



**Universidad de Valladolid**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE  
ANATOMÍA PATOLÓGICA, MICROBIOLOGÍA,  
MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA, Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE  
*Programa Oficial de Doctorado en Investigación en Ciencias de la Salud*

TESIS DOCTORAL:

**INMUNOMONITORIZACIÓN  
DE LA INFECCIÓN GRAVE**

Presentada por ANA RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Jesús F. Bermejo Martín

Director

Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo

Tutor Académico





**Universidad de Valladolid**

**D. JESÚS F. BERMEJO MARTÍN**, con D.N.I 09.344.393-E, Doctor en Medicina y Cirugía, y especialista en Inmunología Clínica,

**CERTIFICA QUE:**

**D<sup>a</sup>. ANA RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ** ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctora con el título:

**“INMUNOMONITORIZACIÓN DE LA INFECCIÓN GRAVE”**

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral. Y para que así conste y obre a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valladolid, 1 de Febrero de 2016.

Fdo. Dr. Jesús F. Bermejo Martín

Director



*Parte de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la  
financiación del Estudio GRECIA  
Entidad financiadora: Proyectos de investigación en Biomedicina  
Consejería de Sanidad, JCYL  
BOCYL-D-26072010  
y  
Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III  
Proyecto PI13/02110.*



*A mi familia y a Gonzalo*



*A Beli*



## AGRADECIMIENTOS

---

No es hasta este momento cuando me paro a pensar en todas las personas que durante estos años me han apoyado de forma desinteresada y a las que tengo tanto que agradecer. A todas ellas, gracias.

Jesús, que puedo decir. Te estaré eternamente agradecida. Porque esto es mi sueño, y jamás pensé poder cumplirlo. Y sí, siempre tuviste un hueco que dedicarme, paciencia ante mis limitaciones, una palabra de ánimo o una forma de transmitirme tu ilusión por esta profesión. Pensaste que podía y apostaste por mí. Gracias por enseñarme tantas cosas, por enseñarme que investigar merece la pena.

Raúl, gracias por dejarme forma parte de esto, por hacer que pueda dedicarme a lo que más me gusta, por hacerme participe de tantas cosas y ayudarme durante todo este camino. Por darme confianza, abrirme puertas y felicitarme en mis progresos. Por que nos une algo más que una casa en Cantabria.

Porque la vida me dio el mejor ejemplo, Papá. Por tu humildad, perseverancia, y esfuerzo. Por ayudarme a creer que yo podía hacerlo. Por guiarme y creer en mí desde las tablas de multiplicar.

Mamá, porque sacrificaste tu carrera profesional por tu familia. Por tu dedicación infinita, por enseñarme humanidad y comprensión. Por hacer que quiera ser mejor persona cada día.

Mi Erni, por ser mi otra mitad, siempre creer en mí y hacer mi vida más fácil.

A mis abuelos, porque ellos me hacen creer en algo más que en la ciencia.

Y a ti Gonzalo, por recorrer el camino conmigo y por hacer de mi sueño el tuyo: *My theory is about moments, moments of impact. My theory is that these moments of impact, these flashes of high intensity that completely turn our lives upside down actually end up defining who we are. The thing is each one of us is the sum total of every moment that we've ever experienced with all the people we've ever known. And it's these moments that become our history. Like our own personal greatest hits of memories that we play and replay in our minds over and over again.* Eres mi momento favorito.

Mis megas, 25 años juntas. Porque tomamos caminos diferentes y aún así siempre encontramos la manera de volver a unirnos. Por esos grandes momentos de desconexión entre línea y línea.

Madrid, mi vida no hubiera sido la misma sin vosotros: *de Madrid al cielo.*

A Raquel Almansa. Por servirme de guía en cada paso. Por tu amistad y paciencia.

Al Servicio de Micro: administrativos, auxiliares, técnicos, enfermeros, adjuntos,...Por supuesto a mis resis, los que están y los que se fueron, en especial a Mar, Eleda y Ana por aguantarme cada día y no dejar de apoyarme. A Iván por compartir tantos ratos de risas e inconformidades administrativas...

Silvia, por tu apoyo incondicional.

A Lucia Rico, Verónica Iglesias, y Alicia Ortega por hacer un trabajo excepcional y siempre tener una sonrisa que mostrarte.

A David Andaluz, por resolverme mis dudas clínicas, siempre tener respuesta a mis múltiples peticiones, y ser tan buen compañero.

A las chicas de la Unidad de Apoyo a la Investigación, y a M Fe Muñoz por hacer fácil lo imposible ( $p < 0,001$ ).

A Jesús Blanco, y su equipo de la UCI del Hospital Universitario Rio Hortega, por dejarme formar parte de este gran proyecto.

Toda investigación requiere de un gran equipo multidisciplinar. A todos vosotros, mi más sincero reconocimiento y gratitud, gracias equipo!

*A cada uno de los que de una manera u otra habéis hecho de  
mi sueño una realidad*

*Feliz*

*Ana Rodríguez Fernández*





**I- *Indice***

---



<b>I- INDICE</b>	<b>15 - 20</b>
<b>II- ABREVIATURAS</b>	<b>21 - 28</b>
<b>III- RESUMEN</b>	<b>29 - 34</b>
<b>IV- INTRODUCCIÓN</b>	<b>35 - 108</b>
<b>El sistema inmune</b>	<b>37-72</b>
Infección e inmunidad.....	37
Organización del sistema inmunológico: Principales células y mediadores inmunológicos.....	39
Mecanismos de defensa inespecíficos.....	63
Mecanismos de defensa específicos.....	66
Regulación de la respuesta inmune.....	70
Modelos de infección y evasión inmunológica.....	72
<b>Infección grave</b>	<b>73-77</b>
Infección comunitaria e infección relacionada con la asistencia sanitaria.....	75
Infección nosocomial.....	77
<b>Inmunidad y neumonía asociada a ventilación mecánica</b>	<b>78-87</b>
Definición y etiología infecciosa.....	78
Inmunopatología de la NAV.....	78
Epidemiología de la NAV.....	81
<i>Staphylococcus aureus</i> : Características microbiológicas, epidemiológicas y patogenia.....	82
Diagnóstico microbiológico de la NAV: Tiempo de respuesta.....	86
<b>Inmunidad y sepsis</b>	<b>88-97</b>
Origen y concepto.....	88
Categorías de la sepsis.....	88
Situación epidemiológica actual de la sepsis.....	91
Fisiopatología de la sepsis: dogma central y nuevas perspectivas.....	93
<b>Biomarcadores en el paciente con infección grave</b>	<b>98-108</b>
Consideraciones generales: usos y repercusiones clínicas.....	98
Scores de gravedad.....	98
Biomarcadores en inflamación e infección grave.....	100

Utilidad del hemograma como biomarcador.....	106
<b>V- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>109 - 114</b>
Hipótesis.....	111
Objetivos principales.....	113
Objetivos secundarios.....	113
<b>VI- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>115 - 134</b>
<b>Primer estudio: Cohorte NAV</b>	<b>117-122</b>
Diseño del estudio.....	117
Pacientes.....	117
Recogida de datos.....	118
Variables de estudio.....	118
Diagnóstico clínico.....	120
Diagnóstico de laboratorio.....	120
Análisis bioestadístico.....	121
Comité ético. Consentimiento informado.....	122
<b>Segundo estudio: Cohorte sepsis (Estudio GRECIA)</b>	<b>123-134</b>
Diseño del estudio.....	123
Pacientes.....	123
Recogida de datos.....	124
Variables de estudio.....	124
Diseño del estudio.....	124
Cuantificación de inmunoglobulinas plasmáticas.....	125
Cuantificación de albumina plasmática.....	131
Análisis bioestadístico.....	131
Comité ético. Consentimiento informado.....	133
<b>VII- RESULTADOS</b>	<b>135 – 182</b>
<b>Primer estudio: Cohorte NAV</b>	<b>137-148</b>
Características demográficas, clínicas y analíticas de la población.....	137
Evaluación del impacto de la concentración de eosinófilos.....	143
Análisis multivariante de mortalidad mediante regresión de Cox.....	144
Análisis de supervivencia Kaplan-Meier.....	146
Análisis curvas AUROC.....	148

<b>Segundo estudio: Cohorte sepsis (Estudio GRECIA)</b>	<b>149-192</b>
Características demográficas, clínicas y analíticas de la población.....	149
Curvas de supervivencia Kaplan-Meier: Impacto de inmunoglobulinas plasmáticas.....	155
Curvas de supervivencia Kaplan-Meier: Impacto de Inmunoscores.....	164
Estudio comparativo e impacto de niveles de inmunoglobulinas e Inmunoscores.....	170
Correlación niveles albúmina e inmunoglobulinas plasmáticas.....	172
Análisis univariante de comorbilidades.....	176
Modelos predictivos de mortalidad.....	177
Análisis de IS mediante corte trasversal por percentiles de niveles de inmunoglobulinas (evaluación con Ig G1).....	181
Análisis de IS mediante corte trasversal por percentiles de niveles de inmunoglobulinas (evaluación con Ig G total).....	185
<b>VIII- DISCUSIÓN</b>	<b>193 - 218</b>
Estudio de las características clínicas y demográficas de pacientes con infección grave.....	196
Papel de los eosinófilos en la patología infecciosa grave.....	199
Estudio de inmunoglobulinas en sepsis grave y shock séptico.....	205
Reinvención del hemograma e incorporación de nuevos parámetros inmunológicos en el seguimiento de la infección grave.....	213
Monitorización inmunológica en la infección grave.....	215
<b>IX- CONCLUSIONES</b>	<b>219 – 224</b>
<b>X- RENDIMIENTO CIENTÍFICO</b>	<b>225 – 250</b>
<b>XI- ANEXOS</b>	<b>251 – 262</b>
<b>XII- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>263 – 283</b>



## **II- *Abreviaturas***

---



---

**ABREVIATURAS**


---

<b>ACCP</b>	<i>American College of Chest Physicians</i>	<b>CID</b>	Coagulación intravascular diseminada
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>CLC</b>	<i>Charlot Leyden Crystal</i>
<b>AEMPS</b>	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios	<b>Cif</b>	<i>Clumping factor</i>
<b>AG</b>	Antígeno	<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
<b>APACHE</b>	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>	<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>aPPT</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activada	<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>CPIS</b>	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>
<b>AT</b>	Antitrombina	<b>CR</b>	Receptor del complemento
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>	<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico
<b>BAL</b>	Lavado broncoalveolar	<b>DAMP</b>	<i>Damage associated molecular patterns</i>
<b>BALT</b>	Tejido linfoide asociado a los bronquios	<b>DIV</b>	Dispositivo intravascular
<b>BAS</b>	Broncoaspirado	<b>EARS</b>	Red Europea de Vigilancia de la Resistencia Antibiótica
<b>BCR</b>	Receptor célula B	<b>ECP</b>	Proteína catiónica del eosinófilo
<b>BPI</b>	<i>Bactericidal / permeability Increasing protein</i>	<b>EDN</b>	Neurotoxina derivada del eosinófilo
<b>CAM</b>	Complejo de Ataque a Membrana	<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetraacético
<b>CARS</b>	<i>Compensatory anti inflammatory response syndrome</i>	<b>EET</b>	<i>Eosinophil extracellular trap</i>
<b>CCL</b>	<i>Chemoquine ligand</i>	<b>EPO</b>	Peroxidasa del eosinófilo
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>	<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades	<b>ESICM</b>	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i>
<b>CDR</b>	Región determinante de complementariedad	<b>ET</b>	Endotelina
<b>CEIC</b>	Comité Ético y de Investigación Clínica	<b>Fab</b>	Fracción de unión al antígeno
<b>CG</b>	Catepsina G	<b>Fc</b>	Fracción cristalizabile

<b>FMO</b>	Fallo multiorgánico	<b>IRAS</b>	Infección Relacionada con la Asistencia Sanitaria
<b>FnBP</b>	Proteína fijadora de fibronectina	<b>IS</b>	Inmunoscore
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de crecimiento de granulocitos	<b>KIR</b>	<i>Killer cell Ig-like receptors</i>
<b>GISA</b>	<i>S. aureus</i> intermedio a glucopéptidos	<b>LALT</b>	Tejido linfoide asociado a laringe
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos	<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>GRO</b>	<i>Growth regulated oncogen</i>	<b>LFA</b>	<i>Lymphocyte function antigen</i>
<b>HCUV</b>	Hospital Clínico Universitario de Valladolid	<b>LL-37</b>	Catelicidina
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i>	<b>Lpm</b>	Latidos por minuto
<b>HMGP</b>	<i>High mobility group pretein</i>	<b>LPS</b>	Lipopolisacarido
<b>HNP</b>	<i>Human Neutrophil Protein</i>	<b>MAdCAM</b>	<i>Mucosal addressing cell adhesion molecule</i>
<b>HR</b>	Hazard Ratio	<b>MBP</b>	Proteína fijadora de manosa
<b>IC</b>	Intervalo de Confianza	<b>MALT</b>	Tejido linfoide asociado a mucosas
<b>ICAM</b>	<i>intercellular adhesion molecule</i>	<b>MBP</b>	Proteína básica mayor
<b>IFN</b>	Interferón	<b>MCP</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina	<b>M-CSF</b>	Factor estimulador de crecimiento de macrófagos
<b>IGIV</b>	Inmunoglobulinas intravenosas	<b>MEDS</b>	<i>Mortality in Emergency Department Sepsis</i>
<b>IGMAIV</b>	Inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas con IgM e IgA	<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>IL</b>	Interleucina	<b>MIF</b>	Factor inhibidor de la migración
<b>IL-1Ra</b>	Antagonista del receptor de interleucina 1	<b>MIP</b>	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
<b>ILT</b>	<i>Immunoglobulin like transcripts</i>	<b>MODS</b>	Síndrome de disfunción multiorgánica
<b>IN</b>	Infección nosocomial	<b>MPM</b>	<i>Mortality Prediction Model</i>
<b>IPA</b>	<i>Ingenuity pathways analysis</i>	<b>NAC</b>	Neumonía asociada a la comunidad
<b>IPS</b>	<i>Infection Probability Score</i>	<b>NACS</b>	Neumonía asociada a los cuidados sanitarios

