológicas en los cuadros de infección / inflamación intraamniótica es relativamente baja. A los 6 años de vida, la frecuencia de parálisis cerebral asociada a infección intraamniótica reportada en la literatura es del 3.8% y del 18.7% de alteraciones neurológicas mayores (definiendo como alteraciones neurológicas mayores la ceguera, sordera y déficits neurológicos motores severos). La frecuencia de parálisis cerebral y alteraciones neurológicas mayores en el grupo con inflamación intraamniótica es similar (3.9% y 13.5%, respectivamente) [46].

La funisitis, definida por la infiltración perivascular de células inflamatorias en los vasos umbilicales, es considerada uno de los marcadores predictores de FIRS [44, 47, 48]. La respuesta inflamatoria fetal se origina inicialmente en la vena umbilical y posteriormente afecta a las arterias siendo causa de vasculitis y funisitis. La funisitis es considerada un factor de riesgo de sepsis congénita en el neonato [45] y está mediada por citoquinas proinflamatorias como la IL1, IL6 y $TNF\alpha$. Carroll et al [25] reportaron un 33% de sepsis congénita en fetos con cultivos de líquido amniótico positivos y un 4% de sepsis en aquellos con cultivos negativos, demostrando la importancia de la cascada inflamatoria como causa de morbilidad neonatal aún en ausencia de un cultivo positivo. La mortalidad de los neonatos con sepsis congénita reportada en la literatura es del 25-90% [25] y depende principalmente de la prematuridad, que limita la supervivencia.

1.8 Importancia de la inflamación intraamniótica como predictora de la infección intraamniótica.

En la actualidad, la inflamación intraamniótica, con una prevalencia del 10-30% [14, 35] en pacientes con amenaza de parto prematuro y del 40% en la rotura prematura de membranas [49], se considera el mayor predictor de infección intraamniótica.

La inflamación intraamniótica se desencadena como respuesta a la presencia de microorganismos en la decidua, que induce la producción de leucocitos y citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL6 e IL8) en el líquido amniótico, estimulando la producción de prostaglandinas en el amnios, corion, decidua y miometrio y permitiendo la contractibilidad uterina, la dilatación cervical y la exposición de las membranas a la entrada de microbios [14].

La inflamación intraamniótica puede estar presente en ausencia de un cultivo de líquido amniótico positivo. El porcentaje de colonización microbiana en el espacio corioamniótico es superior al observado en el líquido amniótico (21% versus 10%, $p < 0.001$) [35]. Si la infección se localiza en la decidua o en el espacio entre amnios y corion, los microorganismos pueden no ser detectados en la cavidad amniótica. Generalmente aquellas pacientes con cultivos positivos en las membranas amnióticas pero negativos en el líquido amniótico, presentan una elevación de marcadores de inflamación como la IL6 en líquido amniótico. La presencia de inflamación intraamniótica en ausencia de cultivos positivos puede ser un reflejo de infección intrauterina en el espacio extraamniótico [14]. Aunque la literatura es aún incipiente, las consecuencias de la inflamación intraamniótica en

relación a morbilidad materna y neonatal son similares a las del grupo con infección intraamniótica [35].

La infección e inflamación intraamnióticas son los dos únicos procesos patológicos en los que existe evidencia científica sobre su relación causal con la prematuridad [3, 14]. Hasta en un 50% de las mujeres que presentan un parto pretérmino se detectan signos histológicos de corioamnionitis aunque, en la mayoría, no aparece clínica previa de infección [14].

La búsqueda e identificación de marcadores de inflamación intraamniótica, de lectura más rápida que los cultivos microbiológicos, pretende proporcionar una información diagnóstica en una etapa más precoz de la infección.

1.9 Diagnóstico de infección intraamniótica.

1.9.1 Diagnóstico clásico de infección intraamniótica.

El diagnóstico clásico de infección intraamniótica es clínico. Es conocido como corioamnionitis clínica y se basa en la presencia de los criterios expuestos en los 80 por Gibbs [29]:

- (1) Fiebre $\geq 37.8^{\circ}$ C y dos o más de los siguientes criterios menores:
 - (2) Taquicardia materna (≥ 100 -120 latidos por minuto (lpm)),
 - (3) Taquicardia fetal (≥ 160 lpm),
 - (4) Irritabilidad uterina,
 - (5) Líquido amniótico purulento y
 - (6) Leucocitosis materna (>15000 -18000 células/mm³).

Sin embargo, la corioamnionitis clínica ocurre únicamente en aproximadamente un 12.5% de pacientes con parto pretérmino y bolsa íntegra [30] y refleja la manifestación sistémica materna a la invasión microbiana.

Además, hasta el momento actual, la corioamnionitis clínica no ha demostrado beneficiarse del tratamiento con antibióticos posiblemente porque su diagnóstico, basado en criterios clínicos, refleja un estado de infección muy avanzado. Debido a la escasa respuesta al tratamiento antibiótico y al riesgo incrementado de sepsis materna, el tratamiento óptimo en estos casos de corioamnionitis clínica es la finalización de la gestación bajo cobertura antibiótica de amplio espectro [50].

Es por ello que nuestros esfuerzos deben centrarse en mejorar los métodos diagnósticos en la fase subclínica de la infección, la fase de inflamación intraamniótica. Aunque es una hipótesis aún no contestada en la literatura, podría ser posible que el diagnóstico y tratamiento precoces de la inflamación intraamniótica mejorara la morbimortalidad asociada a estas gestaciones.

1.9.2 Marcadores de infección/inflamación intraamniótica

A pesar de sus limitaciones, el cultivo microbiológico del líquido amniótico se considera actualmente el método diagnóstico *gold standard* para definir la presencia de infección intraamniótica [29].

La identificación del germen mediante técnicas de cultivo requiere de un mínimo inóculo del microorganismo y depende de la viabilidad de éste y de las condiciones apropiadas de incubación y crecimiento. Que la frecuencia de inflamación sea el doble que la de infección

intraamniótica sugiere que la sensibilidad del cultivo microbiológico no es del 100% [35]. En estos casos de cultivos negativos, la hipótesis más firme sobre la causalidad del proceso inflamatorio es que el origen sea también infeccioso, pero que su identificación esté limitada por las técnicas microbiológicas convencionales. Procedimientos de laboratorio más sofisticados como la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa dirigida específicamente a *Ureaplasma urealyticum* han permitido la identificación de este germen en líquido amniótico en pacientes con inflamación intraamniótica pero cultivos convencionales negativos [42]. Demuestra que un mejor conocimiento de las condiciones de cultivo de los potenciales patógenos permitiría mejorar la tecnología actual para un correcto diagnóstico de infección.

Otra posible explicación sería asumir que el paso de marcadores de inflamación a la cavidad amniótica precede al paso de gérmenes por la barrera coriódica y por tanto somos capaces de detectar la inflamación en una etapa más precoz que la infección intraamniótica.

El principal inconveniente del cultivo microbiológico convencional es que necesita al menos 48 horas de incubación, por lo que generalmente no suele estar disponible para la toma de decisiones clínicas. Para avanzar a este diagnóstico, como marcadores de lectura rápida de infección intraamniótica, se han propuesto la tinción de Gram y el recuento de glucosa en líquido amniótico y como marcadores de inflamación, el recuento de leucocitos, la concentración de citoquinas (de ellas la más estudiada es la IL6), metaloproteinasa-8 (MMP-8) y otras proteínas inflamatorias como las *Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1 y 2* que se engloban en lo que se conoce como perfil proteómico [51-59].

De forma individual, todos ellos presentan una buena sensibilidad para detectar infección / inflamación intraamnióticas. Sin embargo, la utilización clínica de algunos de estos marcadores está limitada por su tasa de falsos positivos y por la dificultad técnica en su determinación.

1.9.2.1 Recuento leucocitario materno y proteína C reactiva.

El recuento leucocitario materno y la proteína C reactiva (PCR) han demostrado tener sus limitaciones, posiblemente porque la mayoría de casos de infección de líquido amniótico e infección fetal no se detectan por estos marcadores analíticos [60-62].

De ahí que el estudio de líquido amniótico se haya propuesto como medio óptimo para la detección de infección e inflamación intraamnióticas.

1.9.2.2 Tinción de Gram en líquido amniótico.

El método más utilizado para la detección rápida de infección intraamniótica es la tinción de Gram de líquido amniótico con una sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo descritos en la literatura del 63.64%, 99.08%, 87.5% y 96.4%, respectivamente [58].

A pesar de su alta especificidad, cercana al 100% [63], la sensibilidad descrita por la literatura es baja, de aproximadamente un 40-65% [58, 63] y es consecuencia de su incapacidad para detectar *Mycoplasmas* genitales, los gérmenes más frecuentes implicados en la infección intraamniótica en pacientes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra.

Además, la sensibilidad de la tinción de Gram es directamente proporcional al número de bacterias presentes en el líquido amniótico.

En presencia de más de 10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro, el 80% de los Gram de líquido amniótico son positivos pero en presencia de un inóculo inferior, la sensibilidad de la técnica baja [63].

1.9.2.3 Concentración de glucosa en líquido amniótico.

Al igual que sucede en el líquido cefalorraquídeo, la infección intraamniótica, de predominio bacteriano, se asocia a niveles bajos de glucosa.

Como marcador de infección es muy específico (94-100%) [53] tanto de infección intra como extraamniótica, pero su baja sensibilidad (41-55%) limita su aplicabilidad clínica [54, 55, 57, 64].

Además, resulta confuso a nivel asistencial definir lo que se considera nivel bajo de glucosa ya que en la literatura se han propuesto diferentes puntos de corte que oscilan de ≤ 5 mg/dl a ≤ 16 mg/dl [54, 55, 57, 64] y no existe consenso sobre el punto de corte óptimo para diagnosticar infección intraamniótica en pacientes asintomáticas sin corioamnionitis clínica (Tabla 1).

	S	E	VPP	VPN
≤ 5 mg/dl ¹	41%	100%	100%	70%
≤ 10 mg/dl ²	50%	100%	100%	74%
≤ 14 mg/dl ³	55%	94%	86%	76%
≤ 16 mg/dl ⁴	79%	94%	87%	90%

S: Sensibilidad, E: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

Tabla 1. Identificación de infección intraamniótica basándose en distintos puntos de corte de glucosa en líquido amniótico referidos en la literatura.¹Klitz RJ. *Obstet Gynecol* 1991; ²Kirshon B *Am J Obstet Gynecol* 1991; ³Romero R. *Am J Obstet Gynecol* 1990; ⁴Gauthier DW. *Am J Obstet Gynecol* 1991.

1.9.2.4 Interleuquina-6 (IL6) en líquido amniótico.

La IL6 ha demostrado ser el marcador más sensible predictor de infección intraamniótica en la amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras, con porcentajes que oscilan del 80 al 100%, según las series [58]. Romero *et al* [58] describen una sensibilidad del 100% con una especificidad del 82.57%, un valor predictivo positivo del 36.67% y un valor predictivo negativo del 100% para detectar infección intraamniótica, cuando los niveles de IL6 en líquido amniótico son ≥ 11.30 ng/ml.

Debido a que la IL6 está implicada en la inducción de la síntesis de la proteína C reactiva (PCR), se ha hipotetizado que esta citoquina desarrolla un papel importante en la respuesta del huésped a la infección intrauterina [65].

En el grupo de infección intraamniótica, las concentraciones de IL6 en líquido amniótico son consistentemente superiores a las observadas por otras citoquinas estudiadas (IL1, IL2, IL18, IL8, IFN- γ , TNF α) [65, 66]. Es la citoquina probablemente más relacionada con la fisiopatología del parto pretérmino asociado a la infección siendo la que, con más probabilidad, se asocia a infección intraamniótica y corioamnionitis histológica [65, 67-69].

El potencial valor de la IL6 como test diagnóstico rápido para detectar invasión microbiana en la cavidad amniótica tiene una explicación biológica. La invasión microbiana en pacientes con amenaza de parto prematuro se ha asociado de forma significativa a una elevación de los niveles de IL6 en líquido amniótico. Tanto los lipopolisacáridos como otras citoquinas inflamatorias (IL1, TNF) han demostrado inducir la producción de IL6 por el corion y las células de la

decidua. La IL6 estimula la producción de prostaglandinas por el amnios y las células de la decidua induciendo contracciones uterinas y promoviendo modificaciones cervicales antes de que los microorganismos puedan invadir la cavidad amniótica [65, 68].

Aunque es un marcador muy sensible, la tasa de falsos positivos reportados en la literatura no es despreciable y se sitúa en el 17-34% [58, 68]. La tasa de falsos positivos se explica porque IL6 es reflejo de un estado inflamatorio por lo que suele estar elevada en otros contextos no infecciosos como en pacientes con índice de Bishop avanzados como parte del proceso de parto normal. En ausencia de infección, la IL6 puede ser detectada a cualquier edad gestacional en el líquido amniótico pero en concentraciones muy bajas, incrementando sus niveles en el momento del parto ya sea éste pretérmino o a término. A mayor dilatación cervical, mayor concentración de IL6 en líquido amniótico. De ahí que, aunque es un marcador de aplicabilidad asistencial técnicamente asequible en la mayoría de laboratorios, su utilidad clínica sea todavía limitada por su tasa de falsos positivos [58, 68].

1.9.2.5 Metalloproteínasa-8 (MMP8) en líquido amniótico.

Más novedosa es la utilización de MMP8 como marcador inflamatorio en el parto prematuro espontáneo.

La Metalloproteínasa-8 (MMP8) es una enzima de la familia de las colagenasas sintetizada exclusivamente por neutrófilos que se expresa en el líquido amniótico de mujeres con parto pretérmino, rotura prematura de membranas e infección intraamniótica [56].

Las MMP están implicadas en los procesos de borramiento cervical y en la degradación de las membranas fetales. Degradan el tejido conectivo permitiendo la ruptura de las membranas.

El grupo de Romero [70] ha patentado un test de detección rápida de MMP8 en líquido amniótico (no comercializado hasta el momento actual), describiendo unas tasas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo para la predicción de infección intraamniótica en las pacientes con amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras del 83%, 95%, 56% y 99%, respectivamente [70]. La importancia del test radicaría en su valor predictivo negativo y en su baja tasa de falsos positivos.

Sin embargo, únicamente existe una serie publicada en la literatura [70] que detecte inflamación intraamniótica mediante MMP8 en el subgrupo de amenaza parto pretérmino. Las referencias previas [51, 56] incluyen el subgrupo con rotura prematura de membranas. De ahí que sea necesarios estudios prospectivos que ratifiquen sus resultados antes de introducirla en la práctica clínica asistencial.

1.9.2.6 Estudio proteómico en líquido amniótico.

En la búsqueda de nuevos marcadores precoces predictores de infección intraamniótica aparece el estudio proteómico. En otros ámbitos médicos, el estudio proteómico se perfila como una herramienta complementaria al análisis genómico basándose en la identificación no del gen responsable sino de las proteínas que se expresan en una determinada patología y que serán las que, en realidad, generan el cuadro patológico.

En la actualidad, el estudio proteómico se está aplicando en diferentes terrenos de la medicina como la enfermedad de Alzheimer o en patología oncológica ginecológica (cáncer de mama, ovario) [71-74]. Además, el análisis proteómico permite la identificación de proteínas expresadas como respuesta inflamatoria a diferentes patologías como la psoriasis, artritis reumatoide u otras enfermedades de etiología inflamatoria [74].

Numerosas proteínas asociadas a inflamación, incluyendo *Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1 y 2*, se han identificado en líquido amniótico en el subgrupo de pacientes con amenaza de parto prematuro y rotura prematura de membranas [52, 75-77].

Literatura reciente sugiere que el perfil proteómico de estas proteínas permite la identificación de la infección intraamniótica con sensibilidades y especificidades similares a las de la IL6, del 86.2%, y del 89.6% [76].

Además, el análisis proteómico del líquido amniótico parece identificar aquellas mujeres con inflamación severa que con más probabilidad presentaran funisitis histológica, sepsis congénita neonatal y un intervalo de tiempo hasta el parto más corto [78].