<b>NALT</b>	Tejido linfoide asociado a la nariz	<b>PR</b>	Proteinasas
<b>NAV</b>	Neumonía asociada a ventilación	<b>Pro-ADM</b>	Pro-Adrenomedulina
<b>NN</b>	Neumonía nosocomial	<b>Pro-ANP</b>	Pro-Péptido natriurético atrial
<b>NAMLAA</b>	<i>N</i> -acetil muramil- <i>L</i> -alanina amidasa	<b>PSGL</b>	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>
<b>NE</b>	Elastasa del neutrófilo	<b>PSI</b>	<i>Pneumonia Severity Index</i>
<b>NET</b>	<i>Neutrophil extracellular trap</i>	<b>PTX</b>	Pentraxina
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>	<b>RANTES</b>	<i>Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>RIN</b>	Relación internacional normalizada
<b>OR</b>	Odds Ratio	<b>RLB</b>	Regresión Logística Binaria
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1	<b>ROC</b>	<i>Receiver operating characteristic</i>
<b>PAF</b>	Factor de activación plaquetaria	<b>S</b>	<i>Standard</i>
<b>PAM</b>	Presión arterial media	<b>SACYL</b>	Sanidad Castilla y León
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>	<b>SAMR</b>	<i>S. aureus</i> metilicina resistente
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica	<b>SAMS</b>	<i>S. aureus</i> metilicina sensible
<b>PBP</b>	<i>Penicilin binding protein</i>	<b>SA-PE</b>	Estreptavidina-Ficoeritrina
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva	<b>SAPS</b>	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<b>SCCM</b>	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
<b>PCT</b>	Procalcitonina	<b>SDRA</b>	Síndrome Distrés Respiratorio Agudo
<b>PG</b>	Peptidoglicano	<b>SG</b>	Sepsis grave
<b>pIgR</b>	Receptor polimérico de inmunoglobulina	<b>SIRS</b>	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

<b>SIS</b>	<i>Surgical Infection Society</i>	<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>SOFA</b>	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>	<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>SS</b>	Shock séptico	<b>t-PA</b>	Activador tisular del plasminógeno
<b>SSC</b>	Campaña para Sobrevivir a la Sepsis	<b>TRI</b>	Tracto respiratorio inferior
<b>sTREM</b>	Receptor de superficie expresado en las células mieloides	<b>TSST</b>	Toxina del síndrome de shock tóxico
<b>TAFIa</b>	inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina	<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>TCR</b>	Receptor célula T	<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión celular vascular
<b>Tdt</b>	Desoxinucleotidil transferasa terminal	<b>VRS</b>	Virus respiratorio sincitial
<b>TFPI</b>	inhibidor del factor tisular	<b>VRSA</b>	<i>S. aureus</i> vancomicina resistente
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante beta	<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana





### **III- Resumen**

---



## RESUMEN

---

La infección grave supone un problema de salud pública mundial con un importante impacto tanto en términos de morbilidad como de mortalidad. Las condiciones sociodemográficas actuales han generado una población cada vez más envejecida que presenta numerosas comorbilidades y que requieren en muchos casos de atención sanitaria continuada. Las estrategias actuales para la prevención y control de la infección grave están basadas en la búsqueda de nuevas herramientas que mejoren el diagnóstico y pronóstico de patologías tan graves como la neumonía asociada a ventilación mecánica o la sepsis. Sin embargo, actualmente aún no se han descubierto los biomarcadores con la suficiente sensibilidad y especificidad que nos ayuden en el seguimiento de pacientes que padecen estas patologías.

El sistema inmune, formado por una compleja red de procesos con múltiples conexiones y mecanismos celulares, constituye la primera respuesta del organismo frente a cualquier agente externo. La compleja fisiopatología y los mecanismos que se desencadenan durante el curso de la enfermedad dan lugar a millones de dianas susceptibles de ser investigadas y analizadas constituyendo una vía con múltiples oportunidades para la mejora del manejo de la infección grave. La profundización en el conocimiento de la respuesta inmune desencadenada durante el proceso infeccioso, así como el análisis de las variables clínicas y demográficas de riesgo nos permitirá generar nuevas estrategias para abordar este problema.

La actual limitación de los recursos económicos destinados a la investigación hace que debamos tomar medidas para reorientar y optimizar los recursos disponibles. Es por ello que esta tesis doctoral aborda la infección grave desde dos puntos de vista diferenciados tanto a nivel metodológico, como en relación a la inversión de los recursos empleados para su desarrollo. La primera parte, trata de profundizar e indagar sobre nuevas utilidades del hemograma mediante el estudio retrospectivo de las subpoblaciones leucocitarias en la neumonía asociada a ventilación mecánica por *S. aureus*. La segunda parte, explora en un estudio multicéntrico prospectivo, la utilidad y el valor de los niveles endógenos de inmunoglobulinas en la sepsis grave y el shock séptico.

Cada vez existe más evidencia sobre el papel pronóstico y diagnóstico del sistema inmunológico en la infección grave, el cual se debería empezar a considerar como un órgano más a la hora de valorar el estado, evolución y pronóstico de pacientes con estas características.

Los resultados de los 44 pacientes incluidos en el estudio de neumonía asociada a ventilación mecánica por *S. aureus* ponen de manifiesto la importancia del eosinófilo como célula protectora en esta patología. En nuestra cohorte, el hecho de no expandir la concentración en sangre de esta subpoblación leucocitaria se traducían en un peor desenlace. De hecho, aquellos pacientes con menos de 30 eosinófilos/mm<sup>3</sup> fallecían más rápidamente. Estos resultados apoyan la reinterpretación del hemograma como herramienta pronóstica.

La cohorte de pacientes sépticos incluyó 172 pacientes donde se objetivó la presencia de niveles bajos de los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas en un porcentaje considerable. Tanto es así, que niveles bajos para dos o más inmunoglobulinas evaluados a través de *Inmunoscores* que contenían dos o más de dichas inmunoglobulinas, se asociaron de forma sinérgica con un aumento de mortalidad. Este es el primer estudio que evalúa los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas permitiendo una mejor estratificación y caracterización de los pacientes con sepsis grave o shock séptico.

Por todo lo descrito anteriormente, esta tesis doctoral ha profundizado en el conocimiento y en la utilidad de la monitorización de parámetros inmunológicos que pueden servir como biomarcadores independientes o valorarse como parte de escalas de gravedad, siendo beneficiosa su implementación para la mejor comprensión de la enfermedad infecciosa grave ya sea con objeto de complementar el diagnóstico, mejorar el pronóstico o para la instauración de un correcto tratamiento.





## ***IV- Introducción***

---



## INTRODUCCIÓN

---

### El sistema inmune

---

#### INFECCIÓN E INMUNIDAD

La infección es un fenómeno caracterizado por la respuesta inflamatoria del huésped ante la presencia de agentes patógenos que se adhieren, multiplican e invaden tejidos orgánicos. Cuando se producen manifestaciones clínicas en el individuo se da lugar a lo que conocemos como enfermedad infecciosa.

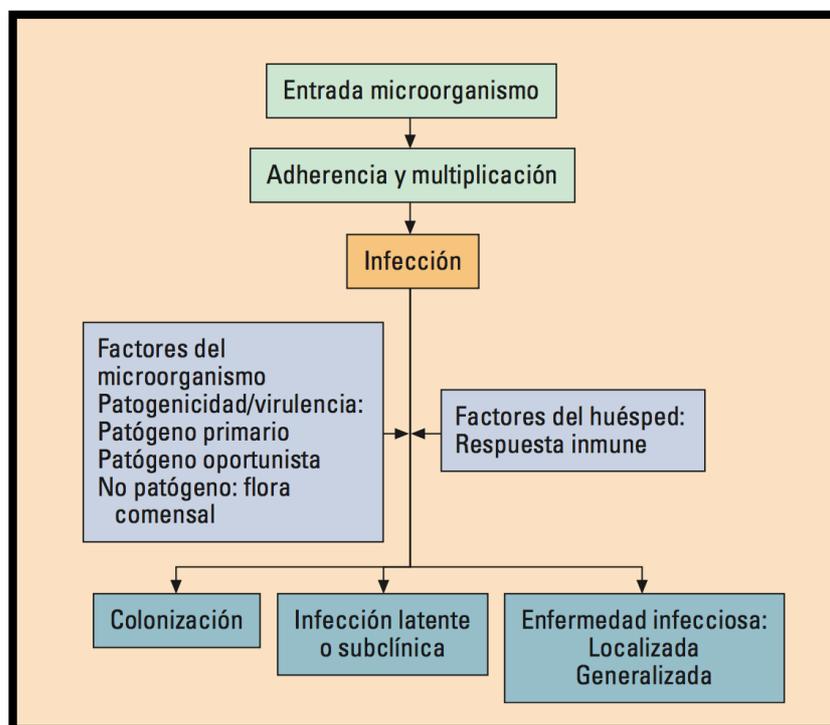
El sistema inmunológico se define como el conjunto de procesos celulares y moleculares encargados de la defensa e integridad biológica de un organismo mediante la identificación de sustancias propias, y la detección y posterior destrucción de sustancias extrañas. Se trata de múltiples y heterogéneos mecanismos que actúan de manera integrada y unitaria.

La inmunidad se adquiere antes del nacimiento, y se consolida durante los primeros años de vida. En estos procesos participan diferentes poblaciones celulares y mediadores que interactúan para conseguir una respuesta coordinada y efectiva. Estos mecanismos de defensa pueden ser inespecíficos, formados por las barreras naturales y la respuesta inmune innata, y específicos, constituidos por la respuesta inmune adaptativa o adquirida como veremos más adelante.

A su vez, el sistema inmunitario puede verse alterado, ya sea por una hiperactividad inmunológica (hipersensibilidad y/o neoplasias) (1)(2), incapacidad para reconocer sustancias propias (autoinmunidad) (3)(4), o un fallo en la defensa (inmunodeficiencia) que puede ser primaria, generalmente de tipo genético (5), o secundaria inducidas por fármacos (6), agentes infecciosos (7)(8) o malnutrición (9).

El ser humano mantiene una estrecha relación con determinados microorganismos ya que constituyen la flora normal presente en superficies corporales y en cavidades internas como los tractos gastrointestinal, orofaríngeo y genitourinario, entre otros. Esta flora tiene un efecto beneficioso formando parte de las barreras de defensa inespecífica de tipo biológico que van a limitar el acceso de agentes patógenos.

De forma general, los microorganismos patógenos se encuentran muy adaptados al medio y han desarrollado características que les permiten unirse a superficies, invadir tejidos, evitar las defensas del huésped y por lo tanto, causar enfermedad. Sin embargo, su capacidad de producir enfermedad no depende únicamente de las características intrínsecas del microorganismo (factores de virulencia) sino de otros muchos factores siendo el más importante el estado inmunológico del huésped que infecta. Por tanto, la participación e implicación del sistema inmunológico en la patología infecciosa es fundamental y la **interacción patógeno-huésped** puede desencadenar varios tipos de respuestas. Esta respuesta puede ser: 1. beneficiosa, produciéndose la eliminación del patógeno implicado; 2. una respuesta potencialmente ineficaz del sistema inmune produciéndose una colonización del individuo por el patógeno; o 3. un fracaso inmunológico que deriva en infección grave y pone en riesgo la salud del paciente (Figura 1).



**Figura 1:** Fisiopatología general de la enfermedad infecciosa. Adaptada de (10).

Actualmente, las enfermedades infecciosas constituyen un problema de salud pública mundial y atendiendo al último informe publicado por el Instituto de Salud Carlos III (11), la patología infecciosa supone un 6,0% de la mortalidad general en España. En el 2012, último año analizado, hubo 24.453 defunciones lo que corresponde a una tasa de 53 defunciones por 100.000 habitantes, un 7,4% más que el año anterior.

Todo esto hace que el conocimiento de las enfermedades infecciosas y de sus agentes etiológicos, el control y prevención de la infección tanto comunitaria como hospitalaria, y la investigación centrada en nuevos tratamientos y biomarcadores específicos para mejorar el diagnóstico y pronóstico sean fundamentales.

### **ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO: PRINCIPALES CÉLULAS Y MEDIADORES INMUNOLÓGICOS**

El sistema inmunológico se encuentra ubicado en los órganos linfoides (primarios y secundarios), y para llevar a cabo sus funciones existen múltiples poblaciones celulares (linfocitos, monocitos, neutrófilos, etc.) y mediadores (inmunoglobulinas, sistema del complemento, citoquinas, etc.) implicados.

Los órganos linfoides primarios lo componen la médula ósea (órgano de maduración de linfocitos B) y el timo (maduración linfocitos T). Los órganos linfoides secundarios se encargan de proporcionar el medio adecuado para que se produzcan las interacciones celulares necesarias y lo componen el bazo, los ganglios linfáticos, y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

Por último, existen unas áreas denominadas inmunológicamente privilegiadas debido a que no existe respuesta inmune en ellas, con el objetivo de evitar cualquier reacción inflamatoria que pueda dañar al individuo. Algunas de estas áreas son el cerebro, los testículos o la cámara anterior del ojo. Se encuentran protegidas por fuertes membranas de muy baja permeabilidad.

Las diferentes poblaciones y mediadores celulares que componen e interactúan formando el sistema inmunitario se detallan a continuación.

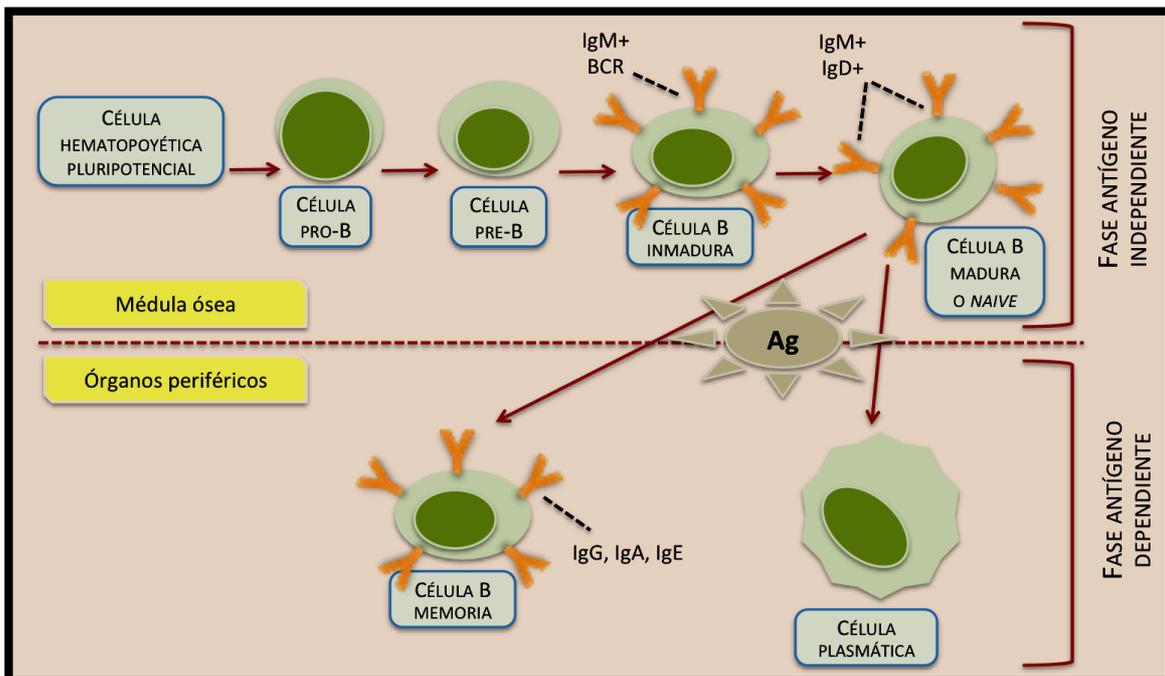
#### **I. Linfocitos B**

Son las principales células mediadoras de la inmunidad adaptativa de tipo humoral y actúan sintetizando anticuerpos, o como células presentadoras de antígeno. Las células presentadoras de antígeno (CPA) son aquellas que cumplen los siguientes criterios: ser capaces de interactuar con antígenos "naive", internalizarlos, degradarlos proteolíticamente en péptidos susceptibles de ser presentados en superficie, poseer Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHC-II), y expresar moléculas coestimuladoras y de adhesión. Las células que poseen estas características junto a los linfocitos B son las células dendríticas y los macrófagos.

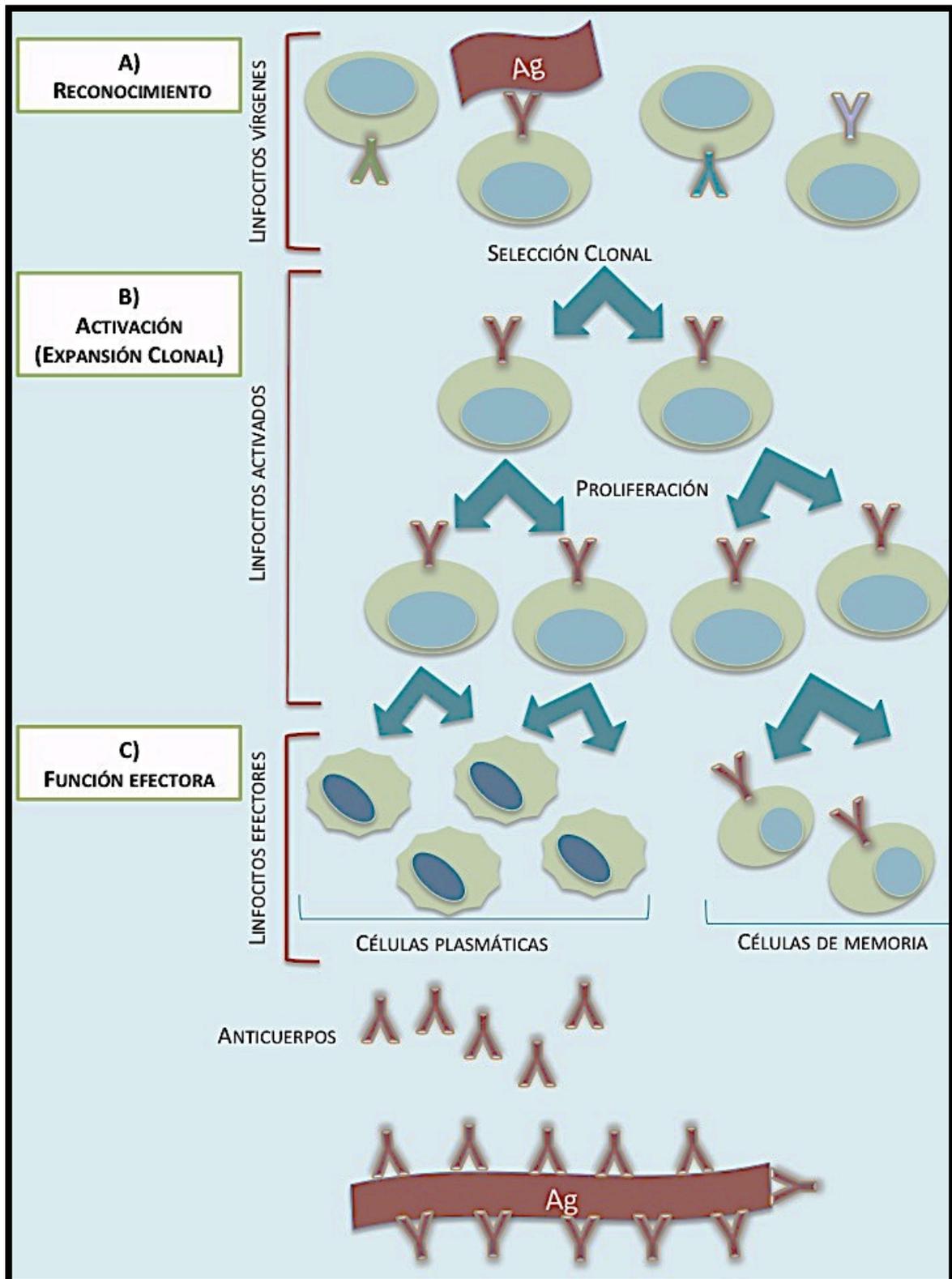
**ONTOGENIA:**

Se divide en dos fases perfectamente diferenciadas. En primer lugar, a nivel de la médula ósea, se produce la fase de maduración linfocitaria a partir de las células precursoras. El primer estadio madurativo se conoce como *célula pro-B*; estas células expresan algunos marcadores propios de la célula B madura como el MHC-II o CD19. A continuación, se inicia el reordenamiento del ADN de la cadena pesada  $\mu$  ( $\mu$ ), para dar lugar a la *células pre-B* donde se produce el reordenamiento de los genes que codifican las cadenas ligeras. El tercer estadio corresponde a *células B inmaduras* donde se produce la selección negativa o proceso de selección clonal. En este proceso se eliminan todos aquellos linfocitos B autorreactivos, es decir aquellos que reconocen antígenos propios, mediante apoptosis o anergia funcional. Por último, se genera la *célula B madura o "naive"*, que expresa en su superficie IgD e IgM.

La segunda fase se produce en órganos periféricos, y en ella el linfocito B maduro o "naive" se pone en contacto con un determinado antígeno (Ag). Esta interacción activa el linfocito B y prolifera (proceso de expansión clonal) generando células B de memoria las cuales pierden la IgD de superficie, y dejan de expresar IgM para expresar IgA, IgG o IgE por un proceso denominado "Switching o conmutación somática". A parte de células de memoria, los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas o plasmocitos que son las células capaces de secretar anticuerpos. Los plasmocitos solo son capaces de producir anticuerpos; no reconocen Ag pues carecen de receptores específicos para la interacción antigénica (Figuras 2 y 3).



**Figura 2:** Proceso de maduración de linfocitos B en médula ósea y órganos periféricos.



**Figura 3:** Proceso de activación de linfocitos B: A) Reconocimiento, B) activación clonal y C) función efectora.

### RECEPTOR Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LINFOCITOS B:

Los linfocitos se diferencian entre sí por las moléculas presentes en su superficie. Dichas moléculas configuran y caracterizan cada tipo celular. En los linfocitos B distinguimos una serie de moléculas que lo diferencian del resto de células:

1. Uno de los marcadores fundamentales en el linfocito B es la inmunoglobulina de membrana cuya única función es de reconocimiento antigénico. Carece de funciones efectoras y constituye el principal marcador de células B.

2. El MHC-II (también conocido como HLA-D – “*Human leukocyte antigen*” tipo D) es una molécula necesaria para la presentación de antígeno a los linfocitos T.

3. Receptores para el complemento: CR1 (receptor para el complemento de tipo 1 o CD35) que actúa como receptor de la fracción C3b del complemento; y CR2 (o CD21), receptor de la fracción C3 del complemento.

4. Receptor para la fracción Fc de las IgG (FcγR-II o CD32).

5. Otros: CD19 (marcador universal de linfocitos B), CD20, CD22, CD40, etc.

Para la interacción con el antígeno requieren de un complejo denominado BCR (“*B cell receptor*”) formado por una parte funcional y otra estructural bien diferenciadas: la inmunoglobulina de membrana para el reconocimiento antigénico, y el heterodímero CD79 asociado a la anterior encargada de la transmisión de la señal de activación al núcleo de los linfocitos B.

### II. Inmunoglobulinas

Se trata de glicoproteínas de elevado peso molecular que constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas plasmáticas. Estas proteínas son capaces de interactuar con antígenos específicos y son la base de la respuesta inmune adaptativa de tipo humoral. Pueden encontrarse unidas a la membrana del linfocito B o en forma soluble (anticuerpos) (12)(13).

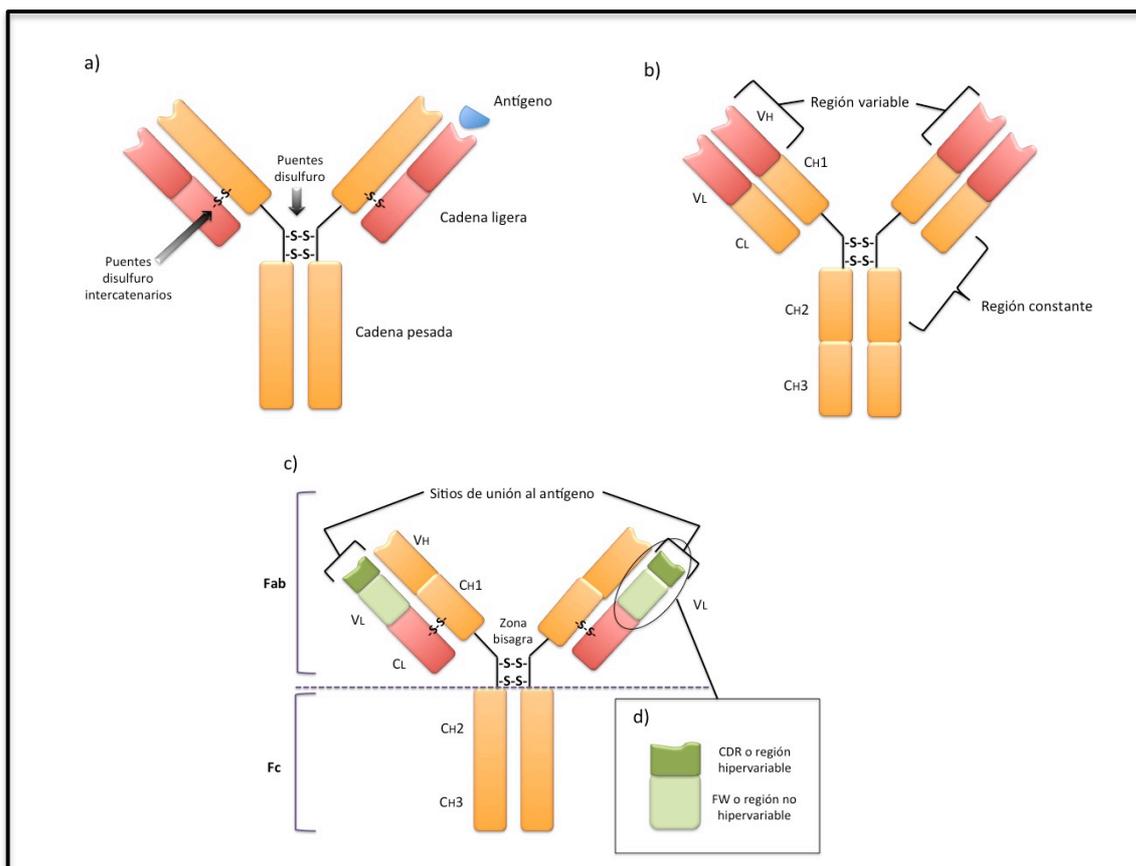
### ESTRUCTURA:

Cada inmunoglobulina está formada por cuatro cadenas unidas entre sí por puentes disulfuro:

- dos cadenas L (“*light*” o ligeras) que a su vez pueden ser de dos tipos  $\kappa$  (*kappa*) o  $\lambda$  (*lamda*) y
- dos cadenas H (“*heavy*” o pesadas) que a su vez pueden ser de cinco tipos  $\mu$  (*mu*),  $\alpha$  (*alfa*),  $\epsilon$  (*epsilon*) o  $\delta$  (*delta*),

Cada cadena a su vez, está formada por dos partes: la región constante (extremo carboxi-terminal, - C) y la región variable (extremo amino-terminal, -V) donde se encuentran a su vez, la región hipervariable o CDR (región determinante de la complementariedad) que sirve para el reconocimiento y unión al epítopo del antígeno, y la región no hipervariable o FR (*framework*) cuya función es la correcta presentación del CDR al antígeno.

El tratamiento de la inmunoglobulina con el enzima papaína genera tres fragmentos (2 Fab iguales y un Fc). Las regiones variables de ambas cadenas (VL y VH) y los dominios CL y CH1 de las cadenas pesadas forman el denominado fragmento Fab (*“Antigen binding fragment”*) encargado del reconocimiento antigénico y el resto de dominios (CH2 y CH3; y en el caso de IgM e IgE, CH4) forman el fragmento Fc (*“Crystalizable fragment”*). El fragmento Fc es responsable de las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas siendo el punto de unión a la membrana plasmática del linfocito B y receptores específicos (FcR), permitiendo la activación del Complemento (a través de los dominios CH) y el paso trasplacentario (únicamente en el caso de las IgG) (Figura 4).