Las *Calgranulins* son miembros de las proteínas *S100 calcium-binding proteins* y son expresadas por los macrófagos y células epiteliales en tejidos en fase de inflamación aguda. Están implicadas en enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, cáncer, cardiomiopatía, psoriasis, artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias [71, 72, 79, 80].

Las *Neutrophil defensins* pertenecen a una familia de péptidos antimicrobianos sintetizados exclusivamente por neutrófilos. Actúan como mecanismo de defensa del huésped ejerciendo una actividad bactericida a través de su paso por las membranas bacterianas. Los niveles de *defensins* se hallan elevados en pacientes con sepsis, meningitis y fibrosis quística [73, 81].

En la tabla 2 se resumen los valores predictivos de los diferentes marcadores inflamatorios propuestos en la literatura para diagnosticar infección intraamniótica:

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Glucosa ≤ 14 ¹	55%	94%	86%	76%
IL6 ≥ 11.3 ²	100%	82.57%	36.67%	100%
MMP8 ³	83%	95%	56%	99%
Proteómica ⁴	86.2%	89.5%	83.3%	91.4%

Tabla 2. Valores predictivos de diferentes marcadores de infección/inflamación para diagnosticar infección intraamniótica.¹Romero R. *Am J Obstet Gynecol* 1990; ²Romero R. *Am J Obstet Gynecol* 1993; ³Nien JK. *Am J Obstet Gynecol* 2006; ⁴Buhimschi I. *BJOG* 2005.

La utilización de un test diagnóstico que integre de forma combinada marcadores en líquido amniótico asequibles a nivel asistencial (como la IL6) y otras proteínas inflamatorias de más novedosa aparición (como las *Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1, 2*) podría mejorar la tasa de detección de infección intraamniótica reduciendo la tasa de falsos positivos y prediciendo más eficazmente

qué pacientes acabarán presentando un cultivo positivo. Esto permitiría iniciar de forma precoz estrategias prenatales para tratar la infección en una etapa subclínica.

1.9.3 Identificación del grupo de riesgo de inflamación / infección intraamnióticas mediante parámetros clínicos y ecográficos.

El método óptimo para predecir la presencia de infección / inflamación en la cavidad amniótica es el análisis del líquido amniótico. El inconveniente es que requiere para su estudio de un procedimiento invasivo: la amniocentesis.

En la amenaza de parto pretérmino, la prevalencia de infección intraamniótica es del 10-12% y la prevalencia de inflamación intraamniótica, del 10-30% [6, 13, 14].

El tratamiento indiscriminado con antibióticos en la amenaza de parto pretérmino con membranas íntegras no ha demostrado reducir las tasas de prematuridad, ni el intervalo de tiempo al parto, ni la morbimortalidad neonatal [82]. Resulta, por lo tanto, discutible la realización de una amniocentesis sistemática en todas las pacientes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra para un diagnóstico de infección intraamniótica, cuando aún no existe literatura que demuestre que el tratamiento antibiótico dirigido en los casos con evidencia de inflamación / infección mejora el resultado perinatal.

Es por ello que lo más eficiente, a la espera de estudios prospectivos que den respuesta a la incógnita del posible beneficio de tratar la infección / inflamación intraamnióticas, es identificar en las

pacientes con amenaza de parto prematuro y bolsa íntegra, el subgrupo de mayor riesgo de presentar inflamación intraamniótica.

1.9.3.1 Edad gestacional en el debut clínico de amenaza de parto pretérmino.

La edad gestacional ha demostrado ser un factor independiente de infección intraamniótica [83]. A menor edad gestacional, mayor el riesgo de inflamación e infección intraamnióticas[35, 39, 40].

Gómez *et al* [84] elaboraron una tabla en la que se estimaba el riesgo de invasión microbiana de la cavidad amniótica en pacientes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra en función de la edad gestacional y de la longitud cervical demostrando que, a menor longitud cervical y a menor edad gestacional, mayor el riesgo de infección intraamniótica. Sin embargo, en este trabajo no se determinó si estos dos factores de riesgo actuaban de forma independiente.

Además, la literatura aún no ha definido un punto de corte de edad gestacional a partir del cuál el riesgo de inflamación / infección intraamnióticas sea bajo y no justifique asumir los riesgos de un procedimiento invasivo para su diagnóstico, máxime cuando todavía no está demostrado el beneficio de una posible terapia.

1.9.3.2 Longitud cervical ecográfica.

La evidencia científica demuestra que el riesgo de infección intraamniótica es directamente proporcional al grado de dilatación

cervical y por tanto, inversamente proporcional a la longitud cervical [85].

Tanto la exploración digital como la valorada ecográficamente han demostrado que el acortamiento cervical es un factor de riesgo de parto pretérmino [86, 87].

La invasión microbiana en la interfase coriódécidual predispone a la liberación de citoquinas inflamatorias que provocan un acortamiento cervical.

La presencia de un cérvix corto también predispone a un mayor riesgo de infección intrauterina vía ascendente por una posible pérdida del moco cervical que, no sólo actúa como barrera mecánica sino que, también forma parte del sistema inmune innato [37, 88, 89]. Pacientes con cérvix corto y cambios en el ecosistema microbiano del tracto genital inferior tienen mayor riesgo de presentar una infección intraamniótica vía ascendente. Las tasas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo descritas por Gómez *et al* [84] de un cérvix inferior a 15 mm para predecir infección intraamniótica son 54%, 89%, 26% y 96%, respectivamente [84].

La longitud cervical ecográfica ha demostrado ser mejor predictor de infección intrauterina que otros parámetros clínicos maternos como la temperatura, el índice de Bishop, la frecuencia de las contracciones uterinas y los antecedentes previos de parto pretérmino [37, 84].

La longitud cervical también se ha considerado factor predictor de inflamación intraamniótica. Holst *et al* [90] demostraron que en pacientes con amenaza de parto pretérmino, un cérvix inferior a 15 mm se asociaba de forma significativa a un mayor riesgo de inflamación

intraamniótica (niveles altos de IL6 en el líquido amniótico), con una sensibilidad y especificidad del 72% y 83%, respectivamente y unos valores predictivos positivo y negativo de 78% y 78%, respectivamente [90]. Las conclusiones del estudio refuerzan la importancia en la medición de la longitud cervical por ecografía transvaginal en la amenaza de parto pretérmino como herramienta no invasiva para seleccionar el grupo de riesgo de parto pretérmino de causa infecciosa / inflamatoria. Sin embargo, es el único estudio reportado en la literatura que demuestra una relación entre la longitud cervical y la inflamación intraamniótica.

Establecer un punto de corte de edad gestacional y de longitud cervical ecográfica en el debut clínico de mayor riesgo de presentar inflamación / infección intraamnióticas permitiría seleccionar el subgrupo de riesgo infeccioso permitiendo reducir el porcentaje de amniocentesis que se realizan en pacientes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra.

1.10 Tratamiento y prevención de la infección intraamniótica.

Aunque la infección intraamniótica es considerada la causa conocida más frecuente de parto prematuro [3, 6, 13, 41], la eficacia del tratamiento de la infección intrauterina para reducir la prematuridad continúa siendo un interrogante no resuelto.

A raíz de los resultados de metanálisis de la década de los 90 [91] y del estudio ORACLE I [92] resulta evidente que la antibioterapia en la rotura prematura de membranas reduce el porcentaje de infección materna, retrasa el parto, reduce el porcentaje de infecciones

neonatales, de distrés respiratorio, de secuelas neurológicas mayores así como la mortalidad antenatal y neonatal.

Sin embargo, del metanálisis de la Cochrane Library que incluía el estudio ORACLE II [82], se concluyó que en pacientes con amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras, el uso indiscriminado de antibióticos no reducía el parto pretérmino, ni retrasaba 48 h el intervalo de tiempo al parto, ni reducía las tasas de mortalidad perinatal ni de sepsis neonatal. Sí se reducía de forma significativa el riesgo de infección materna pero dicho beneficio no representaba una justificación para utilizar de forma indiscriminada antibióticos de amplio espectro en el parto pretérmino con bolsa íntegra [82].

Además, no sólo se ha demostrado que el tratamiento antibiótico indiscriminado en la amenaza de parto pretérmino no representa ningún beneficio perinatal sino que de los resultados del ORACLE Children Study II [93] se concluye que, aunque el riesgo de parálisis cerebral es bajo, en el seguimiento neonatal a los 7 años de vida, los niños de las gestantes con amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras que recibieron antibióticos (eritromicina o amoxiclavulánico), presentan mayor riesgo de parálisis cerebral que los que no recibieron antibioterapia (eritromicina 53/1611 (3.3%) versus no antibióticos 27/1582 (1.7%); amoxiclavulánico 50/1587 (3.2%) versus no antibióticos 30/1586 (1.9%) [93]. Una posible explicación reportada en la literatura[94] es que, en el subgrupo de población con infección intraamniótica subclínica, el régimen antibiótico utilizado en el ORACLE II habría resultado insuficiente y habría enmascarado el curso clínico natural de la infección. En el feto habría provocado una exposición durante un mayor intervalo de tiempo a un ambiente inflamatorio hostil y habría derivado en un mayor riesgo de daño neurológico irreversible.

Los autores sugieren que no sólo sería importante definir la combinación antibiótica recomendable activa contra los microorganismos más frecuentemente implicados en la infección intraamniótica, sino también insistir en su inicio precoz, antes de que se desencadene la respuesta inflamatoria en el feto.

Posiblemente, la ineficacia del tratamiento antibiótico en la amenaza de parto pretérmino con bolsa íntegra sea consecuencia de la etiología multifactorial del parto prematuro, en el que la causa infecciosa representa únicamente un 10-12% de los casos [14]. El grupo de pacientes con inflamación intraamniótica subclínica podría representar el grupo de riesgo que con más probabilidad podría beneficiarse de un tratamiento antibiótico / antiinflamatorio precoz que mejorara el pronóstico en cuanto a prematuridad y morbilidad neonatal por actuar en una etapa previa a la infección.

1.11 Planteamiento de los estudios que componen la Tesis Doctoral y justificación de su temática.

Los estudios que conforman la presente Tesis Doctoral forman parte de una misma línea de investigación basada en la predicción de infección intraamniótica en la población que debuta con amenaza de parto prematuro y membranas íntegras a través del diagnóstico de inflamación intraamniótica.

Independientemente del resultado de los cultivos, la inflamación intraamniótica se ha relacionado con la infección intraamniótica y se ha asociado a mayores tasas de parto prematuro y mayor morbimortalidad neonatal.

En el primer estudio evaluamos y comparamos el valor predictivo de la IL6 y de determinados biomarcadores proteómicos en líquido amniótico, como marcadores inflamatorios de infección intraamniótica, parto pretérmino y mal resultado neonatal.

Además, pretendemos ratificar los resultados de la escasa literatura anterior sobre el papel del perfil proteómico (concretamente de *Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1, 2*) en el líquido amniótico de gestantes con amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras.

Debido a que no existe literatura previa que demuestre si la IL6 y dichos biomarcadores proteómicos actúan como factores de riesgo independientes de infección intraamniótica, parto pretérmino y morbimortalidad neonatal, también nos proponemos evaluar dicho objetivo en el primer estudio.

Si demostramos que son factores de riesgo independientes, podríamos proponer un modelo diagnóstico que los combinara y que demostrara que la presencia de uno o ambos marcadores en líquido amniótico empeora el pronóstico de la gestación.

La utilidad clínica de este modelo combinado sería disponer en un futuro de un test diagnóstico de lectura rápida que pudiera ser aplicable a la paciente que ingresa por amenaza de parto prematuro y que pronosticara qué pacientes acabarían presentando una infección intraamniótica, un parto pretérmino y un peor resultado neonatal sin esperar al resultado de los cultivos microbiológicos convencionales.

Con un diagnóstico más precoz, podríamos iniciar estrategias prenatales para tratar la infección intraamniótica o decidir una

finalización activa de la gestación en caso de mal pronóstico global. Sin embargo, no es el objetivo de la presente Tesis Doctoral definir si dichas actuaciones terapéuticas mejorarían los resultados perinatales.

El inconveniente de la propuesta de un modelo diagnóstico combinado es que para la identificación de dichos marcadores inflamatorios se requiere del estudio del líquido amniótico y por tanto, de la práctica de una amniocentesis diagnóstica. Si se demostrara la eficacia en el tratamiento médico antibiótico / antiinflamatorio de la infección / inflamación intraamnióticas quedaría justificada la realización de una amniocentesis sistemática en todos los casos de amenaza de parto pretérmino para detectar el 10-12% [14] de casos de infección o el 10-30% [35] de inflamación intraamniótica. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que un tratamiento médico dirigido mejore el pronóstico de la gestación.

El segundo estudio pretende demostrar si la edad gestacional al ingreso y la longitud cervical son marcadores independientes de inflamación intraamniótica.

Si demostramos que ambos son factores de riesgo independientes, podríamos proponer un algoritmo pronóstico en la población con amenaza de parto pretérmino, con diferentes puntos de corte, tanto de edad gestacional como de longitud cervical, que pudiera ayudar al clínico a seleccionar el grupo de mayor riesgo de inflamación intraamniótica y que más se beneficiaría de la práctica de una amniocentesis para conocer el auténtico estado infeccioso / inflamatorio de la paciente.

Por último, el segundo estudio también pretende ratificar los resultados previamente publicados sobre el papel de la IL6 como

marcador inflamatorio de infección intraamniótica demostrando que su presencia en líquido amniótico se asocia a mayores tasas de prematuridad, a mayor porcentaje de cultivos de líquido amniótico positivos y a una morbilidad neonatal mayor.

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La infección intraamniótica y la inflamación intraamniótica son los dos únicos procesos en los que existe una relación causal directa con el parto pretérmino y el mal resultado perinatal. A menor edad gestacional y a menor longitud cervical, mayor el riesgo de infección / inflamación intraamnióticas.

Se han propuesto diferentes marcadores de infección (estudio mediante tinción de Gram, glucosa) y de inflamación (IL6, MMP8, perfil proteómico) en el líquido amniótico, con el objetivo de disponer de una información diagnóstica más precoz que los cultivos microbiológicos convencionales.

A pesar de presentar una buena sensibilidad para diagnosticar infección intraamniótica, la mayoría de estos marcadores están limitados por su tasa de falsos positivos y su bajo valor predictivo positivo. Además, en la actualidad, el análisis de los marcadores inflamatorios requiere del estudio en líquido amniótico con el riesgo de complicaciones que, aunque bajo, está asociado al procedimiento invasivo.

Quedan, no obstante, aspectos poco conocidos sobre estos marcadores inflamatorios en líquido amniótico:

- 1.- No existe evidencia en la literatura que demuestre si los marcadores inflamatorios, como la IL6 o determinados biomarcadores proteómicos (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) actúan como factores de riesgo independientes de infección intraamniótica, de parto pretérmino y de mal resultado neonatal y que confieren, por sí solos, un mal pronóstico a la gestación.

2.- Tampoco existen referencias que demuestren si la edad gestacional en el debut clínico y la longitud cervical ecográfica actúan como factores de riesgo independiente de inflamación intraamniótica.

3.- Además, no se han establecido en la literatura puntos de corte ni de edad gestacional ni de longitud cervical que se asocien a un mayor riesgo de inflamación intraamniótica.

Demostrar que la combinación de marcadores inflamatorios como la IL6 y determinados biomarcadores proteómicos (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) mejora la tasa de detección de infección intraamniótica, y reduce el porcentaje de falsos positivos permitiría disponer de un modelo diagnóstico de infección intraamniótica con un mejor valor predictivo que la utilización aislada de cada uno de ellos.

A la espera de demostrar un beneficio en el tratamiento médico con antibiótico / antiinflamatorio dirigido a la infección / inflamación intraamnióticas en gestantes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra, resulta de gran interés clínico seleccionar el subgrupo con mayor riesgo inflamatorio a través de parámetros clínicos no invasivos como la edad gestacional y la longitud cervical.

3 OBJETIVOS

Objetivos

1. Demostrar que determinadas proteínas inflamatorias (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) en líquido amniótico se asocian a mayor riesgo de prematuridad, infección intraamniótica y malos resultados neonatales (estudio 1).
2. Calcular las tasas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de la IL6 en líquido amniótico para predecir infección intraamniótica, parto prematuro y morbilidad neonatal (estudio 1).
3. Calcular las tasas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de determinadas proteínas inflamatorias (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) en líquido amniótico para predecir infección intraamniótica, parto prematuro y morbilidad neonatal (estudio 1).
4. Demostrar que IL6 y determinados biomarcadores proteómicos (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) en líquido amniótico, son marcadores independientes de infección intraamniótica, parto pretérmino y malos resultados neonatales (estudio 1).
5. Demostrar que, en pacientes con amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras, la integración en un mismo modelo diagnóstico de IL6 y determinadas proteínas inflamatorias (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) en líquido amniótico mejora la tasa de detección y de predicción de infección intraamniótica, parto prematuro y morbilidad neonatal, reduciendo la proporción de falsos positivos (estudio 1).

6. Demostrar que la inflamación intraamniótica, definida por niveles altos de IL6 en líquido amniótico, se asocia a parto pretérmino, infección intraamniótica y malos resultados neonatales en la amenaza de parto pretérmino (estudio 2).
7. Establecer un punto de corte de edad gestacional de mayor riesgo de presentar inflamación intraamniótica (estudio 2).
8. Calcular las tasas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de un punto de corte de riesgo de edad gestacional para predecir inflamación intraamniótica (estudio 2).
9. Establecer un punto de corte de longitud cervical ecográfica de mayor riesgo de presentar inflamación intraamniótica (estudio 2).
10. Calcular las tasas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de un punto de corte de riesgo de longitud cervical ecográfica para predecir inflamación intraamniótica (estudio 2).
11. Demostrar que la edad gestacional en el debut clínico y la longitud cervical ecográfica son marcadores independientes de inflamación intraamniótica (estudio 2).
12. Demostrar que la integración de la edad gestacional en el debut clínico y la longitud cervical ecográfica en un mismo modelo diagnóstico mejora la tasa de detección y predicción de inflamación intraamniótica (estudio 2).

**4 INVESTIGACIONES REALIZADAS.
METODOLOGÍA Y RESULTADOS
GLOBALES**

4.1. METODOLOGÍA DE ESTUDIO

El diseño del estudio, la población de estudio así como la metodología utilizada se detallan en los apartados de “Material y Métodos” de cada uno de los artículos que constituyen el cuerpo doctrinal de la presente Tesis Doctoral.

Dichos artículos se incluyen a continuación tal y como han sido aceptados para publicación en la literatura científica.

Estudio 1

“Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes.”

Teresa Cobo, Montse Palacio, Aleix Navarro-Sastre, Antonia Ribes, Jordi Bosch, Xavier Filella, Eduard Gratacós.

Am J Obstet Gynecol. 2009 May;200(5):499.e1-6

OBSTETRICS

Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes

Teresa Cobo, MD; Montse Palacio, MD; Aleix Navarro-Sastre, MD; Antonia Ribes, MD; Jordi Bosch, MD; Xavier Filella, MD; Eduard Gratacós, MD

OBJECTIVE: To assess proteomic biomarkers and interleukin-6 alone or in combination to predict intraamniotic infection, preterm birth, and neonatal morbidity in preterm labor with intact membranes.

STUDY DESIGN: Amniotic fluid interleukin-6 and selected proteomic biomarkers were assayed from 86 patients with preterm labor and intact membranes (22-36 weeks). The predictive value of each marker alone or in combination was evaluated for intraamniotic infection, preterm birth, and neonatal composite morbidity.

RESULTS: Both interleukin-6 (odds ratio, 19.5; $P = .012$) and proteomic biomarkers (odds ratio, 25.2; $P = .001$) were statistically inde-

pendent predictors of intraamniotic infection with sensitivity, positive predictive value, and false-positive rates of 25%, 17.6%, and 20% when 1 marker was present and of 75%, 75%, and 4.3% when both were detected. Their combination did not improve prediction of preterm birth or neonatal morbidity.

CONCLUSION: The combined use of proteomic biomarkers and interleukin-6 to predict intraamniotic infection shows better accuracy than when used alone.

Key words: interleukin-6, intraamniotic infection, preterm labor with intact membranes, proteomic biomarkers

Cite this article as: Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, et al. Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:499.e1-499.e6.

The main challenges in the clinical management of threatened preterm labor are the prediction of intraamniotic infection and preterm birth. The strongest predictor of intraamniotic infection is intraamniotic inflammation, which may occur in up to 20% of patients with preterm labor.¹ Intraamniotic inflammation has been demonstrated to be associated with a shorter latency time to delivery and a significantly increased rate

of neonatal adverse outcomes, even in the absence of demonstrable positive cultures.² The identification of intraamniotic inflammation in clinical practice is still limited. Interleukin-6 (IL-6) in amniotic fluid has shown the best sensitivity to predict infection in patients with preterm labor, with values ranging from 80-100%.^{3,4} However, its clinical use may still be limited, considering that reported false-positive rates are 18-25% and positive predictive values 36-44%.^{3,4} This has prompted the search for further biomarkers to refine the prediction of intraamniotic infection and preterm birth.

Proteomic analysis has been proposed as a clinically useful method to diagnose intraamniotic inflammation in patients with preterm labor and/or premature rupture of membranes. Several proteins associated with inflammation, including calgranulin A, C, and neutrophil defensins 1 and 2, have been identified in amniotic fluid samples from patients with these conditions.⁵⁻⁷ Recent reports^{6,8} suggest that the profile of these proteins in amniotic fluid allows identification of intraamniotic infection with a sensitivity and specificity similar to those

previously reported for IL-6.³ These findings support the use of the amniotic fluid proteomic profile as a valid marker of inflammation and, consequently, as a predictor of the risk of intraamniotic infection. However, it is unknown whether the proteomic profile and IL-6 are independent biomarkers and, therefore, whether their combined use could improve the prediction of intraamniotic infection, preterm birth, and neonatal composite morbidity.

The purpose of this study was to confirm preliminary evidence on the diagnostic value of selected proteomic biomarkers in preterm labor with intact membranes and to assess the independent and combined contribution of proteomic biomarkers and IL-6 for the prediction of intraamniotic infection, preterm birth, and adverse outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Study population

A prospective cohort study was performed from October 2005-December 2007 at the Hospital Clínic of Barcelona, Catalonia, Spain. The patients enrolled in this study were pregnant women with

From the Departments of Maternal-Fetal Medicine (Drs Cobo, Palacio, and Gratacós), Biochemistry and Molecular Genetics (Drs Navarro-Sastre, Ribes, and Filella), and Microbiology (Dr Bosch) and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) (Drs Palacio, Navarro-Sastre, Ribes, and Gratacós), Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi-Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received June 3, 2008; revised Sept. 22, 2008; accepted Dec. 22, 2008.

Reprints not available from the authors.

0002-9378/\$36.00

© 2009 Mosby, Inc. All rights reserved.

doi: 10.1016/j.ajog.2008.12.036

clinical symptoms of preterm labor and intact membranes between 22-36 weeks of gestation. Multiple pregnancies and patients with clinical signs of chorioamnionitis at admission were considered noneligible for this study. Gestational age was established according to the first-trimester ultrasound scan. Written informed consent was obtained from all subjects to donate amniotic fluid for research purposes. The institutional review board of Hospital Clinic approved the collection and use of these samples and information for research purposes (approval date, Oct. 5, 2005).

Study design

Transvaginal cervical length was measured on admission, and transabdominal amniocentesis was performed within the first 48 hours. Cultures for genital mycoplasma, aerobic and anaerobic bacteria, as well as amniotic fluid glucose concentration, white blood cell counts, and Gram stains were performed immediately after collection and their results were available for clinical management. The remaining amniotic fluid was centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C and stored at -70°C until assayed for IL-6 and selected proteomic biomarkers, the results of which were not used for clinical decisions. Maternal blood samples were collected at admission and were also centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. The remaining serum was stored at -70°C until assayed for selected proteomic biomarkers. After delivery, placentae were routinely collected if there were signs of chorioamnionitis or fetal distress and cultured and placed in 10% neutral buffered formalin for standard histologic examination. All maternal and neonatal medical records were reviewed, and the perinatal outcome was recorded.

Pregnancy management

A complete course of antenatal steroids, betamethasone 12 mg intramuscular injection with 2 doses given 24 hours apart, was administered from 24-34 weeks. Tocolysis (ritodrine, nifedipine, or atosiban) was considered in all cases in the absence of clinical chorioamnionitis, abruption placentae, and fetal compromise

beyond 24 weeks and before 34 weeks. Maternal and fetal status was closely monitored for signs of chorioamnionitis, labor, and/or fetal compromise. Prophylactic parenteral broad-spectrum antibiotics were given during 5 days in the following situations: advanced cervical dilatation with the exposure of the amniotic membranes to the vagina, the diagnosis of intraamniotic infection, and the development of clinical signs of chorioamnionitis. The antibiotic regimen of choice was parenteral ampicillin 1 g every 6 hours and gentamycin 80 mg every 8 hours. In the absence of clinical chorioamnionitis, patients with a positive amniotic fluid culture were given parenteral antibiotics and closely monitored for signs of chorioamnionitis or fetal compromise until 34 weeks, when they were allowed to labor. Induction of labor was based on gestational age and maternal or fetal clinical signs of chorioamnionitis.

Terminology definition

Preterm labor was defined as the presence of regular uterine contractions with a frequency of at least 2 every 10 minutes and cervical changes. Clinical chorioamnionitis was defined according to Gibbs' criteria as a temperature elevation to 37.8°C and 2 or more of the following criteria: uterine tenderness, malodorous vaginal discharge, fetal tachycardia (> 160 beats per minute [bpm]), maternal tachycardia (> 100 bpm), and maternal leukocytosis > 15000/mm³.⁹ Intraamniotic infection was considered in patients with a positive amniotic fluid culture.¹⁰ Histologic chorioamnionitis was defined as an infiltration of the chorion and/or amnion by polymorph nuclear leukocytes and histologic funisitis as the presence of neutrophil infiltration into the umbilical vessel walls or into Wharton's jelly.¹¹ Neonatal composite morbidity included the presence of any of the following criteria: intraventricular hemorrhage, respiratory distress syndrome, congenital sepsis, and periventricular leukomalacia by ultrasound suspicion. Puerperal endometritis was considered in patients with a temperature ³ 38°C on 2 occasions 4 hours apart (excluding the day of delivery), associated with uterine tenderness, foul-smelling lochia, and no

other apparent source of infection.⁹ To compare maternal and neonatal results, we defined "positive proteomic biomarkers" on detection of at least 1 inflammatory protein in amniotic fluid (calgranulin A or C or neutrophil defensin 1, 2) and "negative proteomic biomarkers" when none of these proteins was detected.

Methods

IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Bio-source; Invitrogen, Carlsbad, CA). The minimum detectable level of IL-6 was 0.2 ng/mL. Our proteomic profile was based on the identification of selected proteomic biomarkers (calgranulin A, C, and neutrophil defensin 1, 2) using SDS-PAGE methodology and confirmed by Western blot. Details about the methodology used for proteomic biomarkers determinations are available in a supplemental appendix.

Statistical analysis

Data were collected in an Access Database made for this purpose. Statistical analyses were performed with the SPSS 14.0 statistical software (SPSS, Inc, Chicago, IL). Receiver-operator curve (ROC) analysis was used to display the relationship between sensitivity and false-positive (FP) rate (1-specificity) and to select the best cutoff value for IL-6 to diagnose intraamniotic infection. Two × 2 contingency tables were constructed and χ^2 test or Fisher exact test analysis of independence was used to identify significant differences among test performances. Continuous data were compared with the Student *t* test. Diagnostic indices were calculated (sensitivity, specificity, positive predictive value [PPV], negative predictive value [NPV], positive likelihood ratio [LR+], and negative likelihood ratio [LR-]) for IL-6 and selected proteomic biomarkers to identify intraamniotic infection, preterm delivery < 37 weeks, and neonatal composite morbidity.

Univariate and logistic regression were performed to investigate the relationship between proteomic biomarkers and IL-6 and the occurrence of intraamniotic infection, preterm delivery < 37

TABLE 1

Diagnostic indices of selected proteomic biomarkers and IL-6 to diagnose different outcomes

Variable	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	LR+	LR-
IL-6 \geq 13.4 ng/dL						
Intraamniotic infection	91.6	80	44	98.3	4.5	0.10
Preterm delivery < 37 wk	46	93.8	92	52.6	7.4	0.57
Neonatal composite morbidity	19.7	38.1	48	14.03	0.5	1.3
Selected proteomic biomarkers						
Intraamniotic infection	83.3	91.9	62.5	97.1	10.15	0.18
Preterm delivery < 37 wk	30	96.9	93.8	47	9.6	0.72
Neonatal composite morbidity	40.9	89.1	56.2	81.4	3.75	0.66

IL-6, interleukin-6; LR-, negative likelihood ratio; LR+, positive likelihood ratio; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; Cobo. Predictive value of combined AF proteomic biomarkers an IL-6 in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2009.

weeks, and neonatal composite morbidity. A *P* value of less than .05 was used to indicate significance.

RESULTS

Over the study period, from 130 eligible patients with clinical symptoms of preterm labor, a total of 86 patients were not under antibiotics at admission and signed the consent form. Amniotic fluid samples could be retrieved from all cases. The analysis of the first 30 maternal blood samples revealed that none of the proteins of interest was present. Therefore, the remaining maternal blood samples were not analyzed. Gestational ages at admission and at delivery of the 44 women not included were comparable to the population of study.

Gestational age, cervical length at admission, and gestational age at delivery of the entire study population were (median and range) 31.2 (22.1-36.0) weeks, 15.5 (1-45) mm, and 35.0 (22.1-41.5) weeks, respectively. The overall rate of intraamniotic infection, defined as a positive amniotic fluid culture, was 13.9% (12/86). The microorganisms isolated from the amniotic fluid included *Ureaplasma urealyticum* (n = 3), *Candida albicans* (n = 2), *Proteus mirabilis* (n = 1), *Fusobacterium* spp (n = 1), *Streptococcus viridans* (n = 1), *Staphylococcus epidermidis* (n = 1), *Bacteroides* spp (n = 1), *Escherichia coli* (n = 1), and *Peptostreptococcus* spp (n = 1).

IL-6 was measured in 82 cases. The measurement could not be performed in

4 cases because of technical problems with the sample. ROC analysis demonstrated that the best cutoff value for IL-6 to diagnose intraamniotic infection was 13.4 ng/mL (area under the curve, 0.869; 95% confidence interval, 0.78-0.93). The prevalence of intraamniotic inflammation according to this cutoff was 30.4% (25/82). The sensitivity, specificity, PPV, NPV, LR+, and LR- of IL6 to predict intraamniotic infection, preterm delivery < 37 weeks, and neonatal composite morbidity are displayed in Table 1.

“Positive proteomic biomarkers” were detected in 18.6% (16/86) of women. The sensitivity, specificity, PPV, NPV, LR+, and LR- of the selected proteomic biomarkers to diagnose intraamniotic infection, preterm delivery < 37 weeks and neonatal composite morbidity are summarized in Table 1. A subanalysis was performed to compare the maternal and neonatal characteristics in patients with “positive and negative proteomic biomarkers” (Table 2). Gestational age at admission and at delivery, amniocentesis-to-delivery interval, mean birthweight, days of admission in the neonatal intensive care unit (NICU), major neonatal morbidity, and mortality rates were significantly worse among the group of women with “positive proteomic biomarkers.”