**Figura 4:** Estructura biológica de una molécula de inmunoglobulina: a) Cadenas ligeras y pesadas, b) regiones constantes y variables, c) fragmentos tras el tratamiento con papaína, y d) estructura de la región variable.

Una vez producido el ensamblaje de las cadenas, la inmunoglobulina tiene dos opciones: permanecer en la membrana de las células B convirtiéndose en el receptor BCR, o bien ser secretada.

**TIPOS:**

a) Isotipos: También denominadas clases de inmunoglobulinas. Se trata del conjunto de variantes comunes a todos los individuos sanos de una misma especie. Los isotipos dependen de la región constante de las cadenas pesadas (CH2 y CH3) dando lugar a cinco clases (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Existen a su vez cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y dos subclases de IgA (IgA1 y IgA2). Cada isotipo puede contener cadenas ligeras de tipo *kappa* o *lambda*, existiendo de esta última cuatro subtipos ( $\lambda_1$ - $\lambda_4$ ).

b) Alotipos: Conjunto de diferencias antigénicas presentes en los dominios CH1 y CL determinadas por factores genéticos.

c) Idiotipos: Conjunto de variantes antigénicas según la región CDR (dominios VH y VL) que confiere singularidad a cada clon de células B.

**FUNCIONES:**

A) INMUNOGLOBULINA G

Se trata de la inmunoglobulina más abundante alcanzando en torno a 1.100 mg/dl en plasma, siendo la IgG1 el subtipo mayoritario (en torno al 60%). La IgG2 constituiría el 20%, y la IgG3 e IgG4 el resto. Es capaz de activar el complemento (la IgG3 es la más activa, y en cambio la IgG4 carece de actividad). Atraviesa activamente las membranas biológicas y es la única capaz de acceder a través de la membrana placentaria. Tiene capacidad neutralizante (fundamental para bloquear toxinas bacterianas) y opsonizante. La unión *ag-inmunoglobulina* induce cambios en el fragmento Fc de la inmunoglobulina, permitiendo su anclaje a los FcR de otras poblaciones celulares como los macrófagos o polimorfonucleares para la posterior fagocitosis y citolisis celular dependiente de anticuerpo. La síntesis diaria de IgG en un individuo en estado de reposo inmunológico es de 2.400 mg, y la cantidad total en un adulto estándar es de 80 g aproximadamente.

La IgG constituye lo que se conoce como memoria inmunológica y es fundamental en las seroconversiones para el diagnóstico microbiológico.

B) INMUNOGLOBULINA M

Se trata de la Ig de mayor peso molecular. Tiene estructura pentamérica y su estabilidad se debe a la "cadena J" que une los cinco monómeros. Ante un proceso infeccioso es la primera inmunoglobulina en aparecer y es capaz, junto con la IgG, de activar el

complemento. Participa en la respuesta inmunitaria primaria por lo que su detección suele indicar infección aguda.

C) INMUNOGLOBULINA A

Puede presentarse en dos formas: monomérica en sangre (IgA sérica o IgA1), o dimérica (IgA secretora o IgA2) presente en mucosas. Es la inmunoglobulina más abundante en el MALT y en secreciones como bronquios, lagrimas, LCR, leche materna, etc. Tiene capacidad antivírica y antibacteriana gracias a su acción neutralizante, que bloquea los diferentes epítomos patogénicos impidiendo el acceso e invasión del microorganismo a través de las mucosas. Este supone su principal mecanismo efector y de esta forma ejerce una acción local de protección.

D) INMUNOGLOBULINA D

Se desconoce la función de esta inmunoglobulina aunque se sabe que está presente en la superficie de linfocitos maduros “naive”. Se considera prácticamente indetectable ya que constituye el 0,001% de las inmunoglobulinas totales en suero. Parece que forma parte de la inmunidad presente en mucosas, sobre todo a nivel del tracto respiratorio donde se une a ciertas bacterias y virus.

E) INMUNOGLOBULINA E

Es la de menor concentración y vida media. Se une a los receptores específicos de mastocitos, basófilos y eosinófilos, y es responsable de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (procesos alérgicos, shock anafiláctico, etc.). La IL-4 producida por los linfocitos Th2 estimula la producción de IgE por los linfocitos B.

Las principales propiedades y funciones de las inmunoglobulinas quedan resumidas a continuación (Tabla 1).

	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
<b>Estructura (n monómeros)</b>	1	5	1 o 2	1	1
<b>Peso molecular (kDa)</b>	150	900	160-380	180	280
<b>Nivel sérico (mg/dl)</b>	1150	130	220	3	0,03
<b>Nivel sérico (%)</b>	70-75	5-10	10-15	<1%	<1%
<b>Vida media (días)</b>	21	10	6	3	2
<b>Dominios CH</b>	3	4	3	3	4
<b>Fijación Complemento</b>	+	+	-	-	-
<b>Transferencia placentaria</b>	+	-	-	-	-
<b>Opsonización</b>	+	-	-	-	-
<b>Presencia en LCR</b>	+	-	+	-	-
<b>Sensibilización cutánea</b>	+	-	-	-	+
<b>Secreción mucosa</b>	-	-	+	-	-
<b>Síntesis fetal</b>	-	+	-	-	-

**Tabla 1:** Principales propiedades de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

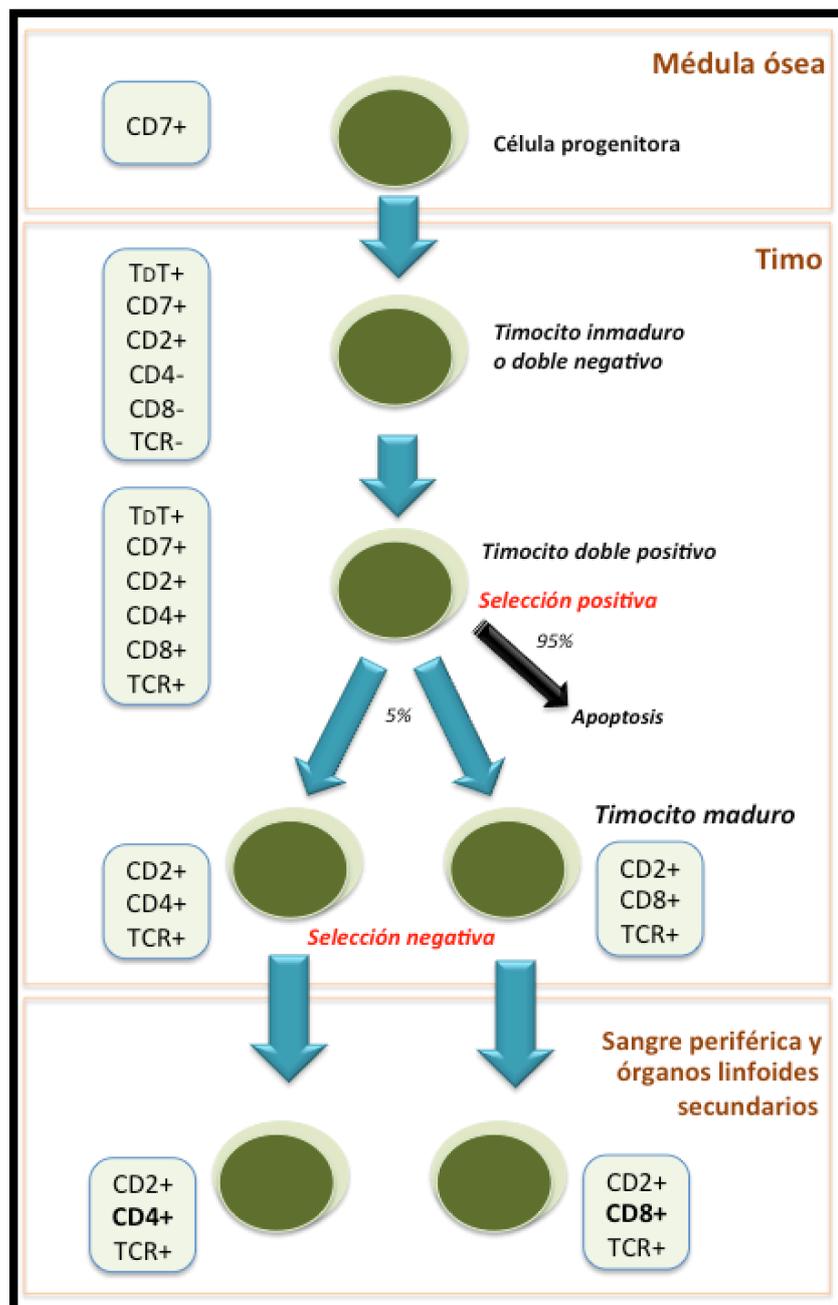
### III. Linfocitos T

Son las principales células mediadoras de la inmunidad adaptativa de tipo celular, y constituyen aproximadamente el 80% de los linfocitos totales. Son las encargadas de la defensa inmunológica frente a células neoplásicas, células infectadas por microorganismos intracelulares (virus, micobacterias, hongos, etc.) y están presentes en el rechazo de trasplantes.

#### ONTOGENIA:

Las células progenitoras de los linfocitos T (CD7+) provienen de la médula ósea y es en el timo donde se produce la maduración. En primer lugar tenemos una célula denominada *timocito inmaduro* (o *timocito doble negativo*). Esta célula presenta el marcador universal de linfocitos T (CD2) y el enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) implicada en reordenamientos genómicos, pero no tiene ninguno de los marcadores diferenciadores (ni CD4

ni CD8). En el segundo estadio madurativo, *timocito doble positivo*, expresan tanto CD4 como CD8, pero el 95% de ellos mueren por apoptosis debido a que no son capaces de reconocer MHC propias (proceso de selección positiva). El 5% restante se diferencia a *timocito maduro* expresando CD4 o CD8. A continuación, se produce un proceso de selección negativa donde adquieren la capacidad de autotolerancia, es decir la falta de respuesta frente a antígenos propios. En cambio, aquellos linfocitos no autotolerantes son eliminados. Por último, los linfocitos maduros se liberan a circulación sanguínea y se depositan en los órganos linfoides secundarios (Figura 5).

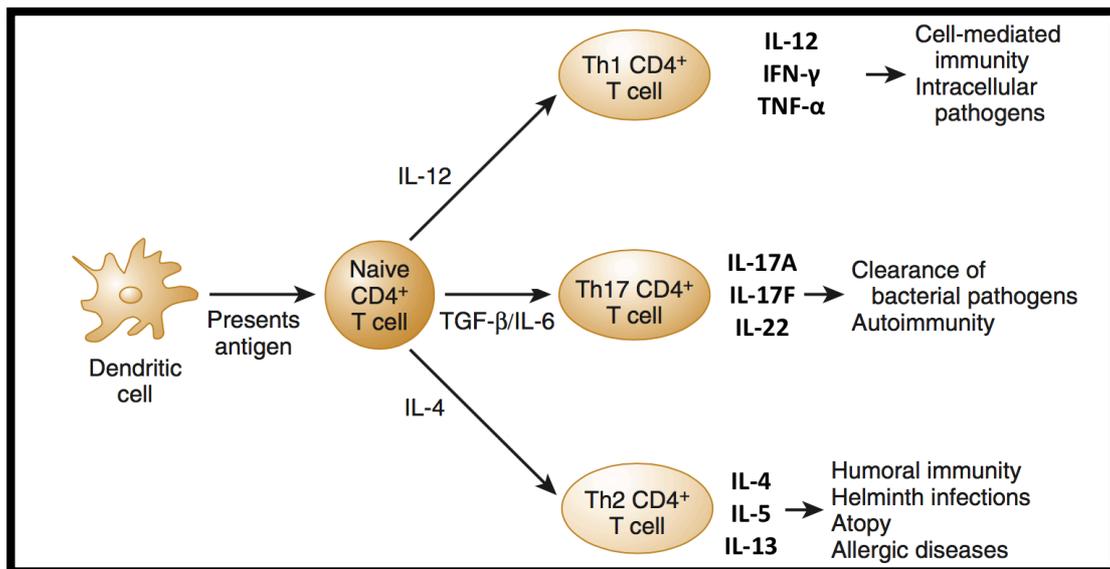


**Figura 5:** Proceso de maduración y proliferación de linfocitos T.

## SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

**Población CD4:** Son los mayoritarios en la población de linfocitos T representando aproximadamente el doble que los CD8. Su ligando natural es el MHC-II, y por tanto es indispensable la presentación de antígeno a través de este complejo para su actuación. Se denominan Th0 vírgenes o timocitos Th0 a aquellos que no han participado en ningún proceso celular y pueden evolucionar hacia Th1 o Th2 en función del proceso fisiopatológico que se esté desarrollando. Así, los Th1 se expanden estimulados por la IL-12, citoquina proinflamatoria producida durante la respuesta inmune innata ante el reconocimiento y procesamiento de patógenos intracelulares o células tumorales que van a desencadenar una respuesta inmune adaptativa de tipo celular. Los Th1 producen principalmente IL-2 e IFN- $\gamma$  que activan macrófagos y células NK, células fundamentales para el desarrollo de este tipo de respuesta. En cambio, los Th2 son los denominados *helper* ya que cooperan junto a los linfocitos B en el desarrollo de la respuesta adaptativa de tipo humoral. Los Th2 producen varios tipos de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) participando en la activación y diferenciación de linfocitos B.

Existe otra subpoblación de linfocitos T que no puede incluirse ni en Th1 ni Th2. Se trata de una tercera subpoblación de linfocitos T que se desarrollan a partir del mismo progenitor que los Th1 y Th2 (timocito Th0), y se denominan linfocitos T CD4 Th17. Su diferenciación es consecuencia de la producción de TGF- $\beta$  e IL-6, y de la expresión del receptor nuclear para ácido retinoico (RAR), que es un factor determinante en la diferenciación de los CD4 Th17. Se trata de células que participan en la transición entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Son capaces de producir IL-17A, IL-17F e IL-22, mediadores que participan en el aclaramiento bacteriano y en el desarrollo de procesos autoinmunes (14) (Figura 6).