Logistic regression showed that both the proteomic biomarkers and the amniotic fluid IL-6 had a significant and independent relationship with intraamniotic infection (Table 3). However, when the relationship with preterm delivery < 37

weeks and neonatal composite morbidity were analyzed, only IL-6 remained significantly associated. An algorithm was constructed to describe the relationship between the presence of IL-6 and/or selected proteomic biomarkers and intraamniotic infection. The combination of IL-6 and proteomic biomarkers had a better predictive accuracy than any of the biomarkers alone (Table 4). Amniotic fluid IL-6 or proteomic biomarkers used as single biomarkers are limited by a relatively poor performance in terms of sensitivity (25%), FP rate (20%), and PPV (17.6%). The integration of IL-6 and selected proteomic biomarkers in a combined model resulted in a considerable improvement in the detection rate (75-100%). When both markers are present in amniotic fluid, a lower FP rate (4%) and a higher PPV (75%) are achieved to predict intraamniotic infection.

COMMENT

This study provides evidence that amniotic fluid IL-6 and selected proteomic biomarkers are independent risk factors for intraamniotic infection. To predict amniotic microbial invasion, the combined use of both tests showed a considerably better accuracy than the use of each 1 alone. In contrast, the addition of the proteomic biomarkers to IL-6 did not improve the predictive value for preterm birth and neonatal morbidity.

In this study, the predictive value of IL-6 for intraamniotic infection was similar to that described in previous re-

TABLE 2
Clinical characteristics based on selected proteomic biomarkers

Variable	Negative proteomic biomarkers, n = 70	Positive proteomic biomarkers, n = 16	P
Baseline clinical features			
Maternal age (y), mean (SD)	28.5 (6.4)	32.5 (7.4)	.035
Nulliparity n (%)	39 (55.7%)	5 (31.2%)	.099
Previous preterm delivery n (%)	8 (11.4%)	5 (31.2%)	.060
GA at admission (wk), mean (SD)	30.4 (3.6)	26.1 (3.3)	< .001
GA < 28 wk n (%)	19 (27.1%)	12 (75%)	.001
GA < 32 wk n (%)	38 (54.2%)	15 (93.7%)	.004
Bishop index, mean (SD)	4.2 (3.2)	6.1 (3.0)	.038
Cervical length (mm), mean (SD)	19.2 (11.5)	11.5 (6.3)	.030
Clinical and perinatal outcome			
Positive AF culture n (%)	2 (2.8%)	10 (62.5%)	.001
AF IL-6 \geq 13.4 ng/mL n (%)	13/66 (19.6%)	12/16 (75%)	< .001
GA at delivery (wk), mean (SD)	34.7 (4.6)	27.8 (4.7)	< .001
GA < 28 wk n (%) ^a	9/19 (47.3%)	10/12 (83.3%)	.050
GA < 32 wk n (%) ^b	15/38 (39.4%)	12/15 (80%)	.008
GA < 37 wk n (%)	38 (54.2%)	15 (93.7%)	.004
AC-to-delivery < 14 d n (%)	29 (41.4%)	14 (87.5%)	.002
Birthweight (g), mean (SD)	2499.4 (1006.8)	1185.4 (756.3)	< .001
5-min Apgar score, mean (SD)	9.6 (2.0)	7.1 (3.3)	.001
UA pH, mean (SD)	7.26 (0.07)	7.27 (0.1)	.634
Clinical chorioamnionitis n (%)	7 (10%)	3 (18.7%)	.386
Histologic chorioamnionitis n (%)	12/26 ^c (46.1%)	10/11 ^c (90.9%)	.001
Histologic funisitis n (%)	4/26 ^c (15.3%)	7/11 ^c (63.6%)	.006
Puerperal endometritis n (%)	0	0	—
Neonatal outcomes			
Days of admission to NICU, mean (SD)	11.9 (22.8)	39.9 (34.7)	< .001
Major neonatal morbidity n (%)	13 (18.5%)	9 (56.2%)	.004
Neonatal mortality n (%)	3 (4.2%)	5 (31.2%)	.005

AC, amniocentesis; AF, amniotic fluid; GA, gestational age; IL-6, interleukin-6; NICU, neonatal intensive care unit; SD, standard deviation; UA, umbilical artery.

^a Thirty-one women were admitted < 28 wk; ^b Fifty-three women were admitted < 32 wk; ^c Placentae collected.

Cobo. Predictive value of combined AF proteomic biomarkers and IL-6 in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2009.

ports.^{3,4} In addition, our findings were in line with the 2 previous studies evaluating the value of the proteomic profile to predict intraamniotic infection.^{6,8} We further confirm the relationship between “positive proteomic biomarkers” and perinatal adverse outcomes as previously described.⁸⁻¹² However, we did not reproduce the nearly 100% sensitivity to predict preterm birth as reported by Buhimschi et al,⁶ with only a 30% sensitivity in our patients. We speculated that the

different case mix of the 2 series may partially explain the difference. The population studied by Buhimschi et al⁶ included a significant proportion of patients with premature rupture of membranes, with substantially higher intraamniotic infection and preterm delivery rates than women with preterm labor and intact membranes.¹³ Finally, calgranulin A, C, and neutrophil defensins 1, 2 were not detected in maternal blood samples, although preliminary data reported by Gravett et al⁷

suggested that other proteomic biomarkers, such as calgranulin B and IGFBP-1, might be detectable in maternal serum.

The main contribution of amniotic fluid biomarkers in preterm labor with intact membranes is in the potential identification of intraamniotic infection at an earlier stage of microbial invasion. As demonstrated in this and previous studies,^{3,4} IL-6 used as a single biomarker is limited by a relatively poor performance in terms of FP rate and PPV. The in-

TABLE 3

Relationship between inflammatory markers and intraamniotic infection, preterm delivery < 37 wk, and neonatal composite morbidity analyzed by logistic regression

Variable	Odds ratio	95% CI	P
Intraamniotic infection			
Selected proteomic biomarkers	25.2	3.7-169.5	.001
Amniotic fluid IL-6 \geq 13.4 ng/mL	19.5	1.9-198.8	.012
Preterm delivery < 37 wk			
Selected proteomic biomarkers	5.8	0.6-52.4	.115
AF IL-6 \geq 13.4 ng/mL	8.2	1.6-40.2	.009
Neonatal composite morbidity			
Selected proteomic biomarkers	2.8	0.7-10.6	.125
AF IL-6 \geq 13.4 ng/mL	4.4	1.3-14.8	.014

AF, amniotic fluid; CI, confidence interval; IL-6, interleukin-6.

Cobo. Predictive value of combined AF proteomic biomarkers and IL-6 in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2009.

tegration of IL-6 and proteomic biomarkers in a combined model resulted in a considerable improvement in the detection rate of intraamniotic infection (75%), with a lower FP rate (4%) and a higher PPV (75%), when both inflammatory markers are present. These findings support the notion that a single test that combined both markers would be useful to provide rapid prediction of infection in patients with preterm labor without clinical symptoms of chorioamnionitis.

The prediction of preterm delivery was much lower than that observed for intraamniotic infection. Preterm birth is a multietiological condition and an intraamniotic infection that reportedly account for about 20% of cases.¹ In our study, IL-6 did demonstrate to be an independent predictor of preterm delivery, with lower predictive value than that for intraamniotic infection, in agreement with previous studies.¹⁴ In addition, the

combination of the proteomic biomarkers with IL-6 did not improve the accuracy to predict preterm birth.

Proteomic biomarkers were associated with worse perinatal outcomes, but we failed to demonstrate that they are independent factors to predict neonatal composite morbidity. That could be due to the limited number of patients with intraamniotic infection or because women with positive amniotic fluid cultures were treated with antibiotics. This intervention could have changed the natural course of infection and improved neonatal results. Whether this therapeutic approach delayed overt intraamniotic infection and changed neonatal morbidity remains elusive.

Our study presents several limitations. First, the number of patients with both IL-6 and proteomic biomarkers detected in amniotic fluid was small (n = 12). Although the results suggest that the integration of IL-6 and proteomic biomar-

kers improves the prediction of intraamniotic infection, larger prospective clinical trials are needed to confirm these findings. Second, we did not perform a full proteomic characterization in amniotic fluid but rather measured selected markers of inflammation. However, we included all relevant markers consistently reported to show the strongest predictive value for intraamniotic inflammation.^{5-8,12,15,16} Finally, the clinical applicability of the results reported here is limited, because the algorithm evaluated in this study is not yet clinically applicable because of the lack of commercially available kits to determine the proteomic profile of amniotic fluid.

In conclusion, this study suggests that both IL-6 and selected proteomic biomarkers are independent inflammatory markers of infection and that their combination improves the diagnostic capacity to predict microbial invasion in women at high risk of preterm labor. The combination of both markers in a single, rapid test in the group of patients with preterm labor and intact membranes could improve the clinical management of these patients, reducing the rate of deliveries of noninfected premature infants and predicting which patients will present a positive culture to initiate early prenatal strategies to treat the infection. The findings of this study must be confirmed in larger prospective studies. ■

REFERENCES

- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007;25:21-39.
- Yoon BH, Romero R, Moon JB, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1130-6.
- Romero R, Yoon BH, Mazor M, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and Gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:805-16.
- Coultrip LL, Lien JM, Gomez R, Kapernick P, Khoury A, Grossman JH. The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:901-11.

TABLE 4

Predictive value of IL-6 and selected proteomic biomarkers in a combined model to diagnose intraamniotic infection

IL-6 and proteomic biomarkers	S (%)	FP (%)	PPV (%)	NPV (%)
One positive (n = 17)	25	20	17.6	86.1
Any positive (\geq 1) (n = 29)	100	24.3	41.3	100
Two positive (n = 12)	75	4.3	75	95.7

FP, false positive; IL-6, interleukin-6; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; S, sensitivity.

Cobo. Predictive value of combined AF proteomic biomarkers and IL-6 in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2009.

5. Buhimschi CS, Weiner CP, Buhimschi IA. Clinical proteomics: a novel diagnostic tool for the new biology of preterm labor, part I: proteomics tools. *Obstet Gynecol Surv* 2006; 61:481-6.

6. Buhimschi IA, Christner R, Buhimschi CS. Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *BJOG* 2005;112:173-81.

7. Gravett MG, Novy MJ, Rosenfeld RG, et al. Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers. *JAMA* 2004;292:462-9.

8. Buhimschi CS, Bhandari V, Hamar BD, et al. Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. *PLoS Med* 2007;4:e18.

9. Gibbs RS, Blanco JA, St Clair PJ, Castaneda YS. Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 1982;145:1-8.

10. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:3-13.

11. Lee SD, Kim MR, Hwang PG, Shim SS, Yoon BH, Kim CJ. Chorionic plate vessels as an origin of amniotic fluid neutrophils. *Pathol Int* 2004;54:516-22.

12. Buhimschi CS, Buhimschi IA, Abdel-Razeq S, et al. Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation: relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate. *Pediatr Res* 2007;61:318-24.

13. Romero R, Yoon BH, Mazor M, et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and Gram stain in the

detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:839-51.

14. Vogel I, Thorsen P, Curry A, Sandager P, Uldbjerg N. Biomarkers for the prediction of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:516-25.

15. Buhimschi CS, Weiner CP, Buhimschi IA. Proteomics, part II: the emerging role of proteomics over genomics in spontaneous preterm labor/birth. *Obstet Gynecol Surv* 2006; 61:543-53.

16. Klein LL, Freitag BC, Gibbs RS, Reddy AP, Nagalla SR, Gravett MG. Detection of intra-amniotic infection in a rabbit model by proteomics-based amniotic fluid analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1302-6.

APPENDIX

In denaturing SDS-PAGE separations, migration was determined by molecular weight. The gel was stained with Coomassie Blue to identify the proteins of interest. A Prestained Standard was used to estimate the molecular weight of the proteins of interest (Prestained SDS-PAGE Standards; Biorad). The molecular weight of calgranulin A is about 10.8 kDa and calgranulin C about 10.4 kDa. The molecular weight of neutrophil defensin 1 and 2 ranges from 3.3-3.4 kDa. Western blot further confirmed the identity of the biomarkers. In Western blot, the proteins were transferred to a

paper of nitrocellulose. The blot was incubated with a generic protein (milk proteins) to bind to any remaining sticky places on the nitrocellulose. Specific antibodies (calgranulin A goat C-terminal human, calgranulin C goat C-terminal human and human neutrophil protein [HNP] [1-0.3] goat N-terminal human; Santa Cruz Biotechnology) were then added to the solution, which was able to bind to its specific protein. After rinsing the membrane to remove unbound primary antibody, it was exposed to another antibody, secondary antibody, directed at a species-specific portion of the primary antibody. This secondary antibody, was an antigoat antibody (mouse antigoat IgG HRP; Santa Cruz Biotechnology). The colorimetric detection method depended on incubation of the Western blot with a substrate that reacted with peroxidase that was bound to the secondary antibody (Opti 4CN; Biorad). This converted the soluble dye into an insoluble form of a different color, which precipitated next to the enzyme and thereby stained the nitrocellulose membrane. The identification of the proteins of interest stained on nitrocellulose membranes was considered as a positive proteomic profile.

Estudio 2

“Cervical length and gestational age at admission as predictors of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes.”

Montse Palacio, Teresa Cobo, Jordi Bosch, Xavier Filella, Aleix Navarro-Sastre, Antonia Ribes, Eduard Gratacós.

Ultrasound in Obstetrics and Gynecology 2009; en prensa.



**CERVICAL LENGTH AND GESTATIONAL AGE AT ADMISSION
AS PREDICTORS OF INTRA-AMNIOTIC INFLAMMATION IN
PRETERM LABOR WITH INTACT MEMBRANES**

Journal:	<i>Ultrasound in Obstetrics and Gynecology</i>
Manuscript ID:	UOG-2008-0589.R2
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	01-Apr-2009
Complete List of Authors:	Palacio, Montse; Hospital Clinic Barcelona, Department of Maternal-Fetal Medicine; Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi-Sunyer (IDIBAPS) Cobo, Teresa; Hospital Clinic Barcelona, Department of Maternal-Fetal Medicine Bosch, Jordi; Hospital Clinic Barcelona, Department of Microbiology Filella, Xavier; Hospital Clinic Barcelona, Department of Biochemistry and Molecular Genetics Navarro-Sastre, Aleix; Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi-Sunyer (IDIBAPS); Hospital Clinic Barcelona, Department of Biochemistry and Molecular Genetics Ribes, Antonia; Hospital Clinic Barcelona, Department of Biochemistry and Molecular Genetics; Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi-Sunyer (IDIBAPS) Gratacós, Eduard; Hospital Clinic Barcelona, Department of Maternal-Fetal Medicine; Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi-Sunyer (IDIBAPS)
Manuscript Categories:	Obstetrics
Keywords:	Intra-amniotic inflammation, cervical length, interleukin 6, preterm labor, intact membranes, cytokines



1
2
3
4
5
6
7 **CERVICAL LENGTH AND GESTATIONAL AGE AT ADMISSION AS**
8
9 **PREDICTORS OF INTRA-AMNIOTIC INFLAMMATION IN PRETERM**
10
11 **LABOR WITH INTACT MEMBRANES**
12

13
14
15
16 Montse PALACIO^a, MD, Teresa COBO^a, MD, Jordi BOSCH^c, MD, Xavier FILELLA^b,
17
18 MD, Aleix NAVARRO-SASTRE^b, MD, Antonia RIBES^b, MD, Eduard GRATACÓS^a,
19
20 MD.
21

22
23
24
25
26 ^aDepartment of Maternal-Fetal Medicine, Institute Clinic of Gynecology, Obstetrics and
27
28 Neonatology, ^b Department of Biochemistry and Molecular Genetics and ^c Department
29
30 of Microbiology, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic and Institut de
31
32 Investigacions Biomèdiques August Pi-Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44
45 **CORRESPONDENCE TO:** Dr. Montse Palacio. Prematurity Unit. Department of
46
47 Maternal-Fetal Medicine. Hospital Clinic. Sabino de Arana 1. Barcelona 08028.
48
49 Catalonia, Spain. Tel. no. +34 93 2279946; Fax no. +34 93 2275605; E-mail:
50
51 mpalacio@clinic.ub.es
52
53

54
55
56 **SHORT TITLE:** Prediction of intraamniotic inflammation.
57
58
59
60

CONDENSATION

Cervical length < 15 mm and gestational age < 28 weeks in women admitted because of preterm labor with intact membranes are independent predictors of intra-amniotic inflammation.

For Peer Review

1
2
3
4 **CERVICAL LENGTH AND GESTATIONAL AGE AT ADMISSION AS**
5 **PREDICTORS OF INTRA-AMNIOTIC INFLAMMATION IN PRETERM**
6 **LABOR WITH INTACT MEMBRANES**
7
8
9

10
11 M.Palacio, T.Cobo, J.Bosch, X.Filella, A.Navarro, A.Ribes, E.Gratacós.
12
13

14
15
16 **ABSTRACT**
17
18

19
20
21 **Objective:** To evaluate cervical length and gestational age as predictors of intra-
22 amniotic inflammation in patients admitted because of preterm labor and intact
23 membranes.
24
25
26

27
28
29 **Methods:** 93 pregnant women with preterm labor and intact membranes were included
30 in our study. Transvaginal cervical length was measured on admission and
31 transabdominal amniocentesis was performed within the first 48 hours at admission.
32
33

34
35
36
37 Positive amniotic fluid cultures defined intra-amniotic infection. High levels of IL6
38 defined intra-amniotic inflammation. To determine the best cutoff point of IL6, a ROC
39 curve was constructed. Considering inflammatory status, perinatal outcomes were
40 evaluated and compared. Logistic regression was used to investigate associations of
41 different explanatory variables with inflammatory status. A non-invasive approach to
42 detect intra-amniotic inflammation in women admitted because of preterm labor with
43 intact membranes was evaluated.
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53
54 **Results:** Intra-amniotic infection and inflammation rates were 14% and 28%,
55 respectively. ROC curve analysis showed that best cutoff value for IL6 was 13.4 ng/mL
56 which was comparable to the cutoff of 11.3 ng/mL reported previously by other authors.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Regardless of the intra-amniotic microbial status, perinatal outcomes in women who developed intra-amniotic inflammation were worse than those who did not. Cervical length < 15 mm and gestational age at admission < 28 weeks were independently associated with intra-amniotic inflammation. A strategy considering these two non-invasive parameters could detect 84% of women with intra-amniotic inflammation.

Conclusion: Cervical length and gestational age at admission can be used as a non-invasive method to assess the risk of intra-amniotic inflammation in preterm labor and intact membranes.

Keywords: Intra-amniotic inflammation, cervical length, preterm labor, intact membranes, interleukin 6, cytokines.

INTRODUCTION

Intra-amniotic inflammation is thought to result from an ascending infection and is considered to precede intrauterine infection.¹ In preterm labor with intact membranes, intra-amniotic inflammation has been described as a risk factor of preterm delivery, has been associated with a shorter latency time to delivery and with a significantly increased rate of neonatal adverse outcomes, even in the absence of demonstrable positive cultures.²⁻⁶ Patients with intra-amniotic inflammation are more likely to be refractory to tocolysis and to rupture their membranes spontaneously.^{3, 6} It has also been described that short cervical length is related to intra-amniotic infection^{7, 8} and inflammation⁹ and that the earlier the gestational age, the higher the risk of intra-amniotic inflammation.² However, no clear cutoff in cervical length or gestational age above which the finding of an intra-amniotic inflammation is low, has been clearly established. This may be relevant, particularly considering the risks of an invasive procedure, the fact that intra-amniotic inflammation in women with preterm labor with intact membranes is found in only 10-30% of cases and that strategies to treat intra-amniotic inflammation are not yet available, making the best clinical approach controversial. Although different inflammatory markers such as amniotic fluid white blood cell count and glucose, cytokine (IL6) and matrix metalloproteinase-8 determinations (MMP-8), have been proposed to provide rapid prognostic information,¹⁰⁻¹² all they need to perform an invasive procedure.

Stratification of the risk based on non-invasive markers could substantially reduce the need for invasive procedures, thereby increasing the efficiency of the test.

The purpose of the study was to evaluate cervical length and gestational age as non-invasive markers to select the highest risk group of intra-amniotic inflammation in

1
2
3
4 preterm labor and intact membranes in which amniocentesis would be performed to
5
6 assess inflammatory status of amniotic fluid.
7
8
9

10 11 **MATERIAL AND METHODS**

12
13 **Study population.** A prospective cohort study was performed from October 2005 to
14
15 April 2008 at the Hospital Clínic of Barcelona, Catalonia, Spain. The patients enrolled
16
17 in this study were pregnant women with clinical symptoms of preterm labor and intact
18
19 membranes between 22.0 to 36.0 weeks of gestation. Multiple pregnancies, patients
20
21 with clinical signs of chorioamnionitis at admission or those who were under antibiotics
22
23 for any reason were considered non-eligible for this study. Gestational age was
24
25 established according to the first-trimester ultrasound scan. Written informed consent
26
27 was obtained from all subjects to donate amniotic fluid for research purposes. The
28
29 Institutional Review Board of Hospital Clínic approved the collection and use of these
30
31 samples and information for research purposes.
32
33
34
35

36
37 **Study protocol.** Transvaginal cervical length was measured on admission and
38
39 transabdominal amniocentesis was performed within the first 48 hours. Cultures for
40
41 genital mycoplasma, aerobic and anaerobic bacteria, as well as amniotic fluid glucose
42
43 concentration, white blood cell counts and Gram stains were performed immediately
44
45 after collection and their results were available for clinical management. The remaining
46
47 amniotic fluid was centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C and stored at -70°C
48
49 until assayed for IL-6, the results of which were not used for clinical decisions.
50
51 Maternal blood samples were collected at admission and were also centrifuged at 4000
52
53 rpm for 10 minutes at 4°C. The remaining serum was stored at -70°C until assayed for
54
55 IL6 levels. All maternal and neonatal medical records were reviewed and perinatal
56
57
58
59
60

1
2
3
4 outcome was recorded. Three groups were compared considering inflammatory and
5 infectious status of amniotic fluid: women with low IL6 and negative culture, women
6
7 with high IL6 and negative culture and women with positive culture.
8
9

10
11 **Pregnancy management.** A complete course of antenatal steroids, betamethasone 12
12 mg intramuscular injection with two doses given 24h apart, was administered from 24.0
13
14 to 34.0 weeks. Tocolysis was considered in all cases in the absence of clinical
15
16 chorioamnionitis, abruptio placentae and fetal compromise. Maternal and fetal status
17
18 were closely monitored for signs of chorioamnionitis, labor and/or fetal compromise.
19
20 Prophylactic parenteral broad-spectrum antibiotics were given in the following
21
22 situations: advanced cervical dilatation (defined as a cervical dilatation > 4 cm),
23
24 diagnosis of intra-amniotic infection and development of clinical signs of
25
26 chorioamnionitis. The antibiotic regimen of choice was parenteral ampicillin 1g every 6
27
28 h and gentamycin 80 mg every 8h given during 5 days. These antibiotics have
29
30 demonstrated in our institution to eradicate most of the microorganisms which could
31
32 potentially develop corioamnionitis. According to our protocol, in absence of clinical
33
34 chorioamnionitis, women with a positive amniotic fluid culture were given parenteral
35
36 antibiotics during 10 days and closely monitored for signs of chorioamnionitis or fetal
37
38 compromise until 34.0 weeks when they were allowed to labor. Induction of labor was
39
40 based on gestational age and maternal or fetal clinical signs of chorioamnionitis
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **Terminology definition.** Preterm labor was defined as the presence of regular uterine
50
51 contractions with a frequency of at least two every ten minutes and cervical changes.
52
53 Clinical chorioamnionitis was defined following Gibbs' criteria as a temperature
54
55 elevation to 37.8°C and two or more of the following criteria: uterine tenderness,
56
57 malodorous vaginal discharge, fetal tachycardia (more than 160 beats per minute
58
59
60

1
2
3
4 (bpm)), maternal tachycardia (more than 100 bpm) and maternal leukocytosis >
5
6 15000/mm³ ¹³. Intra-amniotic infection was defined by the presence of a positive
7
8 amniotic fluid culture. Intra-amniotic inflammation was defined by the presence of high
9
10 levels of IL6 in amniotic fluid. Histological chorioamnionitis was defined as an
11
12 infiltration of the chorion and/or amnion by polymorph nuclear leucocytes¹⁴. Neonatal
13
14 composite morbidity included the presence of any of the following criteria:
15
16 intraventricular hemorrhage, respiratory distress syndrome, congenital sepsis and
17
18 periventricular leukomalacia by ultrasound suspicion. Puerperal endometritis was
19
20 considered in patients with a temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ on two occasions four hours apart
21
22 (excluding the day of delivery), associated with uterine tenderness, foul-smelling lochia,
23
24 and no other apparent source of infection¹³.
25
26
27
28
29

30
31 **Statistical analysis.** Receiver operator curve (ROC) analysis was employed to display
32
33 the relationship between sensitivity and false-positive rate (1-specificity) and to select
34
35 the best cutoff value for IL6 to diagnose intra-amniotic infection. Diagnostic indices
36
37 (sensitivity, specificity) and positive and negative predictive values (PPV and NPV,
38
39 respectively) to detect intra-amniotic infection were calculated for IL-6. Linear-by-
40
41 linear association and ANOVA with polynomial contrast analysis were used to evaluate
42
43 trends among the three study groups. Two-by-two contingency tables were constructed
44
45 and Chi-square or Fisher exact tests were used to identify significant differences among
46
47 test performances. Continuous data were compared with the Student t-test. Kaplan-
48
49 Meier probability plots were generated based on the duration from the amniocentesis-to-
50
51 delivery interval of the three groups. Differences between the survival function were
52
53 analyzed by the Log-rank test. Univariate and logistic regression analysis were
54
55 performed to investigate the relationship between the occurrence of the inflammatory
56
57
58
59
60

1
2
3
4 status and various explanatory variables. Sensitivity and positive predictive values of a
5
6 combination of gestational age at admission and cervical length to predict intra-amniotic
7
8 inflammation were calculated. A p-value of less than 0.05 was used to indicate
9
10 significance. The p values reported do not assume equality of variances. Statistical
11
12 analyses were performed with SPSS version 14.0 statistical software.
13
14
15
16
17

18 RESULTS

19
20 Over the study period, from 151 eligible patients with clinical symptoms of preterm
21
22 labor, a total of 93 patients were not under antibiotics at admission and signed informed
23
24 consent. Gestational ages at admission and at delivery of the 37 women not included
25
26 were comparable to the population of study.
27
28

29
30 Thirty-five patients (37.6%) were admitted before 28.0 weeks of gestation; 24 (25.8%)
31
32 between 28.0-<32.0 weeks; 21 (22.6%) between 32.1-<34.0 weeks and 13 (14%) \geq 34.0
33
34 weeks of gestation. Gestational age at admission, cervical length and gestational age at
35
36 delivery (mean, SD) of the entire study population were 29.4 (3.4) weeks, 15.7 (11.0)
37
38 mm, and 33.6 (5.4) weeks, respectively.
39
40
41

42 Receiver operator curve (ROC) analysis of IL6 to diagnose intra-amniotic infection,
43
44 showed an area under the curve of 0.86 (95% confidence interval: 0.77-0.92). The best
45
46 cutoff value to define the presence of intra-amniotic inflammation was IL6 \geq 13.4
47
48 ng/mL. However, in order to make our findings consistent with previously reported
49
50 cutoff (Romero et al¹¹) we changed our value to 11.3 ng/mL, which yielded similar
51
52 diagnostic performance. The sensitivity, specificity, PPV and NPV of high IL6 levels
53
54 (\geq 11.3 ng/mL) to diagnose intra-amniotic infection were 84.6%, 81.3%, 42.3% and
55
56
57
58
59 97%, respectively.
60

1
2
3
4
5 The overall rate of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor was 28%
6
7 (26/93) whereas proven intra-amniotic infection was detected in 14% of patients
8
9 (13/93). In all cases but two with positive amniotic fluid culture, IL6 concentrations
10
11 were ≥ 11.3 ng/ml: in one, the amniotic fluid was positive for *Proteus mirabilis* and
12
13 had an IL6 level of 1.4 ng/ml. The other had an infection for *Ureaplasma urealyticum*
14
15 and had an IL6 level of 4.3 ng/ml. In these two cases, gestational age at admission was
16
17 < 28 weeks and cervical length < 15 mm. The most common microorganism isolated
18
19 from the amniotic cavity of women with intra-amniotic infection was *Ureaplasma*
20
21 *urealyticum* (n=4). Others found included: *Candida albicans* (n=2), *Proteus mirabilis*
22
23 (n=1), *Fusobacterium spp* (n=1), *Streptococcus viridans* (n=1), *Staphylococcus*
24
25 *epidermidis* (n=1) and *Peptostreptococcus spp* (n=1), *Escherichia coli* (n=1),
26
27 *Bacteroides fragilis* (n=1).

28
29
30
31
32
33 Maternal characteristics are summarized in Table 1. Regardless of the results of the
34
35 microbial culture, gestational age at admission, and cervical length were significantly
36
37 lower among the group of women with intra-amniotic inflammation.

38
39
40 Perinatal outcomes are summarized in Table 2. Regardless of the intra-amniotic
41
42 microbial status, gestational age at delivery was significantly lower among the group of
43
44 women with intra-amniotic inflammation. In this group, a higher percentage of the
45
46 women delivered before 28 and 32 weeks of gestation and the amniocentesis-to-delivery
47
48 interval was shorter. Mean birth weight was significantly lower and days of admission
49
50 to the neonatal intensive care unit were significantly higher among pregnancies
51
52 complicated by intra-amniotic inflammation. Mortality and the neonatal composite
53
54 morbidity rates were significantly higher in neonates whose mothers developed intra-
55
56 amniotic inflammation versus those who did not.
57
58
59
60

1
2
3
4 Remarkably, maternal characteristics and perinatal outcomes were similar between the
5
6 intra-amniotic inflammation with negative amniotic fluid culture and the intra-amniotic
7
8 infection groups (Tables 1 and 2).
9

10
11 The survival function displayed in Figure 1 shows that the amniocentesis-to-delivery
12
13 interval was longer in the non-inflammatory (median, 95% CI: 31 (22.4-39.6) days)
14
15 compared to the inflammatory but negative culture group (4 (1.2-6.8) days). Indeed, in
16
17 the latter, the amniocentesis-to-delivery interval was similar to that of the intra-amniotic
18
19 infection group (3 (0-7.4) days) (Log Rank 23.4, $p < 0.001$).
20
21

22
23 The sensitivity, specificity, PPV and NPV of gestational age at admission < 28 weeks, $<$
24
25 32 weeks and cervical length < 15 mm and < 25 mm to predict intra-amniotic
26
27 inflammation are shown in Table 3. Logistic regression analysis (Table 4) showed that
28
29 gestational age at admission below 28 weeks and cervical length less than 15 mm were
30
31 independently associated with the occurrence of intra-amniotic inflammation (IL6
32
33 ≥ 11.3 ng/mL). However, only gestational age at admission < 28 weeks remained
34
35 significant (OR 7.3, 95%CI 2.5-21.2, $p < 0.001$) when 25 mm was used as a cutoff point
36
37 for cervical length (OR 3.0, 95%CI 0.7-12.3, $p = 0.133$). Sensitivity and positive
38
39 predictive values to predict intra-amniotic inflammation when gestational age at
40
41 admission and cervical length were combined are shown in Table 5.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

COMMENT

Our data report an overall rate of intra-amniotic inflammation and intra-amniotic infection in patients with preterm labor and intact membranes of 28% and 14%, respectively. They also show that women with pregnancy complicated with preterm labor and intact membranes in which an intra-amniotic inflammatory process is diagnosed have adverse outcomes similar to those with intra-amniotic microbial invasion and clearly worse than those without an inflammatory component, confirming previous studies.^{1, 2, 4} In addition, we show that the inflammatory process is particularly frequent in pregnancies complicated with preterm labor and intact membranes in early gestational ages and with short cervical length (PPV 63.6%), while it is rare above 32 weeks (PPV 11.8%).