**Figura 6:** Activación y respuesta de linfocitos T CD4. Modificada de (15).

**Población CD8:** Se unen a MHC-I (presente en todas las células nucleadas) y pueden ser de dos tipos: citotóxicas (participan en la citotoxicidad celular junto con macrófagos y células NK), y supresoras o reguladoras (responsables de la eliminación de células T no autotolerantes que escaparon del proceso de selección negativa en el timo). Habitualmente, se encuentran inactivos en forma de pre-CTL (*“pre- cytotoxic T cells”*) y se activan tras la estimulación por la IL-2 producida por los Th1. Para el completo desarrollo de la respuesta T citotóxica son necesarios los linfocitos Th1.

#### RECEPTOR Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LINFOCITO T:

Los principales marcadores de células T son los siguientes:

1. CD2: Junto con el LFA-1 (*“lymphocyte function antigen-1”*) son las moléculas de adhesión que contribuyen a potenciar la afinidad entre el linfocito T y la CPA. Estos marcadores se unen a sus respectivos ligandos, LFA-3 (también conocido como CD58) para CD2, e ICAM-1 (*“intercellular adhesion molecule”*, también conocido como CD54) para LFA-I.

2. CD3: Marcador universal de linfocito T maduro. Forma parte del TCR (*“T cell receptor”*).

3. CD4 y CD8: Estructuralmente son glicoproteínas que constituyen los principales marcadores de las subpoblaciones de linfocitos T.

4. CD28: Glicoproteína presente en todos los linfocitos T CD4 pero solo en algunos CD8. Se une a sus receptores en la CPA (CD80 y CD86, pertenecientes a la familia B7) participando en la adhesión celular. A su vez, actúa como segunda señal de activación de

células T para la correcta eliminación del antígeno. La primera señal la generan CD3/TCR y Ag/MHC-II.

El complejo TCR está formado por el TCR propiamente dicho, y CD3. Se encarga del reconocimiento antigénico y es fundamental en el proceso madurativo del linfocito T, siendo esencial para la selección positiva y negativa intratímica de los linfocitos funcionales.

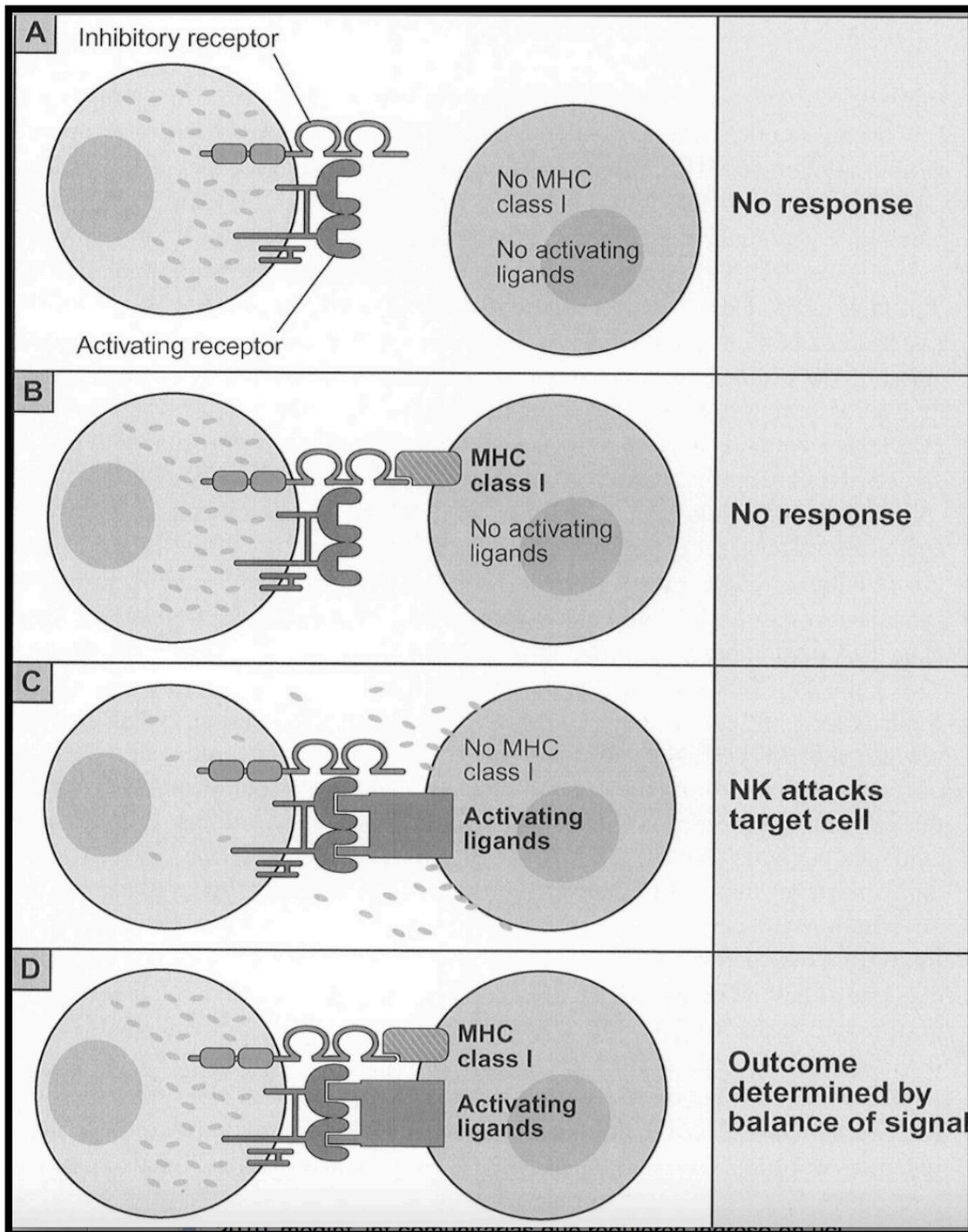
#### **IV. Células NK**

Constituyen el 5% de la población linfocitaria. Son grandes y presentan abundantes gránulos citoplasmáticos. No presentan receptores típicos de linfocitos T o linfocitos B. Presenta CD2 (como linfocitos T) y sus propios receptores específicos como CD16 y CD56. Participan tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa contribuyendo a la eliminación de células infectadas por patógenos, y fundamentalmente su actividad radica en evitar la expansión de células tumorales.

Las células NK son capaces de distinguir entre células normales (sanas, o propias) de las extrañas o ajenas, y contienen múltiples receptores que van a permitir su activación, proliferación y función efectora. Su principal función es citolítica o citotóxica, y a diferencia de los linfocitos T, no requieren de la presentación de antígeno. La citotoxicidad puede producirse de forma natural o directa, o dependiente de anticuerpo.

En la citolisis directa, las células NK reconocen determinados “receptores activadores” en la célula diana que activan la citolisis. Las células NK reconocen las moléculas de MHC-I propias a través de receptores específicos de la superfamilia de las inmunoglobulinas ya sea de tipo KIR (“*killer cell Ig-like receptors*”) o ILT (“*immunoglobulin like transcripts*”), y por tanto la no expresión de las mismas hace que se induzca la lisis mediada por NK (tal y como se produce con las células tumorales). Por tanto, la no expresión de MHC-I y la presencia de receptores activadores es el mecanismo más frecuente de actuación de la célula NK (16) (Figura 7).

En la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, la Fc de la IgG es reconocida por su receptor correspondiente en la superficie de la célula NK y se activa la cascada de señalización que finalmente da lugar a la lisis de la célula diana.



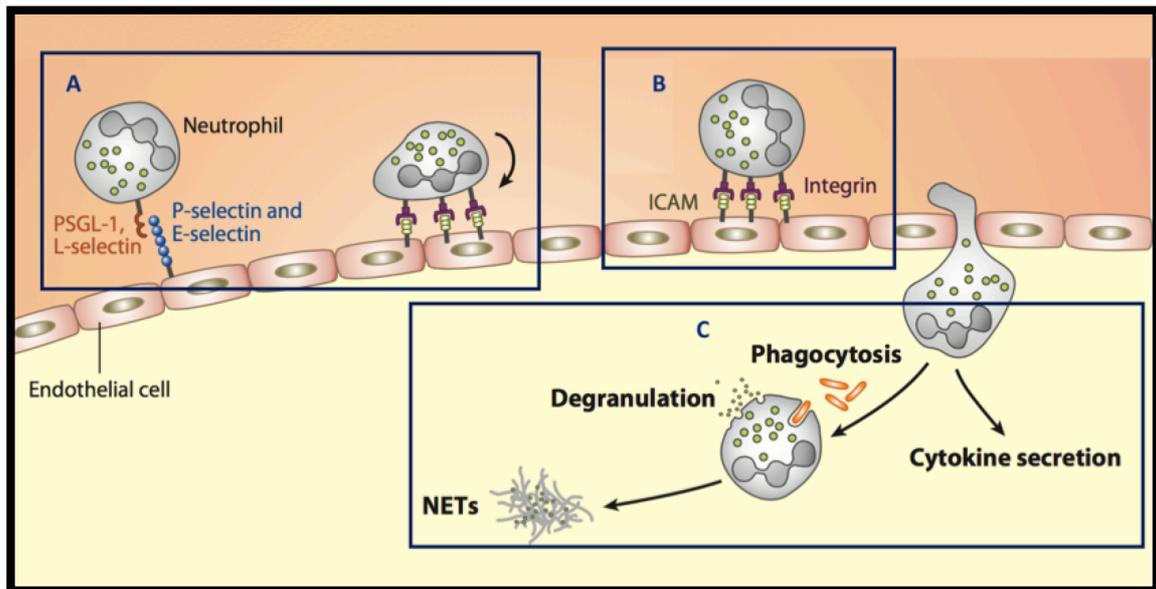
**Figura 7:** Función citolítica de células NK: A) La célula diana carece de receptores activadores y MHC-I por tanto, no hay respuesta por parte de las células NK; B) célula propia con MHC-I, no hay respuesta NK; C) la presencia de receptores activadores y la ausencia de MHC-I activa la citotoxicidad mediada por NK; D) por último, la presencia concomitante de receptores activadores y MHC-I genera una respuesta modulada cuya respuesta final vendrá determinada por la intensidad de ambas señales. Adaptada de (16).

A parte de la citotoxicidad celular, las células NK tienen función secretora y se encargan de producir citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-3, IFN- $\gamma$ , o quimiocinas como MIP (“*macrophage inflammatory protein*”) y RANTES (“*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*”), ambas con propiedades quimioatrayentes.

La regulación de las células NK viene determinada por el ambiente citoquínico que las rodea, y la interacción con otras células inmunológicas como macrófagos, linfocitos T o células dendríticas que van a tener un papel fundamental para su activación y proliferación. De esta manera, la secreción de IL-12, IL-18, IL-15 e IFN- $\alpha$  suponen potentes activadores de este tipo celular. Se ha visto que tienen un importante papel en el control inicial de la infección; los mayores estudios se centran en modelos de infección viral donde ha quedado evidenciado que la depleción de este tipo celular acelera la replicación viral. Sin embargo, hay otros estudios basados en modelos de sepsis bacteriana por *Streptococcus pneumoniae* o *Escherichia coli* donde la presencia excesiva de células NK parece ser negativo, evidenciándose respuestas inflamatorias exacerbadas, probablemente debido a un mal control inmunológico de la infección (17).

#### **V. Neutrófilos**

Constituyen el 60% del total de leucocitos siendo la célula blanca más abundante. Tienen el núcleo multilobulado por lo que también se les denomina granulocitos o polimorfonucleados. Su vida media es corta permaneciendo en circulación entre 6 y 8 horas. Su papel es clave en la respuesta inmune innata para el control de la infección. El mecanismo de acción de los neutrófilos se resume de forma esquemática en: atracción y activación celular, adhesión al epitelio, internalización y focalización en tejido dañado, y mecanismos de eliminación del patógeno (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema de actuación de neutrófilos en el proceso inflamatorio. A) Atracción y activación del neutrófilo hasta alcanzar el tejido inflamado, B) adhesión al epitelio e internalización celular, y C) mecanismos microbicidas por parte del neutrófilo. Modificada de (18).

La presencia de estimuladores inflamatorios como la endotoxina bacteriana (o LPS) promueve un ambiente citoquínico proinflamatorio que favorece la activación de células endoteliales aumentando la producción de integrinas y selectinas, moléculas de adhesión leucocitaria. Estas moléculas forman parte de la membrana de diferentes tipos celulares y van a permitir: la migración leucocitaria del torrente sanguíneo al tejido extravascular inflamado, la interacción linfocito T con CPA, y la recirculación de las células a través del torrente sanguíneo, circulación linfática y órganos linfoides. La activación de los neutrófilos se produce a través de dos receptores para estas moléculas de adhesión (PSGL-1, “*P-selectin glycoprotein ligand-1*”; y L-selectina) y su interacción va a desencadenar una cascada de señalización intracelular a través de procesos bioquímicos permitiendo a la célula alcanzar el tejido dañado. El proceso de activación se completa tras el reconocimiento de PAMPs (“*pathogen-associated molecular patterns*”) presentes en microorganismos, a través de los TLR (“*toll like receptors*”), receptores de manosa, receptores de glucano o receptores depuradores (o “*Scavenger*”). Los TLR destacan por reconocer e inducir el inicio de la respuesta inflamatoria. Algunos de estos receptores reconocen diversos componentes microbianos como el LPS (TLR4), lipopéptidos bacterianos (TLR2), flagelina (TLR5), o ADN (TLR9). Poseen otros múltiples receptores en su superficie entre los que se encuentran receptores para la IgG y el complemento para llevar a cabo su acción microbicida.

Por tanto, la acción del neutrófilo para la eliminación del patógeno se basa fundamentalmente en la degranulación y secreción de proteínas con actividad antimicrobiana (Tabla 2), producción de especies reactivas de oxígeno, generación de NETs (“*neutrophil extracellular traps*”) y fagocitosis (18).