The major finding of our study is that we have shown that cervical length and gestational age at admission are independently related to intra-amniotic inflammation. Although short cervical length has been associated with a higher risk of microbial invasion of the amniotic cavity⁷⁻⁹, the performance of the cervical length to predict intra-amniotic inflammation rather than infection has only been tested in one study.⁹ Furthermore, it has already been reported that the earlier the gestational age, the higher the risk of intra-amniotic inflammation.² However, no particular gestational age above which an invasive procedure may not be worthwhile has been established. As we have shown that a short cervical length is independently associated with intra-amniotic inflammation, this data can also be used in combination with gestational age at admission as a non-invasive approach for the evaluation of the risk of an underlying inflammatory process. As gestational age < 28 weeks presents a better false positive rate compared with cervical length < 15 mm (25.4% vs 35.9%, respectively), it seems

1
2
3
4 reasonable to use gestational age as a first step in order to avoid unnecessary
5
6 procedures.
7

8
9 In the clinical setting, a prudent cutoff for gestational age and cervical length should be
10
11 considered taking into account that the diagnosis of intra-amniotic inflammation
12
13 requires the use of an invasive procedure and that the overall risk of intra-amniotic
14
15 inflammation in preterm labor with intact membranes is, in fact, quite low (10-30%)^{2, 10,}

16
17
18 ¹⁵ The fact that the combination of both parameters may discriminate the risk of intra-
19
20 amniotic inflammation is, therefore, of clinical relevance. Sensitivity and positive
21
22 predictive values shown in Table 5 may help to choose the assumable risk in a specific
23
24 setting, reserving the need for amniocentesis to the highest risk group.
25
26

27
28 The rates of intra-amniotic inflammation and infection in our study are similar to those
29
30 reported by other authors.^{2, 5, 6, 10, 15} In addition, the sensitivity, specificity, PPV and
31
32 NPV of IL6 to diagnose intra-amniotic infection in the present study were 84.6%,
33
34 81.3%, 42.3% and 97%, respectively, being consistent with those reported in the
35
36 literature with sensitivities and specificities ranging from 80.9-100% and 75-82.5%
37
38 depending on the group of risk.^{2, 10, 11}
39
40

41
42 One of the main interests of our results is that few studies have specifically evaluated
43
44 the effect of markers of intra-amniotic inflammation such as IL6^{2, 3, 5, 6, 10, 11} Indeed,
45
46 only three reports indicated specifically that women with high IL6 levels but a negative
47
48 amniotic culture had a similar adverse outcome to those with a positive amniotic
49
50 culture.^{2, 3, 5} IL6 determination is already a standardized technique and is easily
51
52 available for clinical use in most laboratories. This is in contrast with other markers of
53
54 inflammation such as proteomic determinations which need much more sophisticated
55
56 facilities. Determination of MMP-8 for the same purpose may also play a role.^{4, 12}
57
58
59
60

1
2
3
4 The weakness of our study lies in the relatively small sample size and the non
5 consecutive recruitment of patients. At the time of the study, amniocentesis was not
6
7 routinely included in the clinical management of patients with preterm labor and intact
8
9 membranes in our institution and thus, some patients were not studied, leading to a
10
11 potential bias. In fact, cervical length and gestational age at admission and gestational
12
13 age at delivery show, in our study, a population at high risk for preterm delivery in
14
15 which an intra-amniotic inflammatory process may be somewhat overestimated.
16
17 However, Romero et al.¹¹, and Yoon et al.² reported similar rates of infection and
18
19 inflammation. Nonetheless, our study differs from previous reports in that we performed
20
21 amniocentesis to study the microbiological status of the amniotic cavity in patients
22
23 without any suspicion of infection, while most authors, have studied a mixed population
24
25 including women with chorioamnionitis,^{16, 17} or women with a diagnosis of cervical
26
27 insufficiency.⁴

28
29 The identification of intra-amniotic inflammation rather than bacterial infection may be
30
31 clinically more important because inflammation occurs in an earlier stage of microbial
32
33 invasion¹. The elevation of IL6 levels in amniotic fluid even with a negative culture
34
35 may identify patients in whom there is intrauterine infection, although such a process is
36
37 extra-amniotic in nature. In this subgroup of patients, early treatment with antibiotics
38
39 and/or anti-inflammatory agents may prevent or postpone preterm delivery and improve
40
41 neonatal complications. However, an effective therapy to treat this situation is not yet
42
43 available making amniocentesis as a universal approach, controversial. Most clinical
44
45 guidelines for the management of preterm labor with intact membranes do not include
46
47 the amniocentesis to identify an inflammatory or infectious underlying process. Above
48
49 32 weeks, the finding of intra-amniotic inflammation is relatively low (11.8%) and
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 would be controversial to justify this procedure, while more than half (51.4%) of the
5
6 patients below 28 weeks at admission could have an inflammatory component This is
7
8 consistent with Yoon et al.² suggesting that the inflammatory pathway may explain
9
10 preterm labor, particularly in early gestational ages. Stratification of the risk of intra-
11
12 amniotic inflammation based on non-invasive markers, such as cervical length or
13
14 gestational age at admission, could select the group of highest risk in which
15
16 amniocentesis would be recommended to identify the inflammatory status of amniotic
17
18 cavity.
19
20
21
22

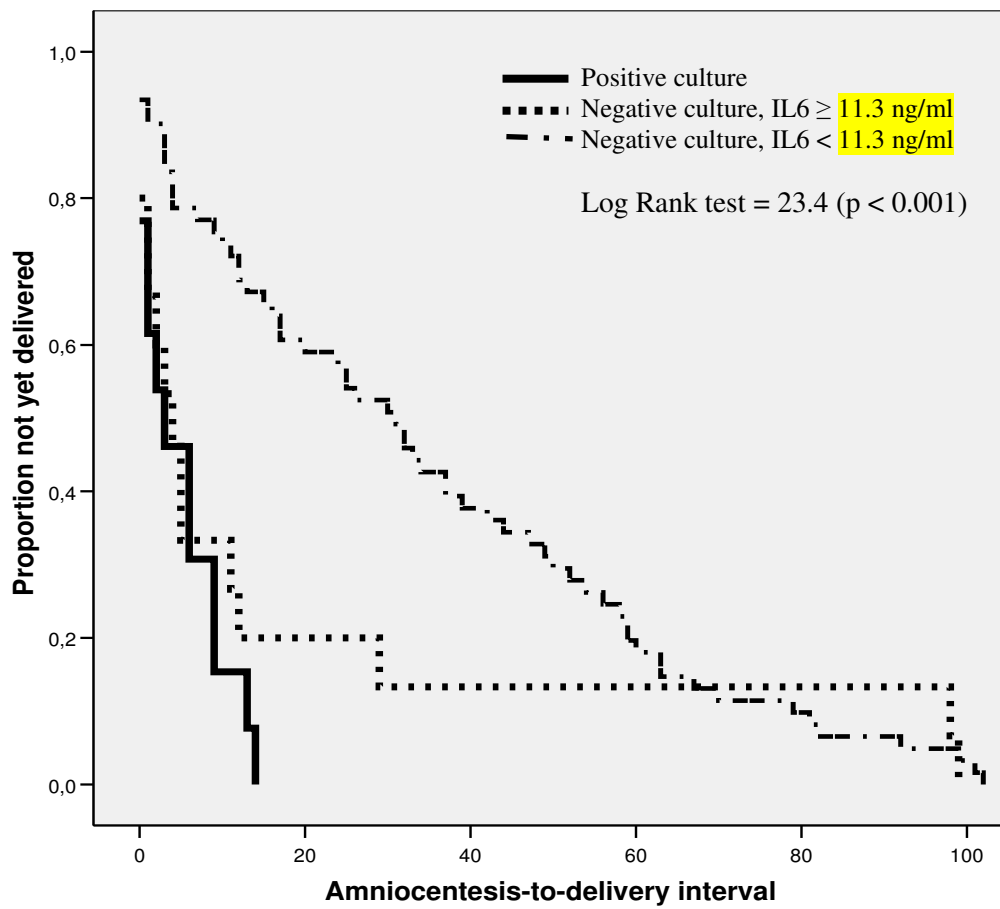
23 Whether this inflammation can be treated or not to improve perinatal outcomes remains
24
25 unknown. Treatment with antibiotics for preterm labor has failed to demonstrate an
26
27 improvement in outcomes^{18, 19} but this may be due to the fact that the target population
28
29 was not adequately selected and that most women who received treatment probably did
30
31 not have an underlying inflammatory mechanism. Whether this approach may be useful
32
33 in women presenting with early preterm labor and short cervix is unknown. Further
34
35 clinical trials are necessary to answer this hypothesis.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007; **25**: 21-39.
2. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, Jun JK. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **185**: 1130-6.
3. Figueroa R, Garry D, Elimian A, Patel K, Sehgal PB, Tejani N. Evaluation of amniotic fluid cytokines in preterm labor and intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; **18**: 241-7.
4. Lee SE, Romero R, Park CW, Jun JK, Yoon BH. The frequency and significance of intraamniotic inflammation in patients with cervical insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 2008; **198**: 633 e1-8.
5. Greci LS, Gilson GJ, Nevils B, Izquierdo LA, Qualls CR, Curet LB. Is amniotic fluid analysis the key to preterm labor? A model using interleukin-6 for predicting rapid delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998; **179**: 172-8.
6. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* 1993; **81**: 941-8.
7. Gomez R, Romero R, Nien JK, Chaiworapongsa T, Medina L, Kim YM, Yoon BH, Carstens M, Espinoza J, Iams JD, Gonzalez R. A short cervix in women with preterm labor and intact membranes: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**: 678-89.
8. Hassan S, Romero R, Hendler I, Gomez R, Khalek N, Espinoza J, Nien JK, Berry SM, Bujold E, Camacho N, Sorokin Y. A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. *J Perinat Med* 2006; **34**: 13-9.
9. Holst RM, Jacobsson B, Hagberg H, Wennerholm UB. Cervical length in women in preterm labor with intact membranes: relationship to intra-amniotic inflammation/microbial invasion, cervical inflammation and preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; **28**: 768-74.
10. Coultrip LL, Lien JM, Gomez R, Kapernick P, Khoury A, Grossman JH. The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1994; **171**: 901-11.
11. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Diamond MP, Kenney JS, Ramirez M, Fidel PL, Sorokin Y, Cotton D, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993; **169**: 805-16.
12. Angus SR, Segel SY, Hsu CD, Locksmith GJ, Clark P, Sammel MD, Macones GA, Strauss JF, 3rd, Parry S. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **185**: 1232-8.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
13. Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, Castaneda YS. Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 1982; **145**: 1-8.
14. Naeye RL. Functionally important disorders of the placenta, umbilical cord, and fetal membranes. *Hum Pathol* 1987; **18**: 680-91.
15. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, Sabo V, Athanassiadis AP, Hobbins JC. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989; **161**: 817-24.
16. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000; **47**: 185-96.
17. Lau J, Magee F, Qiu Z, Hoube J, Von Dadelszen P, Lee SK. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **193**: 708-13.
18. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W. Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet* 2001; **357**: 989-94.
19. Ovalle A, Romero R, Gomez R, Martinez MA, Nien JK, Ferrand P, Aspillaga C, Figueroa J. Antibiotic administration to patients with preterm labor and intact membranes: is there a beneficial effect in patients with endocervical inflammation? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; **19**: 453-64.

Figure 1. Kaplan-Meier survival function showing the amniocentesis-to-delivery interval in the study groups



4.2. RESULTADOS GLOBALES

En el primer estudio, el porcentaje global de infección intraamniótica de nuestra población con amenaza de parto prematuro fue del 13.9% (12/86).

Construimos una curva ROC con el objetivo de conocer el mejor punto de corte de IL6 para diagnosticar infección intraamniótica, que resultó ser 13.4 ng/mL (área bajo la curva 0.869, 95% IC: 0.78-0.93). La prevalencia de inflamación intraamniótica acorde a este punto de corte fue del 30.4% (25/82).

Se detectaron biomarcadores proteómicos (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) mediante la técnica SDS-PAGE y confirmados por Western Blot en el 18.6% (16/86) de las mujeres.

El análisis de regresión logística que investigaba la relación entre biomarcadores proteómicos e IL6 y la presencia de infección intraamniótica demostró que los marcadores proteómicos (Odds Ratio (OR) 25.2, $p=0.001$) y la IL6 (OR 19.5, $p=0.012$) eran factores de riesgo independientes de infección intraamniótica.

Sin embargo, cuando se investigó la relación de estos marcadores inflamatorios con otros acontecimientos adversos, únicamente la IL6 demostró ser un factor de riesgo tanto de parto pretérmino (OR 8.2, $p=0.009$) como de mal resultado neonatal (OR 4.4, $p=0.014$).

El algoritmo diagnóstico que se construyó con el objetivo de describir la relación entre la presencia de IL6 y determinados biomarcadores proteómicos y la infección intraamniótica demostró que la integración de IL6 y del perfil proteómico en un mismo modelo combinado mejoraba la tasa de detección (75%) de infección

intraamniótica con un menor porcentaje de falsos positivos (4%) y un incremento del valor predictivo positivo (75%) para predecir infección.

La edad gestacional al ingreso, al parto, el lapso de tiempo al parto, la media de peso al nacer, el número de días ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), la morbilidad neonatal grave y las tasas de mortalidad fueron significativamente peores en el grupo de mujeres con presencia de biomarcadores proteómicos en líquido amniótico.

En el segundo estudio, con un mayor número de pacientes, el porcentaje de inflamación intraamniótica fue del 28% (26/93), mientras que la infección intraamniótica se detectó en el 14% de las pacientes (13/93).

En este segundo estudio, aunque el punto de corte de IL6 óptimo para diagnosticar infección intraamniótica fue igualmente de 13.4 ng/ml, se decidió definir inflamación intraamniótica por la presencia de niveles de IL6 \geq 11.3 ng/ml, en consonancia con lo publicado previamente por el grupo de Romero [58]. El cambio en el punto de corte no suponía una modificación de los resultados de nuestro segundo estudio, por lo que decidimos aplicar el punto de corte de la literatura siguiendo las sugerencias de los revisores.

En todas las pacientes con cultivos positivos, a excepción de dos casos, las concentraciones de IL6 fueron \geq 11.3 ng/ml. En estos dos casos, la edad gestacional al ingreso fue inferior a 28 semanas y la longitud cervical inferior a 15 mm.

En nuestros estudios, el germen más comúnmente aislado de la cavidad amniótica fue el *Ureaplasma urealyticum* (n=4). Otros

gérmenes aislados en menor frecuencia fueron: *Candida albicans* (n=2), *Proteus mirabilis* (n=1), *Fusobacterium spp* (n=1), *Streptococcus viridans* (n=1), *Staphylococcus epidermidis* (n=1), *Peptostreptococcus spp* (n=1), *Escherichia coli* (n=1) y *Bacteroides spp* (n=1).

La edad gestacional al ingreso, al parto y la longitud cervical fueron significativamente menores en el grupo con inflamación intraamniótica. En este grupo, el porcentaje de parto antes de las 28 y de las 32 semanas fue superior y el intervalo de tiempo desde la amniocentesis al parto fue más corto. La media de peso neonatal al nacer fue significativamente menor y el número de días de ingreso en la Unidad de Cuidados Neonatales fue significativamente mayor. La mortalidad y la morbilidad neonatal fueron también significativamente superiores.

Los resultados perinatales en el grupo con inflamación intraamniótica y cultivos negativos fueron similares a los del grupo con infección intraamniótica.