PÉPTIDO ANTIMICROBIANO	MECANISMO DE ACCIÓN
<b>PÉPTIDOS CATIÓNICOS</b>	
$\alpha$ -defensinas (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Altera la permeabilidad de la membrana.</li> <li>▪ Bloquea ADN, ARN y síntesis proteica.</li> <li>▪ Bloquea síntesis pared celular.</li> </ul>
LL-37 (Catelicidina)	Generación de poros transmembrana.
BPI ( <i>Bactericidal/Permeability increasing protein</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aumenta permeabilidad membrana bacteriana.</li> <li>▪ Unión al LPS e hidrólisis de fosfolípidos de membrana.</li> </ul>
Histonas	Mecanismo desconocido.
<b>ENZIMAS PROTEOLÍTICAS</b>	
Lisozima	Degrada pared bacteriana.
Proteinasa 3 (PR3)	Acción proteolítica sobre membrana bacteriana.
Elastasa del neutrófilo (NE); Cathepsina G (CG)	Degradación de membrana y factores de virulencia bacterianos (19)(20).
Azurocidina	Atracción y activación de macrófagos y monocitos. Activa fagocitosis. Unión a lípido A (LPS) (21).
<b>PROTEÍNAS QUELANTES DE METALES</b>	
Lactoferrina	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Captura de metales impidiendo el crecimiento bacteriano.</li> <li>▪ Se une al lípido A (LPS) permitiendo su liberación al medio y aumentando la permeabilidad de membrana.</li> </ul>
Calprotectina	Altera crecimiento bacteriano mediante quelación del Mn y Zn.

**Tabla 2:** Principales péptidos con acción antimicrobiana presentes en los gránulos de los neutrófilos. Modificada de (18).

Las NETs son redes formadas por ADN y proteínas de los gránulos presentes en los neutrófilos que actúan simulando una trampa para los microorganismos, uniéndose a ellos y permitiendo exponer dichos antígenos a la respuesta inmunitaria.

Por último, la fagocitosis es el proceso clave para la eliminación del microorganismo. El reconocimiento del patógeno se produce o bien de forma directa mediante la interacción con los PAMPs, o de forma indirecta mediada por opsoninas (a través de FcR o receptores del complemento). A continuación, se produce la internalización del microorganismo en una

vacuola denominada fagosoma, y posteriormente, se produce la degradación mediante procesos bioquímicos y enzimáticos (22).

## VI. Monocitos y macrófagos

Se trata de células mononucleadas de gran tamaño, su vida media es ligeramente superior a la del neutrófilo y su desarrollo tiene lugar en la médula ósea. Las células liberadas al torrente circulatorio se denominan monocitos. Su distribución a los diferentes tejidos y su diferenciación da lugar a células especializadas denominadas macrófagos o histiocitos. Recientemente, se ha establecido que los monocitos son precursores de células dendríticas, las cuales juegan un papel imprescindible en la respuesta inmune innata al tratarse de células presentadoras de antígeno que van a permitir, entre otras cosas, la activación de linfocitos T para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Existen dos vías de activación de macrófagos: la primera se conoce como vía clásica y se desarrolla a través de la interacción de sus TLR con antígenos, o de citoquinas como IFN- $\gamma$  con sus correspondientes receptores que promueven el proceso inflamatorio y la fagocitosis. A estos macrófagos se les conoce como M1. La segunda vía se conoce como vía alternativa y se activa por interleucinas como la IL-4 e IL-13 en ausencia de potentes señales TLR. Estos macrófagos se denominan M2 y se encargan de la reparación tisular. Los monocitos comparten bastantes características estructurales y funcionales con los neutrófilos aunque varían en función del estado de diferenciación. Los monocitos contienen gránulos con múltiples enzimas en su interior similares al neutrófilos (proteasas, peroxidasas y lipasas).

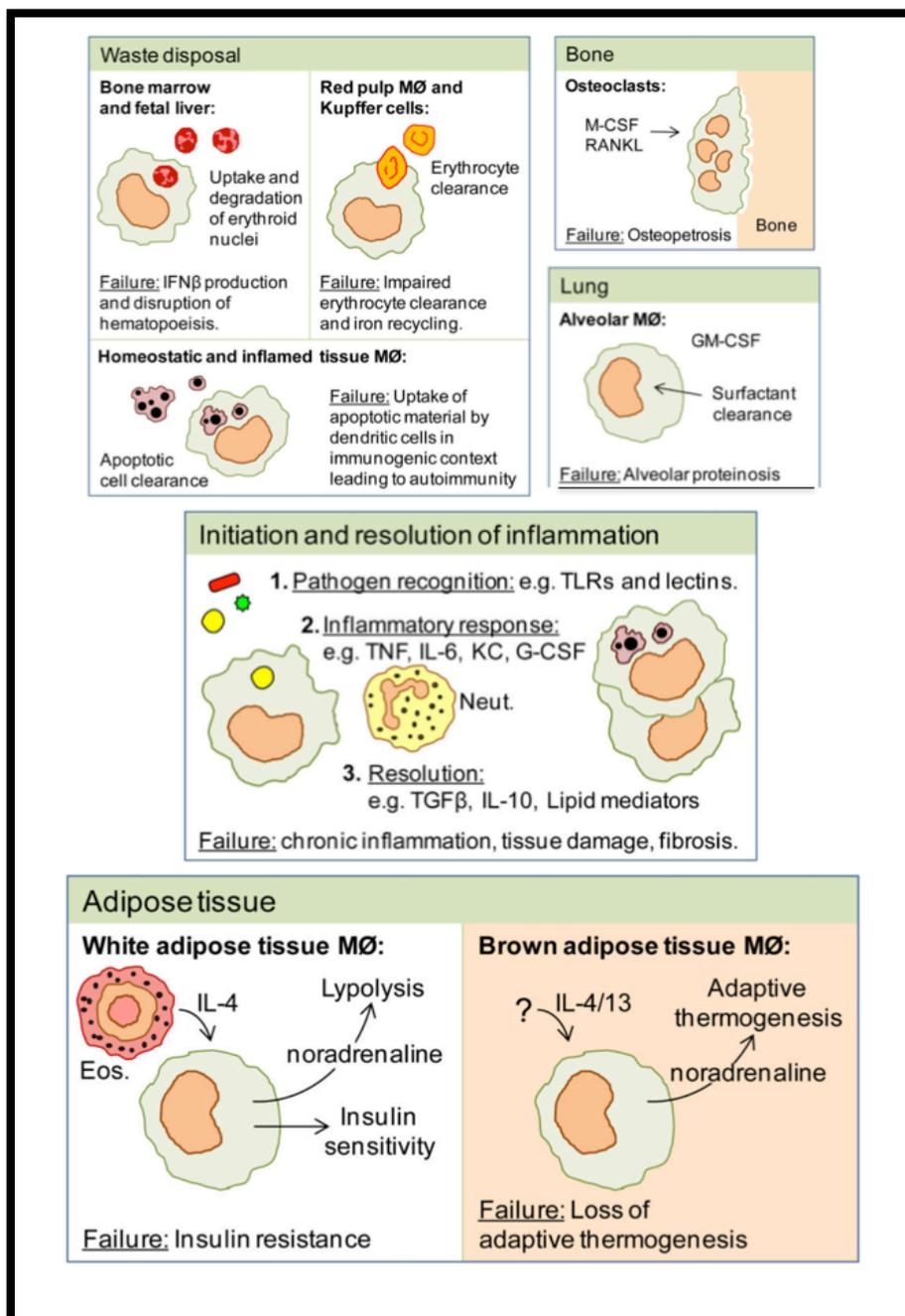
Los principales receptores presentes en macrófagos son:

1. Receptores “*Scavenger*” o TLR para el reconocimiento de PAMPs.
2. Receptores para la Fc de IgG (Fc $\gamma$ R1 o CD64), que a diferencia de los neutrófilos que solo lo expresan ante un estímulo inflamatorio, este receptor se encuentra de forma constitutiva en la superficie del macrófago.
3. Receptor para la fracción del complemento C3b (CR1 o CD35) necesarios para endocitar antígenos opsonizados.
4. MHC-II y molécula B7 (CD80) para la presentación antigénica.

Existen otros receptores en función de las subpoblaciones de macrófagos en los diferentes tejidos.

Entre sus principales funciones, los monocitos y macrófagos se caracterizan por ser células presentadoras de antígeno, ser células fagocíticas e inmunomoduladoras. También son

capaces de producir gran cantidad de citoquinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 o IL-12, y óxido nítrico, importante para la acción microbicida que ejercen durante la fagocitosis (23). Los *macrófagos tejido específicos* desarrollan múltiples actividades en función del lugar donde se encuentren. De esta manera, participan en procesos de arterioesclerosis y metabolismo lipídico, regulación de insulina, hemocátéresis, degradación de células apoptóticas o surfactante pulmonar como se muestra en la figura 9 (24).



**Figura 9:** Funciones de los macrófagos residentes en los tejidos especializados, y consecuencias del fallo en su actividad. Modificada de (24).

## VII. Eosinófilos

Constituyen el 3% del total de leucocitos en sangre. Los eosinófilos participan en procesos inflamatorios bien sea en respuesta a un microorganismo patógeno (parásito, virus o bacteria), respuesta ante un daño tisular, inmunidad frente a tumores, o en procesos alérgicos. Son capaces de secretar gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, y TGF $\alpha$ - $\beta$ ; quimiocinas como RANTES o eotaxina-1; factores activadores de plaquetas (PAF), y leucotrienos como C4. Todos estos mediadores participan en el proceso inflamatorio aumentando la permeabilidad vascular y las secreciones en mucosas.

Los principales receptores de los eosinófilos se agrupan en varios grupos: moléculas de adhesión, complemento, citoquinas e inmunoglobulinas.

1. Moléculas de adhesión. Para que los eosinófilos alcancen el lugar de acción primero deben ser atraídos y fijados al endotelio, proceso regulado fundamentalmente por moléculas de adhesión. Para ello, estas células cuentan con L-Selectina (CD62L) cuyos ligandos son CD34 y MAdCAM-1 que se encuentran en el endotelio vascular, P-Selectina (CD162 o PSGL1) y CD15s. La interacción específica entre estas moléculas y sus receptores endoteliales (VCAM-1, MAdCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, y fibrinógeno) facilitan el acceso de los eosinófilos al tejido dañado.

2. Receptores para el complemento. Se incluyen dentro de este grupo receptores para C3a y C5a, CR1 (o CD35 que es reconocido por C3b, C4b, iC3b, y C1q), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c) y CD103. CR3 interacciona con iC3b e ICAM-1, que permiten la activación y degranulación de los eosinófilos.

3. Receptores de citoquinas. La regulación del desarrollo de los eosinófilos viene determinada fundamentalmente por el estímulo de IL-3, IL-5 y GM-CSF (*“granulocyte macrophage colony stimulating factor”*) para los cuales la superficie celular expresa los receptores correspondientes.

4. Receptores para inmunoglobulinas. Expresan FcR para IgA, IgD, IgG, e IgM.

5. Otros: Receptores inhibitorios y de tipo TLR.

La figura 10 muestra una caracterización más específica de los receptores y moléculas que forman la estructura del eosinófilo.

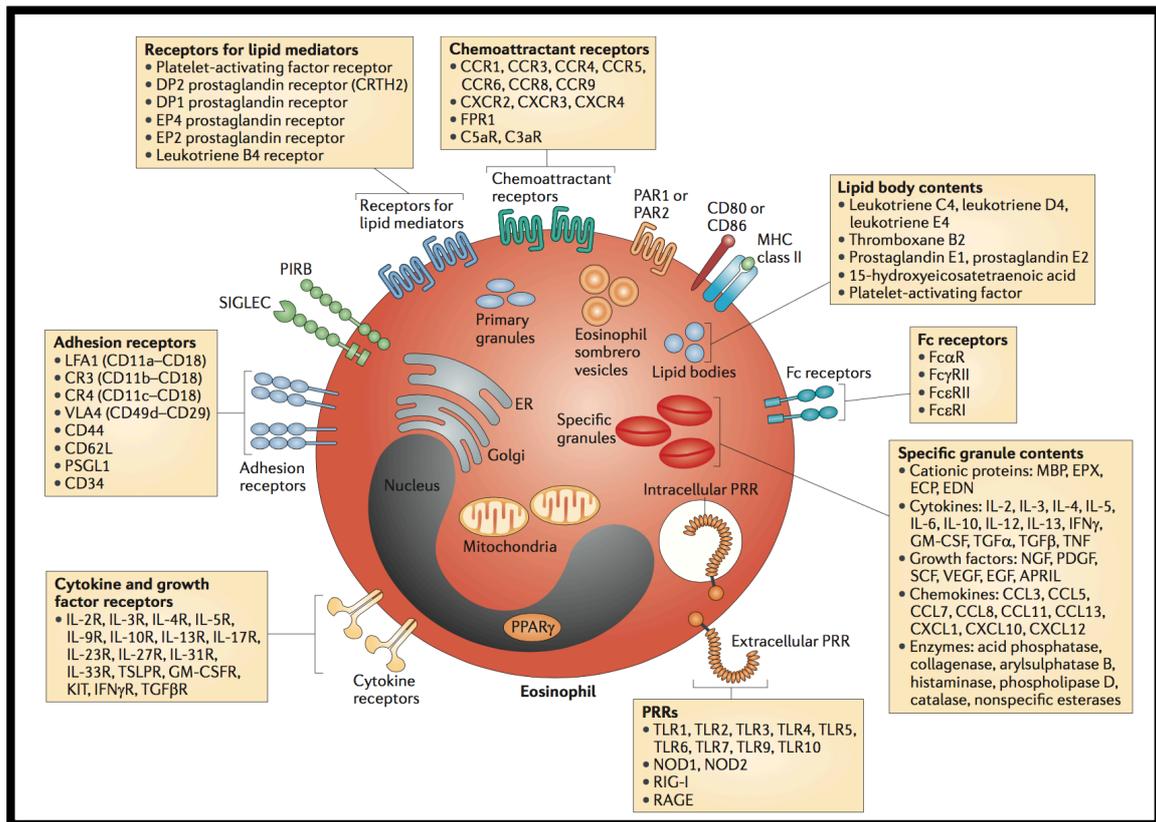


Figura 10: Principales características celulares de los eosinófilos. Adaptada de (25).