El análisis estadístico mediante regresión logística demostró que la edad gestacional al ingreso inferior a 28 semanas (OR 6.2 (IC 95% 2.1-18.7, p=0.001) y la longitud cervical inferior a 15 mm (OR 4.6 (IC 95% 1.5-14.6, p=0.009) eran marcadores independientes de inflamación intraamniótica.

Sin embargo, sólo la edad gestacional inferior a 28 semanas resultó ser factor independiente (OR 7.3 (IC 95% 2.5-21.2, p < 0.001) cuando 25 mm fue utilizado como punto de corte de longitud cervical (OR 3.0, (IC 95% 0.7-12.3, p = 0.133).

Creamos un algoritmo pronóstico del riesgo de inflamación intraamniótica en función de la edad gestacional y la longitud cervical. La tasa de detección de inflamación intraamniótica considerando únicamente el factor edad gestacional por debajo de 32 semanas fue del 84.6% (22/26). La sensibilidad, en edades gestacionales por debajo de las 28.0 semanas y entre las 28.0 y 32.0 semanas con cérvix inferior a 15 mm, fue del 84% (21/25).

Acorde a nuestros resultados, si únicamente hubiéramos realizado una amniocentesis diagnóstica a las pacientes con amenaza de parto pretérmino que debutan antes de las 28 semanas y aquellas entre las 28.0 y las 32.0 semanas que presentan un cérvix inferior a 15 mm, habríamos evitado un 59.1% (55/93) de los procedimientos invasivos asumiendo una tasa de falsos negativos (es decir de pacientes con inflamación que no habrían sido diagnosticadas) del 16% (4/25). Dado que en la actualidad no existe un tratamiento médico que cambie el curso de la infección, la aceptación de un determinado número de falsos negativos nos parecía razonable para evitar la morbilidad, que aunque escasa, se deriva de un procedimiento invasivo.

5 DISCUSIÓN GENERAL

La infección intraamniótica es considerada la causa conocida más frecuente de prematuridad, responsable de un 10-12 % de los casos de amenaza de parto pretérmino con bolsa íntegra [14]. Sin embargo, requiere para su diagnóstico del análisis del líquido amniótico y, por tanto, de la realización de una prueba invasiva.

Por otra parte, la inflamación intraamniótica es considerada el mejor predictor de infección, responsable de un 10-30% [14, 35] de los casos de amenaza de parto pretérmino.

Se ha demostrado que los resultados perinatales de la inflamación intraamniótica en relación a la prematuridad y la morbilidad neonatal son equiparables a los de la infección intraamniótica [35, 49].

El diagnóstico de la corioamnionitis clínica supone la finalización de la gestación bajo cobertura antibiótica de amplio espectro. Sin embargo, la ventaja del diagnóstico de inflamación intraamniótica es que representa una etapa precoz de la invasión microbiana, por lo que su detección permitiría hipotéticamente iniciar un tratamiento antibiótico dirigido en una etapa temprana de la infección. Es por ello que la investigación actual se centra en la búsqueda de marcadores de inflamación intraamniótica.

Como marcadores de inflamación intraamniótica, el más estudiado y más sensible es la IL6 en líquido amniótico. Su principal inconveniente es su tasa de falsos positivos, del 17-34% [58], que limita su aplicabilidad clínica ya que puede derivar en la finalización de gestaciones no infectadas en edades gestacionales muy tempranas. Más novedosa es la determinación de proteínas inflamatorias, entre las que destacan las *Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1, 2*, que se engloban en lo que se conoce como perfil proteómico y que han

demostrado ser marcadores sensibles de infección con tasas de detección similares a las de la IL6, del 80-100%, pero con menor tasa de falsos positivos [58, 76].

Sin embargo, no existen estudios en la literatura que demuestren si la IL6 y el perfil proteómico son factores independientes de infección intraamniótica, parto pretérmino y morbilidad neonatal. Tampoco existen estudios que demuestren si su combinación mejora la detección y predicción de infección intraamniótica, parto prematuro y morbilidad neonatal, reduciendo la tasa de falsos positivos respecto la utilización de cada uno de forma aislada.

La principal contribución de nuestro **primer estudio** es la identificación de la infección intraamniótica en una etapa precoz mediante la determinación de marcadores inflamatorios como la IL6 y/o el perfil proteómico en el líquido amniótico así como la propuesta de un algoritmo diagnóstico predictor de infección intraamniótica que incluya ambos marcadores inflamatorios.

En el primer estudio, demostramos que la prevalencia de infección e inflamación intraamnióticas en pacientes con amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras en nuestro medio es similar a la reportada por la literatura [14, 35], del 13.9% para infección y del 30.4% para inflamación intraamniótica.

Demostramos que la presencia de cualquiera de las proteínas inflamatorias (*Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1, 2*) detectadas en líquido amniótico se asocia de forma estadísticamente significativa a un mayor riesgo de infección intraamniótica, de parto pretérmino por debajo de las 28.0, 32.0 y 37.0 semanas de gestación y a un mayor

riesgo de morbilidad neonatal, confirmando que su presencia en el líquido amniótico se asocia a peores resultados perinatales [52, 78].

Nuestros resultados ratifican lo reportado previamente respecto al valor del perfil proteómico como marcador inflamatorio de infección intraamniótica [76, 77]. Demostramos que las tasas de sensibilidad y valor predictivo negativo de la IL6 y del perfil proteómico para predecir infección intraamniótica son similares. Sin embargo, el perfil proteómico parece ser más específico (91.9% versus 80%), con una menor tasa de falsos positivos (8.1% versus 20%), y un mejor valor predictivo positivo (62.5% versus 44%) que la IL6. De nuestros resultados puede deducirse que el perfil proteómico presenta un mejor balance en la predicción de infección intraamniótica que la IL6. Una posible explicación fisiológica es que la IL6 puede hallarse elevada en otras circunstancias no infecciosas como la dilatación avanzada ya sea a término o pretérmino, hecho que aumenta el porcentaje de falsos positivos y reduce el valor predictivo positivo de dicho marcador.

Demostramos mediante regresión logística que tanto la IL6 (OR 25.2 (IC 95% 3.7-169.5, p=0.001) como las *Calgranulins A, C* y *Neutrophil defensins 1, 2* (OR 19.5 (IC 95% 1.9-198.8, p=0.012) son, de forma estadísticamente significativa, marcadores independientes de infección intraamniótica.

Lo novedoso de nuestro estudio es la propuesta de un modelo diagnóstico combinado que integra la IL6 y el perfil proteómico con lo que, de forma significativa, mejora la detección de infección intraamniótica (75%), con un porcentaje menor de falsos positivos (4%) y un mayor valor predictivo positivo (75%) cuando ambos marcadores están presentes. Nuestros resultados sugieren la utilización de un

único test diagnóstico que combine ambos marcadores inflamatorios para predecir eficazmente de forma rápida qué gestantes presentan una infección intraamniótica como causa etiológica de la amenaza de parto pretérmino.

Sin embargo, nuestros resultados no reproducen la sensibilidad cercana al 100% del perfil proteómico para predecir el parto pretérmino, como reportó Buhimschi et al [76], ya que la tasa de detección de parto pretérmino antes de las 37 semanas en nuestros pacientes es sólo del 30%. Las diferencias observadas podrían deberse a que el perfil de nuestra población de estudio difiere sustancialmente del grupo de Buhimschi et al [76] ya que estos también incluían pacientes con rotura prematura de membranas, grupo de mayor riesgo de infección intraamniótica y de parto pretérmino.

Los valores predictivos de la IL6 y del perfil proteómico para detectar parto pretérmino antes de las 37 semanas son similares. Sin embargo, integrados en una regresión logística, únicamente la IL6 demuestra ser factor independiente de parto pretérmino (OR 8.2 (IC 95% 1.6-40.2, $p=0.009$). La combinación de ambos marcadores, IL6 y perfil proteómico, no mejora la predicción de prematuridad en el subgrupo de amenaza parto pretérmino. De igual forma, aunque nuestros resultados demuestran que el perfil proteómico se asocia a peores resultados neonatales, integrado en una regresión logística no es un factor independiente para predecir morbilidad neonatal. Sólo la IL6 demuestra ser factor independiente de morbilidad neonatal (OR 4.4 (IC 95% 1.3-14.8, $p=0.01$). Una explicación posible podría ser el número limitado de pacientes con infección intraamniótica en nuestro estudio o al hecho que aquellas mujeres con cultivos de líquido amniótico positivos fueron tratadas con antibióticos. Dicha intervención

terapéutica podría haber cambiado la historia natural de la infección y mejorar los resultados neonatales, independientemente de la presencia de proteínas inflamatorias en el líquido amniótico. Si la actitud terapéutica retrasó la progresión de la infección y cambió la morbilidad neonatal, resulta incierto y no puede ser evaluado en el diseño de nuestro estudio.

Por último, demostramos que ni las *Calgranulins A, C* ni las *Neutrophil defensins 1, 2* se detectan en muestras maternas sanguíneas, a diferencia de otras proteínas inflamatorias como las *IGFBP1* o las *Calgranulins B* [77].

Como limitaciones a nuestro primer estudio, destacar que el número de pacientes con ambos marcadores, IL6 y perfil proteómico, detectados en líquido amniótico fue pequeño (n=12). Aunque nuestros resultados sugieren que la integración de ambos marcadores mejora la predicción de infección intraamniótica, consideramos que son necesarios estudios prospectivos y con mayor número de casos para confirmar estos hallazgos.

Existen pocos estudios que específicamente evalúen el efecto perinatal de marcadores de inflamación intraamniótica, como la IL6. Nuestro **segundo estudio** ratifica lo reportado por la escasa literatura [35] demostrando que aquellas pacientes con niveles altos de IL6 y cultivos de líquido amniótico negativos, presentan resultados neonatales y en relación a la prematuridad similares a las pacientes con cultivos positivos. Nuestros resultados refuerzan la importancia de diagnosticar la infección intraamniótica a través de marcadores inflamatorios de resultado más precoz que el microbiológico ya que el

pronóstico en relación a prematuridad y mal resultado neonatal de la inflamación es equiparable al de la infección intraamniótica.

Además, el segundo estudio pretende identificar el grupo de mayor riesgo de inflamación intraamniótica subclínica mediante herramientas diagnósticas no invasivas. Como marcadores no invasivos de inflamación proponemos la edad gestacional en el debut clínico y la longitud cervical ecográfica.

El mayor hallazgo de este estudio es que demuestra que tanto la edad gestacional al ingreso como la longitud cervical ecográfica son marcadores independientes de inflamación intraamniótica subclínica y pueden, por lo tanto, utilizarse de manera combinada para seleccionar la población de riesgo infeccioso.

Aunque previamente había sido publicado que a menor edad gestacional y a menor longitud cervical, mayor el riesgo de infección intraamniótica [35] [37, 84], no existía un punto de corte definido en la literatura ni de edad gestacional ni de longitud cervical asociado a un mayor riesgo de inflamación intraamniótica en el grupo de amenaza de parto pretérmino. Dado que la prevalencia de la inflamación intraamniótica en la amenaza de parto pretérmino es globalmente baja, del 10-30% [14, 35], parece razonable utilizar puntos de corte para seleccionar el subgrupo con mayor riesgo.

Nuestros resultados demuestran que tanto la edad gestacional por debajo de 28 semanas (OR 6.2 (IC 95% 2.1-18.7, $p=0.001$), por debajo de 32 semanas (OR 5.2 (IC 95% 1.3-20.0, $p=0.017$) como la longitud cervical inferior a 15 mm (OR 4.6 (IC 95% 1.5-14.6, $p=0.009$) son marcadores independientes de inflamación intraamniótica. Sin embargo ni la edad gestacional por debajo de 34 semanas ni una longitud

cervical inferior a 25 mm demostraron ser marcadores independientes de inflamación.

El debut clínico de la amenaza de parto pretérmino por debajo de 28 semanas presenta un menor porcentaje de falsos positivos que la longitud cervical ecográfica inferior a 15 mm (25.4% versus 35.9%, respectivamente). De ahí que propongamos como más razonable el utilizar la edad gestacional como primer escalón diagnóstico para seleccionar de forma eficiente la población de mayor riesgo inflamatorio.

Según nuestros resultados, la tasa de detección de inflamación intraamniótica considerando únicamente el factor edad gestacional por debajo de 32 semanas fue del 84.6% (22/26). Cuando incluimos aquellas pacientes cuyo debut clínico se produjo por debajo de las 28 semanas independientemente de la longitud cervical y aquellas pacientes que debutaron entre las 28.0-32.0 semanas y que tenían una longitud cervical inferior a 15 mm, la tasa de detección de inflamación intraamniótica fue del 84% (21/25) y el valor predictivo positivo del 48.8% (21/43).

El algoritmo que proponemos en el segundo estudio podría ayudarnos a seleccionar el grupo de riesgo que se beneficiaría de la necesidad de una amniocentesis para un diagnóstico definitivo de infección / inflamación intraamnióticas.

Las limitaciones principales de nuestro segundo estudio son principalmente el número de pacientes y que no todas las pacientes elegibles fueron incluidas en el estudio ya que, por no ser una herramienta diagnóstica asistencial en el momento del estudio, la amniocentesis no se realizó en todas las pacientes con amenaza de

parto pretérmino. Sin embargo, según nuestro conocimiento, nuestro trabajo es el segundo estudio en cuanto a número de pacientes reclutadas con estas mismas características clínicas, seguido del trabajo de Yoon *et al* [35]. Además, nuestros resultados son consistentes con los reportados por estos [35] y sugieren que la vía inflamatoria podría ser una causa muy prevalente de parto pretérmino en edades gestacionales tempranas.

En el manejo clínico puede resultar más importante la identificación de inflamación intraamniótica que la de infección, ya que la primera precede a la segunda. La elevación de IL6 en líquido amniótico, incluso en ausencia de cultivos positivos puede identificar pacientes en las que hay una infección intrauterina aunque el proceso sea extraamniótico. Acorde a nuestros resultados, más allá de las 32 semanas, el hallazgo de inflamación intraamniótica es relativamente bajo (11.8%, 4/34) y por lo tanto, es posible que en estas pacientes no esté justificado la realización de una amniocentesis. Sin embargo, más de la mitad (51.4%, 18/35) de las pacientes que debutan antes de las 28 semanas presentan, como causa de la amenaza de parto prematuro, un estado inflamatorio.

Si la inflamación puede ser o no tratada con el objetivo de mejorar los resultados perinatales es un interrogante aún no resuelto. El tratamiento indiscriminado con antibióticos en la amenaza de parto pretérmino con bolsa íntegra, no ha demostrado mejorar los resultados perinatales ni retrasar el intervalo de tiempo al parto, pero una posible explicación podría ser que la población seleccionada no es la adecuada.

La mejoría de los resultados perinatales a través del tratamiento precoz antibiótico / antiinflamatorio en el subgrupo con mayor probabilidad de presentar una inflamación intraamniótica es una hipótesis no contestada aún en la literatura y que necesitará de ensayos clínicos prospectivos para ser demostrada. Los hallazgos descritos en la presente Tesis Doctoral permiten centrar los futuros ensayos clínicos en un subgrupo de población más adecuado.