En el interior celular se encuentran unos gránulos y vesículas secretoras que contienen múltiples proteínas, fundamentales para el desarrollo de sus funciones (26). Las más importantes son:

**Proteína básica mayor (MBP):** MBP se expresa en dos formas diferentes (MBP1 y MBP2). MBP1 también podemos encontrarla en basófilos aunque en mucha menor cantidad. Esta proteína es tóxica para ciertas parasitosis como los esquistosomiasis producidas por *Schistosoma mansoni*, y tiene propiedades antibacterianas. A nivel respiratorio, causa citotoxicidad en el epitelio y broncoconstricción. Es activadora de plaquetas y del complemento tanto por vía clásica como alternativa.

**Peroxidasa del eosinófilo (EPO):** EPO presenta una similitud genética del 68% con la mieloperoxidasa del neutrófilo. Su principal función es la destrucción bacteriana. A su vez, presenta actividad ribonucleasa, toxicidad frente a helmintos, induce el fenómeno de Gordon (neurotoxicidad caracterizada por ataxia, parálisis y rigidez) y favorece la degranulación de mastocitos.

**Proteína catiónica del eosinófilo (ECP):** Se trata de una ribonucleasa (RNasa) presente en dos isoformas (ECP-1 y ECP-2). Tiene propiedades bactericidas, favorece la degranulación

de mastocitos, y presenta ligera acción antiparasitaria frente a helmintos. Induce el fenómeno de Gordon y tiene acción antiviral en infecciones respiratorias. Su mecanismo de acción se basa en la formación de poros en sus dianas (27).

**Neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN):** Actividad ribonucleasa (más potente que EPO). Entre sus funciones destaca su actividad bactericida provocando la lisis de la membrana bacteriana. Provoca daño tisular oxidativo y actúa como mutágeno a nivel de ADN y ARN. Es capaz de alterar la barrera epitelial respiratoria y el tejido conectivo debido a su capacidad de generar ácidos hipohalogenados.

Existen otras múltiples enzimas que se han detectado en el interior de estas vesículas secretoras como colagenasa, histaminasa, arilsulfatasa B, catalasas, esterasas, proteína de unión a vitamina B12, etc. Es de especial interés la galectina-10, más conocida como "*Charlot Leyden Crystal*" (CLC), que se detectó por primera vez en 1853 en elevada concentración en muestras respiratorias y fecales de pacientes con cuadros respiratorios y gastrointestinales graves con eosinofilia. Actualmente, no está bien definida su función y su implicación patológica aunque parece estar relacionada con la supresión de la proliferación de linfocitos T (28).

### VIII. Basófilos

Constituyen únicamente el 1% de los leucocitos totales. Fueron descubiertos hace más de 130 años por Paul Ehrlich pero se sabe muy poco acerca de sus funciones, mecanismos de acción e implicación patológica. Participan fundamentalmente en reacciones de hipersensibilidad, donde su FcR interacciona con la IgE produciéndose su degranulación y liberación al exterior de los gránulos de histamina, serotonina y heparina que contienen. Secretan IL-4 participando en la estimulación y diferenciación de linfocitos T CD4 a Th2. Forman parte de la respuesta inflamatoria en procesos alérgicos a nivel de piel y epitelio respiratorio, y en la respuesta antiparasitaria en piel y tracto gastrointestinal (29).

### IX. Citocinas y otros mediadores

Se trata de sustancias de naturaleza proteica, de bajo peso molecular y generalmente glicosiladas encargadas de regular y modular la comunicación intercelular. Se denominan según su origen o función. De esta manera, existen linfocinas, monocinas, interleucinas, quimiocinas, interferones o factores estimuladores del crecimiento de colonias, entre otros. De forma general se les denomina citoquinas o interleuquinas ya que toda célula nucleada es capaz de sintetizarlas. Se caracterizan por ser pleiotrópicas (pueden ejercer más de una acción sobre diferentes tipos celulares), y redundantes (distintas citoquinas pueden generar acciones

parecidas). Pueden ejercer su acción sobre la misma célula que las produce, células inmediatamente próximas, o diseminarse a otras localizaciones para ejercer su acción. Se producen y liberan como consecuencia de diferentes estímulos (patógenos, toxinas, etc.) fundamentalmente por macrófagos y linfocitos. Las citocinas se unen a receptores celulares desencadenando una cascada de señalización celular a través de la cual se produce la fosforilación de determinadas proteínas, que van a regular de manera positiva o negativa la activación de la transcripción génica cuyos productos finales ejercerán el efecto biológico correspondiente, ya sea estimulando o suprimiendo la producción de citoquinas, o aumentando el número de receptores superficiales. En esencia, las citoquinas son reguladores de la respuesta inmune del hospedador y destacan por ejercer una acción inflamatoria o antiinflamatoria (30)(31).

**PRINCIPALES CITOCINAS PROINFLAMATORIAS:**

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral de tipo  $\alpha$  producido por macrófagos y células NK. Constituye uno de los principales mediadores en la respuesta inflamatoria aguda. Induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por parte del endotelio vascular favoreciendo la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos. Induce fiebre, participa en la citotoxicidad de células tumorales y estimula el crecimiento de fibroblastos.

**IL-1:** Producida por monocitos y macrófagos es una de las principales citocinas que intervienen en la respuesta inmunitaria innata. Junto con TNF- $\alpha$ , actúa como pirógeno endógeno produciendo fiebre y ejerce su efecto proinflamatorio induciendo la liberación de histamina que aumenta la vasodilatación y permeabilidad vascular. Promueve la síntesis de proteínas en fase aguda por los hepatocitos y actúa a nivel del sistema nervioso central produciendo sueño y anorexia.

**IL-6:** Es producida por monocitos, macrófagos y linfocitos T. Promueve la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas para la producción de anticuerpos. Promueve la síntesis de proteínas en fase aguda participando de forma activa en la respuesta innata.

**IFN- $\gamma$ :** Producido por linfocitos T CD4 Th1 y células NK. Ejerce su efecto proinflamatorio aumentando la expresión en la superficie células de MHC-I y II facilitando la presentación de antígeno. Activa macrófagos y aumenta la actividad citolítica de células NK.

**PRINCIPALES CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS:**

**IL-4:** Producida por mastocitos, basófilos y linfocitos T CD4 Th2. Promueve la diferenciación de linfocitos Th0 a Th2, posee efectos inmunosupresores inhibiendo los mediadores inflamatorios liberados por macrófagos. Induce la expresión de IL-1Ra que va a bloquear la IL-1. Interviene en la respuesta inmune adaptativa de tipo humoral promoviendo la diferenciación de linfocitos B y el cambio de isotipo a IgE.

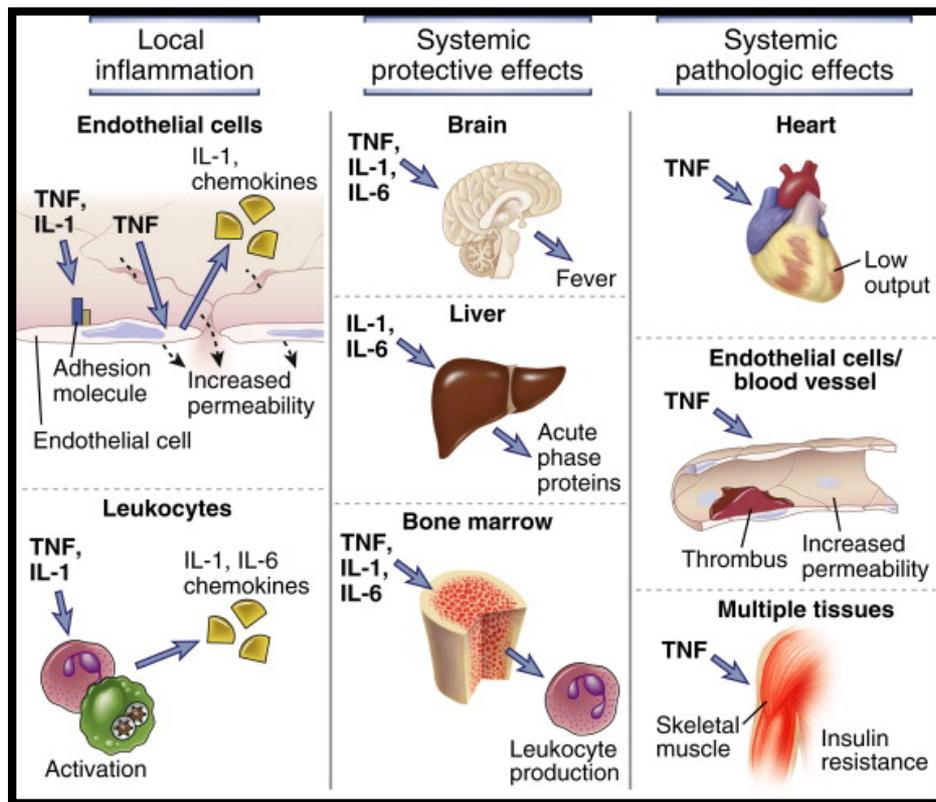
**IL-13:** Producida fundamentalmente por linfocitos T CD4 Th2. Carácter inmunosupresor. Presenta similitud estructural y funcional con IL-4. Junto con IL-2, modula la producción de IFN- $\gamma$  por parte de polimorfonucleares (32).

**IL-10:** Producida por monocitos, linfocitos B y linfocitos T CD4 Th2. Es la principal citocina inmunosupresora y actúa inhibiendo la síntesis de otras citocinas y moléculas de adhesión, e impidiendo la expresión de MHC-II. A su vez, tiene efectos inmunomoduladores regulando la síntesis de IgG por los linfocitos B o modulando la angiogénesis.

**TGF- $\beta$ :** Las plaquetas y linfocitos T son las principales células que lo producen. Tiene actividad inmunomoduladora e inmunosupresora.

**IFN tipo 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ :** Producido por leucocitos y fibroblastos respectivamente. Participan en la respuesta inmune innata y su principal actividad es antiviral e inmunomoduladora en procesos tumorales.

Esquemáticamente, las principales funciones de las citocinas pro y anti inflamatorias se resumen en la figura 11.



**Figura 11:** Funciones locales y sistémicas de las citoquinas durante el proceso inflamatorio.

Adaptada de (33).

**PRINCIPALES CITOCINAS IMPLICADAS EN LA HEMATOPOYESIS:**

**IL-3:** Producida principalmente por linfocitos T, células NK y mastocitos. Induce la proliferación de múltiples progenitores hematopoyéticos y es liberada en situaciones de gravedad donde es necesaria una respuesta rápida.

**IL-7:** Producida por células del estroma de la médula ósea y del timo. Estimula la maduración de linfocitos B y T.

Factores estimuladores de colonias (CSF) (Tabla 3):

NOMBRE	PRODUCIDO POR:	FUNCIÓN
GM-CSF	Linfocitos T	Estimula la proliferación de granulocitos y macrófagos.
G-CSF	Fibroblastos	Estimula la proliferación de granulocitos (el LPS bacteriano es un potente activador)
M-CSF	Monocitos/macrófagos	Desarrollo de células progenitoras de macrófagos.

**Tabla 3:** Principales factores estimuladores de colonias.

## MECANISMOS DE DEFENSA INESPECÍFICOS

### I. Barreras

Constituyen la primera línea de defensa frente a agentes patógenos. Las barreras naturales que limitan el acceso de microorganismos son de tres tipos: físicas, químicas y biológicas. La principal barrera física la constituye la piel compuesta por células epiteliales estrechamente unidas cubiertas por una capa de queratina, y que a parte de ejercer funciones reguladoras y sensitivas, se encarga de separar y proteger al organismo, junto con las mucosas, de la entrada de microorganismos patógenos. En cuanto a barreras químicas, el pH ácido del estómago o vagina, y las secreciones corporales como la saliva, el moco cervical, el líquido prostático o las lágrimas poseen sustancias con actividad antimicrobianas como la lisozima y la *N*-acetil-muramil-L-alanina amidasa (NAMLAA). Igualmente, las secreciones contienen inmunoglobulinas capaces de aglutinar microorganismos o bloquearlos impidiendo la unión a los receptores de las células del huésped. Por último, las barreras biológicas constituidas por la microbiota habitual de las principales vías de entrada ya sea la piel, la cavidad orofaríngea, o el tracto gastrointestinal impiden la proliferación de determinados microorganismos a través de diferentes mecanismos como son la competición por los nutrientes del medio, la competición por la unión a determinados receptores celulares (tropismo celular) o producción tanto de metabolitos tóxicos como sustancias antibióticas (bacteriocinas) que favorecen la eliminación del patógeno.

### II. Inmunidad innata

Se trata de la primera barrera inmunológica defensiva. Se produce de manera rápida, sin necesidad de previa sensibilización, y en ella participan neutrófilos, macrófagos y células NK fundamentalmente. Estos tipos celulares actúan favoreciendo el proceso inflamatorio, la fagocitosis y la citólisis del antígeno. En esta fase también están involucrados los reactantes en fase aguda y el sistema del complemento (Figura 12) (34)(35)(36).