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral conducen a las conclusiones que se exponen a continuación:

1. El diagnóstico de inflamación intraamniótica, definido por la presencia de *Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2* en el líquido amniótico, se asocia a un mayor riesgo de infección intraamniótica, parto pretérmino y morbilidad neonatal en el grupo de amenaza de parto pretérmino con bolsa íntegra.
2. Los valores predictivos de la IL6 para infección intraamniótica, parto pretérmino < 37 semanas y morbilidad neonatal se resumen en la siguiente tabla:

	S	E	VPP	VPN
<i>Infección intraamniótica</i>	91.6%	80%	44%	98.3%
<i>Parto < 37 semanas</i>	46%	93.8%	92%	52.6%
<i>Morbilidad Neonatal</i>	19.7%	38.1%	48%	14.03%

3. Los valores predictivos del perfil proteómico para infección intraamniótica, parto pretérmino < 37 semanas y morbilidad neonatal se resumen en la siguiente tabla:

	S	E	VPP	VPN
<i>Infección intraamniótica</i>	83.3%	91.9%	62.5%	97.1%
<i>Parto < 37 semanas</i>	30%	96.9%	93.8%	47%
<i>Morbilidad Neonatal</i>	40.9%	89.1%	56.2%	81.4%

4. La IL6 en líquido amniótico ha demostrado ser marcador independiente de infección intraamniótica, de parto pretérmino antes de las 37 semanas y de morbilidad neonatal. La presencia de determinadas proteínas inflamatorias (*Calgranulins A, C, Neutrophil defensins 1, 2*) en líquido amniótico han demostrado ser marcadores independientes de infección intraamniótica. Sin embargo no son factores de riesgo independientes de parto prematuro antes de las 37 semanas ni de morbilidad neonatal.
5. La combinación de ambos marcadores inflamatorios, IL6 y determinadas proteínas inflamatorias (*Calgranulins A, C y Neutrophil defensins 1, 2*), en un único test diagnóstico mejora de forma significativa la sensibilidad (75%) y el valor predictivo positivo (75%) de la infección intraamniótica con un menor porcentaje de falsos positivos (4.3%) que la utilización de cada marcador de forma aislada.
6. El diagnóstico de inflamación intraamniótica, definido por la presencia de niveles altos de IL6 en el líquido amniótico, se asocia a un mayor riesgo de infección intraamniótica, parto pretérmino y morbilidad neonatal en el grupo de amenaza de parto pretérmino con bolsa íntegra.
7. Un debut clínico antes de la semana 28.0 ha demostrado ser un factor de riesgo independiente de inflamación intraamniótica.
8. Los valores predictivos para una edad gestacional en el debut clínico inferior a 28 semanas e inferior a 32 semanas para predecir inflamación intraamniótica se resumen en la siguiente tabla:

<i>Edad gestacional</i>	S	E	VPP	VPN
< 28 semanas	69.2%	74.6%	51.4%	86.2%
< 32 semanas	84.6%	44.8%	37.3%	88.2%

9. Una longitud cervical ecográfica al ingreso inferior a 15 mm ha demostrado ser un factor de riesgo independiente de inflamación intraamniótica.

10. Los valores predictivos para una longitud cervical al ingreso inferior a 15 mm e inferior a 25 mm para predecir inflamación intraamniótica se resumen en la siguiente tabla:

<i>Longitud cervical</i>	S	E	VPP	VPN
< 15 mm	76%	64.1%	45.2%	87.2%
< 25 mm	88%	32.8%	33.8%	87.5%

11. La edad gestacional en el debut clínico y la longitud cervical ecográfica han demostrado ser marcadores independientes de inflamación intraamniótica.

12. Un debut clínico antes de la semana 28.0 independientemente de la longitud cervical, y un debut clínico entre la semana 28.0-32.0 con un cérvix inferior a 15 mm se asocia a una tasa de detección de inflamación intraamniótica del 84% y un valor predictivo positivo del 48.8%.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Goldenberg, R.L., et al., Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 2008. 371(9606): p. 75-84.
2. Spong, C.Y., Preterm birth: an enigma and a priority. *Obstet Gynecol*, 2009. 113(4): p. 770-1.
3. Romero, R., et al., The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 734: p. 414-29.
4. Klein, L.L. and R.S. Gibbs, Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 190(6): p. 1493-502.
5. Romero, R., et al., Meta-analysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. *Obstet Gynecol*, 1989. 73(4): p. 576-82.
6. Goncalves, L.F., T. Chaiworapongsa, and R. Romero, Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002. 8(1): p. 3-13.
7. Pararas, M.V., C.L. Skevaki, and D.A. Kafetzis, Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006. 25(9): p. 562-9.
8. McDonald, H.M., et al., Impact of metronidazole therapy on preterm birth in women with bacterial vaginosis flora (*Gardnerella vaginalis*): a randomised, placebo controlled trial. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997. 104(12): p. 1391-7.
9. Kekki, M., et al., Vaginal clindamycin in preventing preterm birth and peripartal infections in asymptomatic women with bacterial

vaginosis: a randomized, controlled trial. *Obstet Gynecol*, 2001. 97(5 Pt 1): p. 643-8.

10. Ugwumadu, A., et al., Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2003. 361(9362): p. 983-8.

11. McDonald, H.M., P. Brocklehurst, and A. Gordon, Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(1): p. CD000262.

12. Iams, J.D., et al., Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet*, 2008. 371(9607): p. 164-75.

13. Goldenberg, R.L., J.C. Hauth, and W.W. Andrews, Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*, 2000. 342(20): p. 1500-7.

14. Romero, R., et al., The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med*, 2007. 25(1): p. 21-39.

15. Lau, J., et al., Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 193(3 Pt 1): p. 708-13.

16. Lahra, M.M. and H.E. Jeffery, A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 190(1): p. 147-51.

17. Blumenthal, I., Periventricular leucomalacia: a review. *Eur J Pediatr*, 2004. 163(8): p. 435-42.
18. Cornette, L., Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2004. 9(6): p. 459-70.
19. Dammann, O. and A. Leviton, Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol*, 1998. 5(3): p. 190-201.
20. Dammann, O. and A. Leviton, Role of the fetus in perinatal infection and neonatal brain damage. *Curr Opin Pediatr*, 2000. 12(2): p. 99-104.
21. Gomez, R., et al., The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 179(1): p. 194-202.
22. Jobe, A.H., Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol*, 2003. 8(1): p. 9-17.
23. Papile, L.A., G. Munsick-Bruno, and A. Schaefer, Relationship of cerebral intraventricular hemorrhage and early childhood neurologic handicaps. *J Pediatr*, 1983. 103(2): p. 273-7.
24. Wu, Y.W. and J.M. Colford, Jr., Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *Jama*, 2000. 284(11): p. 1417-24.
25. Carroll, S.G., et al., Maternal assessment in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabor amniorrhexis. *Fetal Diagn Ther*, 1995. 10(5): p. 290-6.

26. Versland, L.B., K. Sommerfelt, and I. Elgen, Maternal signs of chorioamnionitis: persistent cognitive impairment in low-birthweight children. *Acta Paediatr*, 2006. 95(2): p. 231-5.
27. Rouse, D.J., et al., The Maternal-Fetal Medicine Units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration-relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 191(1): p. 211-6.
28. Garland, S.M., et al., Mechanisms, organisms and markers of infection in pregnancy. *J Reprod Immunol*, 2002. 57(1-2): p. 169-83.
29. Gibbs, R.S., et al., Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis*, 1982. 145(1): p. 1-8.
30. Romero, R., et al., Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1989. 161(3): p. 817-24.
31. Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. *Jama*, 1976. 236(13): p. 1471-6.
32. Galle, P.C. and P.J. Meis, Complications of amniocentesis: a review. *J Reprod Med*, 1982. 27(3): p. 149-55.
33. Stark, C.M., et al., Need for urgent delivery after third-trimester amniocentesis. *Obstet Gynecol*, 2000. 95(1): p. 48-50.
34. Gordon, M.C., et al., Complications of third-trimester amniocentesis using continuous ultrasound guidance. *Obstet Gynecol*, 2002. 99(2): p. 255-9.

35. Yoon, B.H., et al., Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(5): p. 1130-6.

36. Romero, R., et al., Infection and labor. VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: prevalence and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. 167(4 Pt 1): p. 1086-91.

37. Hassan, S., et al., A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. *J Perinat Med*, 2006. 34(1): p. 13-9.

38. Mazor, M., et al., Intraamniotic infection in patients with preterm labor and twin pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1996. 75(7): p. 624-7.

39. Watts, D.H., et al., The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obstet Gynecol*, 1992. 79(3): p. 351-7.

40. Andrews, W.W., et al., Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. 173(2): p. 606-12.

41. Romero, R. and M. Mazor, Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol*, 1988. 31(3): p. 553-84.

42. Yoon, B.H., et al., Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. 183(5): p. 1130-7.

43. Bone, R.C., Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *Jama*, 1992. 268(24): p. 3452-5.
44. Wharton, K.N., et al., Severe umbilical cord inflammation-a predictor of periventricular leukomalacia in very low birth weight infants. *Early Hum Dev*, 2004. 77(1-2): p. 77-87.
45. Yoon, B.H., et al., Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol*, 1996. 174(5): p. 1433-40.
46. Andrews, W.W., et al., Early preterm birth: association between in utero exposure to acute inflammation and severe neurodevelopmental disability at 6 years of age. *Am J Obstet Gynecol*, 2008. 198(4): p. 466 e1-466 e11.
47. Naeye, R.L., Functionally important disorders of the placenta, umbilical cord, and fetal membranes. *Hum Pathol*, 1987. 18(7): p. 680-91.
48. Lee, S.D., et al., Chorionic plate vessels as an origin of amniotic fluid neutrophils. *Pathol Int*, 2004. 54(7): p. 516-22.
49. Shim, S.S., et al., Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 191(4): p. 1339-45.
50. Gibbs, R.S., et al., A randomized trial of intrapartum versus immediate postpartum treatment of women with intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol*, 1988. 72(6): p. 823-8.

51. Angus, S.R., et al., Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(5): p. 1232-8.

52. Buhimschi, C.S., et al., Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. *PLoS Med*, 2007. 4(1): p. e18.

53. Greig, P.C., J.M. Ernest, and L. Teot, Low amniotic fluid glucose levels are a specific but not a sensitive marker for subclinical intrauterine infections in patients in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. 171(2): p. 365-70; discussion 370-1.

54. Gauthier, D.W., W.J. Meyer, and A. Bieniarz, Correlation of amniotic fluid glucose concentration and intraamniotic infection in patients with preterm labor or premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. 165(4 Pt 1): p. 1105-10.

55. Kirshon, B., et al., Amniotic fluid glucose and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. 164(3): p. 818-20.

56. Maymon, E., et al., Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. 183(1): p. 94-9.

57. Romero, R., et al., Amniotic fluid glucose concentration: a rapid and simple method for the detection of intraamniotic infection in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1990. 163(3): p. 968-74.

58. Romero, R., et al., The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1993. 169(4): p. 805-16.

59. Yoon, B.H., et al., Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. 177(4): p. 825-30.

60. Potkul, R.K., A.H. Moawad, and K.L. Ponto, The association of subclinical infection with preterm labor: the role of C-reactive protein. *Am J Obstet Gynecol*, 1985. 153(6): p. 642-5.

61. Mazor, M., et al., [C-reactive protein as a marker of infection in women with preterm delivery]. *Harefuah*, 1993. 124(3): p. 132-7, 183-4.

62. Gojnic, M., et al., The significance of C-reactive protein in the diagnosis of fetal tachycardia and therapy of chorioamnionitis. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2005. 32(2): p. 114-6.

63. Romero, R., et al., The value and limitations of the Gram stain examination in the diagnosis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*, 1988. 159(1): p. 114-9.

64. Kiltz, R.J., M.S. Burke, and R.P. Porreco, Amniotic fluid glucose concentration as a marker for intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol*, 1991. 78(4): p. 619-22.

65. Hillier, S.L., et al., The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic

chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol*, 1993. 81(6): p. 941-8.

66. Saji, F., et al., Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol*, 2000. 47(2): p. 185-96.

67. Coultrip, L.L., et al., The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. 171(4): p. 901-11.

68. El-Bastawissi, A.Y., et al., Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol*, 2000. 95(6 Pt 2): p. 1056-64.

69. Jacobsson, B., et al., Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003. 82(5): p. 423-31.

70. Nien, J.K., et al., A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. 195(4): p. 1025-30.

71. Petricoin, E.F., et al., Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 2002. 359(9306): p. 572-7.

72. Paweletz, C.P., et al., Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers*, 2001. 17(4): p. 301-7.

73. Davidsson, P., et al., Identification of proteins in human cerebrospinal fluid using liquid-phase isoelectric focusing as a prefractionation step followed by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002. 16(22): p. 2083-8.

74. Heizmann, C.W., G. Fritz, and B.W. Schafer, S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 2002. 7: p. d1356-68.

75. Buhimschi, C.S., C.P. Weiner, and I.A. Buhimschi, Clinical proteomics: a novel diagnostic tool for the new biology of preterm labor, part I: proteomics tools. *Obstet Gynecol Surv*, 2006. 61(7): p. 481-6.

76. Buhimschi, I.A., R. Christner, and C.S. Buhimschi, Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *Bjog*, 2005. 112(2): p. 173-81.

77. Gravett, M.G., et al., Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers. *Jama*, 2004. 292(4): p. 462-9.

78. Buhimschi, C.S., et al., Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation: relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate. *Pediatr Res*, 2007. 61(3): p. 318-24.

79. Ward, M., Biomarkers for Alzheimer's disease. *Expert Rev Mol Diagn*, 2007. 7(5): p. 635-46.

80. Wild, N., et al., Diagnosis of rheumatoid arthritis: multivariate analysis of biomarkers. *Biomarkers*, 2008. 13(1): p. 88-105.

-
81. Ollero, M., F. Brouillard, and A. Edelman, Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. *Proteomics*, 2006. 6(14): p. 4084-99.
82. Kenyon, S.L., D.J. Taylor, and W. Tarnow-Mordi, Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet*, 2001. 357(9261): p. 989-94.
83. Mercer, B.M., et al., The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 181(5 Pt 1): p. 1216-21.
84. Gomez, R., et al., A short cervix in women with preterm labor and intact membranes: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 192(3): p. 678-89.
85. Iams, J.D., et al., The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med*, 1996. 334(9): p. 567-72.
86. Copper, R.L., et al., Warning symptoms, uterine contractions, and cervical examination findings in women at risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 1990. 162(3): p. 748-54.
87. Crane, J.M. and D. Hutchens, Use of transvaginal ultrasonography to predict preterm birth in women with a history of preterm birth. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2008. 32(5): p. 640-5.

88. Hein, M., et al., Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. 187(1): p. 137-44.

89. Hein, M., et al., An in vitro study of antibacterial properties of the cervical mucus plug in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(3): p. 586-92.

90. Holst, R.M., et al., Cervical length in women in preterm labor with intact membranes: relationship to intra-amniotic inflammation/microbial invasion, cervical inflammation and preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2006. 28(6): p. 768-74.

91. Mercer, B.M. and K.L. Arheart, Antimicrobial therapy in expectant management of preterm premature rupture of the membranes. *Lancet*, 1995. 346(8985): p. 1271-9.

92. Kenyon, S.L., D.J. Taylor, and W. Tarnow-Mordi, Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet*, 2001. 357(9261): p. 979-88.

93. Kenyon, S., et al., MRC ORACLE Children Study. Long term outcomes following prescription of antibiotics to pregnant women with either spontaneous preterm labour or preterm rupture of the membranes. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2008. 8: p. 14.

94. Lamont, R.F., Antibiotics used in women at risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2008. 199(6): p. 583-4.

8 ANNEXO

Date:01-Apr-2009
Ref.: UOG-2008-0589.R2

Dear Dr Cobo

Thank you for submitting a further amended version of your manuscript, "CERVICAL LENGTH AND GESTATIONAL AGE AT ADMISSION AS PREDICTORS OF INTRA-AMNIOTIC INFLAMMATION IN PRETERM LABOR WITH INTACT MEMBRANES". I am pleased to inform you that it has now been accepted for publication in *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*.

Please mail or fax a completed copyright transfer agreement (which can be downloaded from the journal website <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jabout/99020267/ForAuthors.html>) to the address below.

Sarah Hatcher
Ultrasound in Obstetrics and Gynecology
4, Blythe Mews
Blythe Road
London W14 0HW
United Kingdom
Fax: 44 (0) 20 7471 9956

When the manuscript has been assigned an issue, it will be forwarded for typesetting and you will receive the proof via e-mail containing a link to a pdf file. Further instructions will be sent with the proof.

Dr. Cobo, I would like to take this opportunity to congratulate you and to thank you for choosing *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* for publication of your work.

With warm personal regards,

Roberto Romero
Editor, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*