Una vez que el patógeno ha alcanzado los tejidos, los macrófagos y células dendríticas tisulares activan la ***cascada inflamatoria*** mediante la secreción de diferentes citocinas, que atraen neutrófilos y monocitos al foco infeccioso, y factores estimulantes de colonias (GM-CSF y G-CSF) los cuales activan la proliferación y diferenciación de los precursores mieloides en la médula ósea. El sistema inmune innato es capaz de reconocer estructuras compartidas por diferentes clases de microorganismos y diferenciarlas de los antígenos propios. Estos antígenos que estimulan la respuesta inmunológica son los PAMPs, moléculas que forman parte del microorganismo y que son esenciales para su viabilidad e infectividad. Se trata de

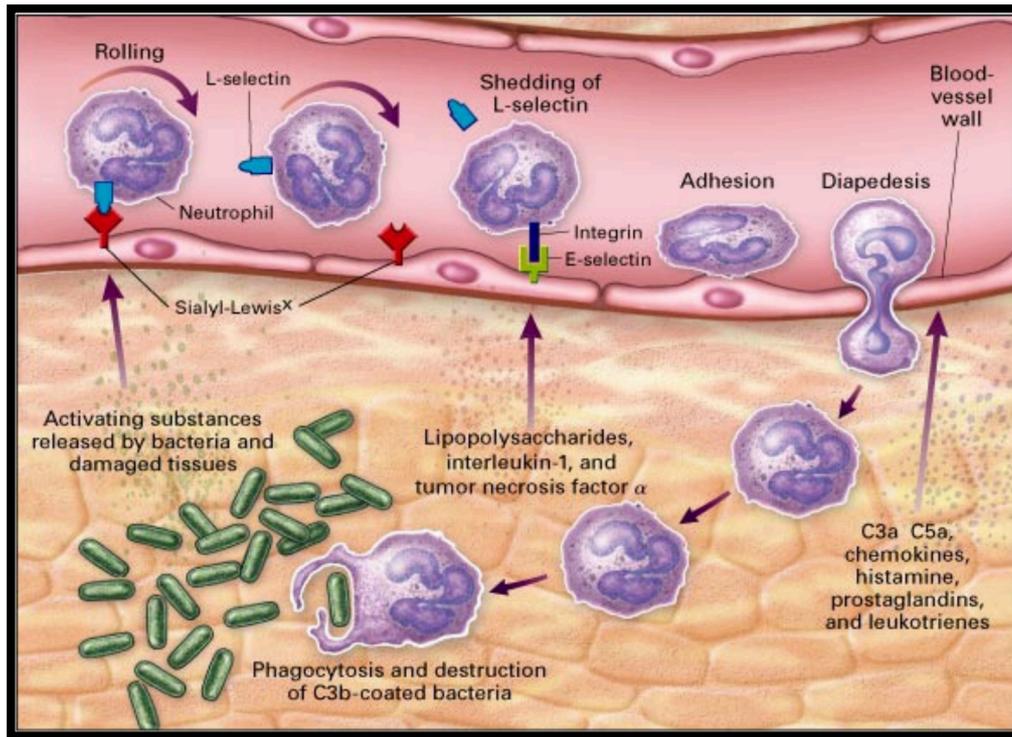
estructuras como el LPS bacteriano, residuos de manosa o glucano, entre otros. La respuesta inmune inespecífica a parte de reconocer y eliminar patógenos es capaz de reconocer células necróticas y estimular la reparación del tejido dañado. Para ello, las células involucradas en la respuesta innata son capaces de reconocer DAMPs (“*damage associated molecular patterns*”) liberadas tras la destrucción celular.

El **sistema del complemento** supone uno de los principales mecanismos efectores de la respuesta inespecífica potenciando la inflamación y fagocitosis. Existen dos vías principales de activación: la primera es la denominada *vía clásica del complemento* a través de inmunocomplejos formados por la unión de inmunoglobulinas a la superficie del antígeno. La segunda es la *vía alternativa* que se activa de forma espontánea o tras la unión de C3 a la superficies de ciertos microorganismos. Algunos autores hablan de una tercera vía denominada *vía de las lectinas* a través de la cual la proteína fijadora de manosa (MBP) se une a antígenos microbianos y activa el complemento de una manera similar a la vía clásica.

El sistema del complemento esta formado principalmente por enzimas proteolíticas cuya activación secuencial da lugar a una cascada de reacciones que en su fase final (fase lítica) forma un complejo de ataque a la membrana (CAM) capaz de generar poros en las membranas celulares alterando la permeabilidad y produciendo la lisis de la célula diana.

Otras muchas proteínas plasmáticas varían rápidamente su concentración en respuesta a un proceso infeccioso o daño tisular. Estas proteínas son conocidas como reactantes de fase aguda, y engloban principalmente proteínas del complemento, coagulación y fibrinógeno. La proteína C reactiva (PCR), el surfactante pulmonar o la procalcitonina (PCT) son algunos ejemplos de estas proteínas, utilizadas actualmente como marcadores inflamatorios y/o infecciosos en la practica clínica diaria.

Por último, la **fagocitosis** es el proceso encargado de la digestión y citolisis del antígeno. Las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) se unen al microorganismo a través de una serie de *receptores endocíticos* (receptores de manosa, glucano, *Scavenger*, etc.), *receptores de señalización* (TLR) o vía opsonización. Las partículas antigénicas son rodeadas por la membrana celular que se extiende e internaliza la partícula en forma de vesícula denominada fagosoma. A continuación, el fagosoma se fusiona con lisosomas que contienen productos con acción toxica y dan lugar a un fagolisosoma. Los productos lisosomales son especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y proteasas que ejercen un papel microbicida sin dañar la célula fagocítica.

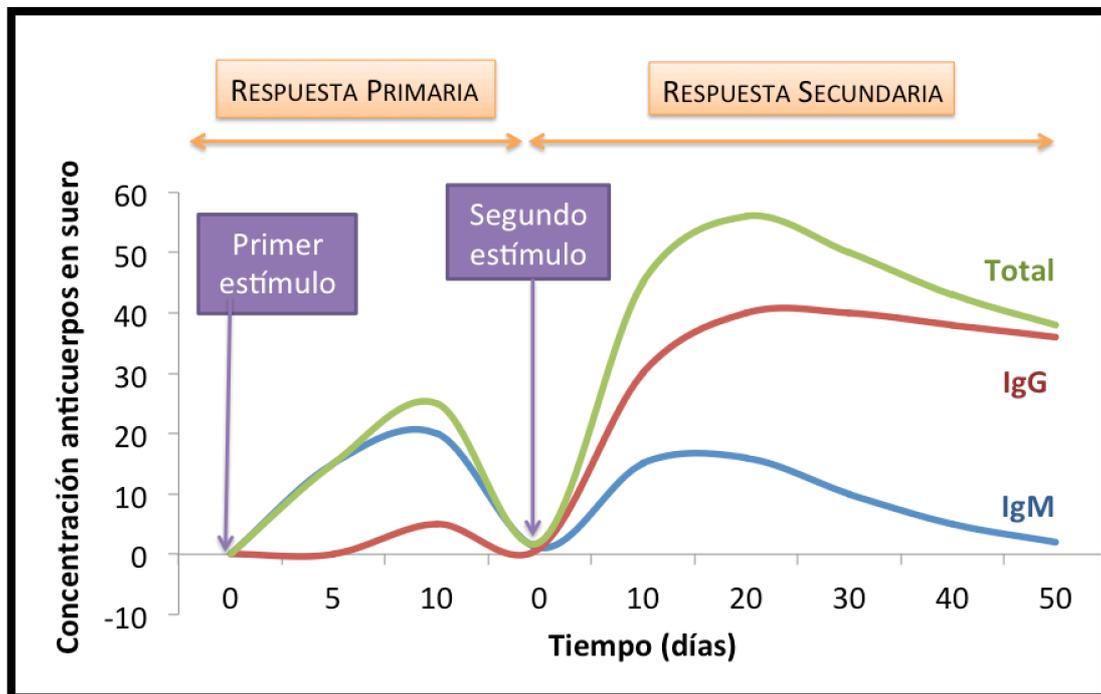


**Figura 12:** Respuesta inmune innata. Adaptado de (37).

**MECANISMOS DE DEFENSA ESPECÍFICOS**

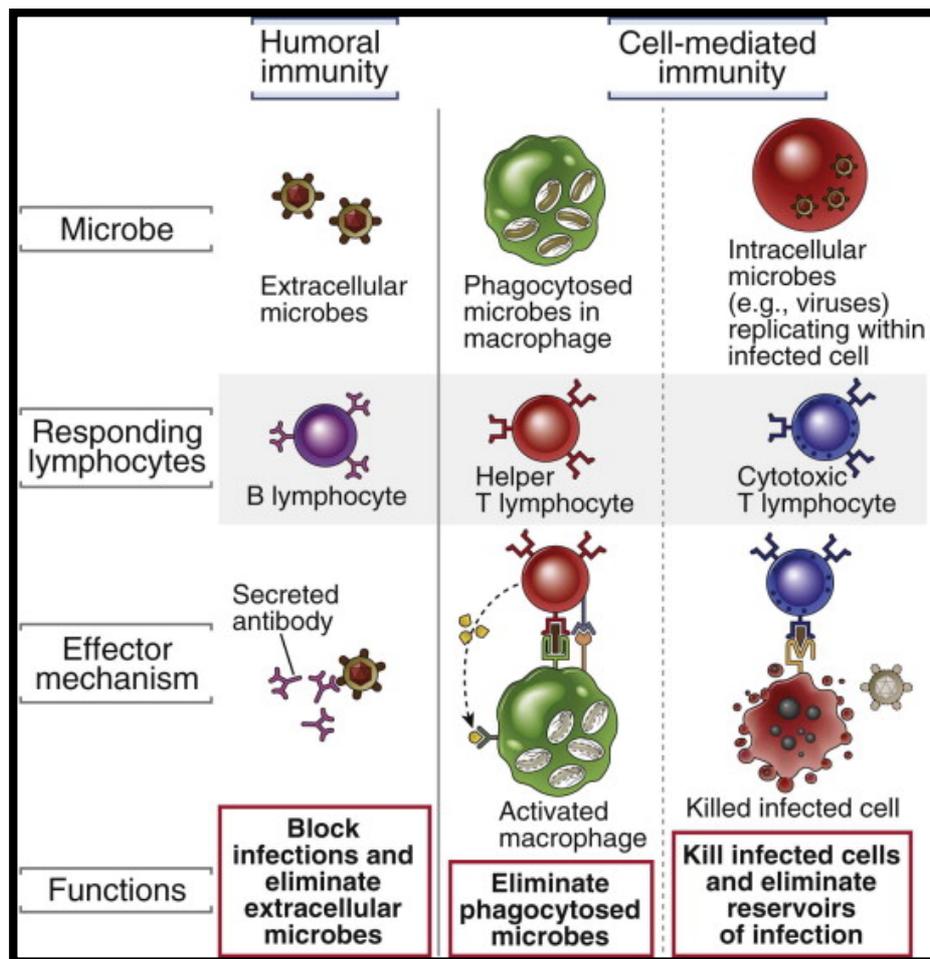
**I. Inmunidad adaptativa**

Cuando un antígeno se pone en contacto por primera vez con un individuo, se activan linfocitos B vírgenes que producen inmunoglobulinas de baja afinidad de tipo IgM (respuesta primaria). Si se vuelve a tener contacto con el mismo antígeno, el sistema inmune que ha sido previamente estimulado, comienza a producir inmunoglobulinas de alta afinidad, con predominio de IgG, facilitando la resolución del proceso infeccioso (respuesta secundaria). Esta respuesta se caracteriza por tener carácter clonal y ser específica (Figura 13).



**Figura 13:** Niveles séricos de anticuerpos durante las respuesta primaria y secundaria.

La respuesta inmune adaptativa puede ser de tipo **humoral o celular**. En la respuesta humoral, intervienen los linfocitos B que reconocen al antígeno a través de las inmunoglobulinas de membrana. Posteriormente, se produce la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B en células memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estos últimos son los elementos efectores finales de la respuesta humoral, también conocidas como inmunoglobulinas. En la respuesta de tipo celular participan fundamentalmente los linfocitos T (colaboradores o “*helper*”, y citotóxicos) (38)(39) (Figura 14).



**Figura 14:** Tipos de inmunidad adaptativa y funciones de las principales células efectoras. Adaptada de (40).

**ACTIVACIÓN LINFOCITO T Y MHC (41):** La principal función de los linfocitos T es el reconocimiento de patógenos intracelulares. Para ello, es necesario que el patógeno haya sido previamente procesado en fragmentos antigénicos y presentados a través del MHC-I o MHC-II. El MHC está codificado en genes situados en el cromosoma 6 y codifican estructuras glicoproteicas que se localizan en la superficie celular. Se trata de moléculas fundamentales para el correcto desarrollo de la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T. Se pueden clasificar en tres grupos:

*Clase 1 o HLA-A,-B y -C:* Presentes en la mayoría de células nucleadas del organismo. Son responsables de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8.

*Clase 2 o HLA-D (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR):* Presentes en CPA y son responsables de presentar los péptidos antigénicos a los linfocitos T CD4.

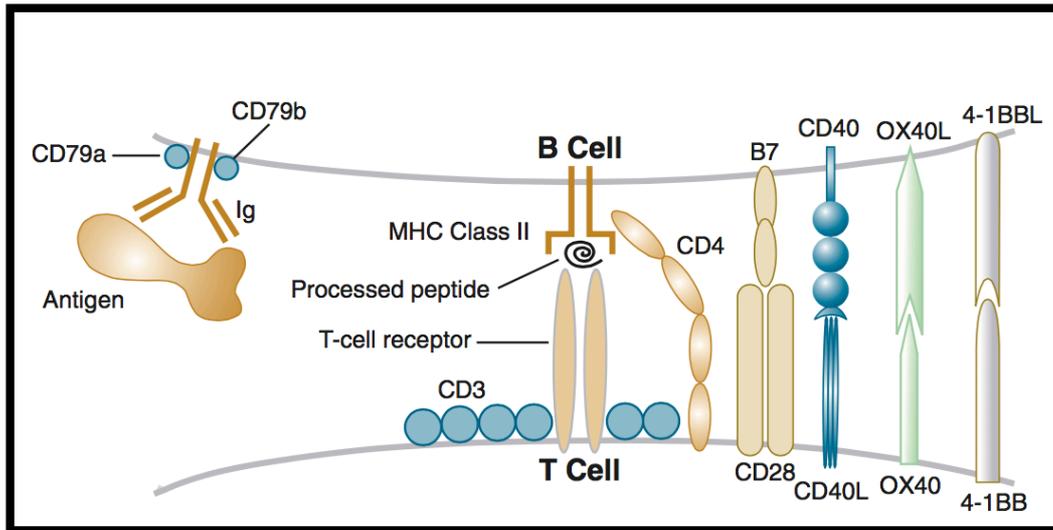
*Otras clases:* HLA-E, HLA-F, y HLA-G.

Estructuralmente, están formados por dos regiones: una región variable (orientada hacia el exterior) encargada de la interacción con el péptido antigénico y el TCR, y una región constante (orientada hacia el interior) con funciones de anclaje y de interacción con los correceptores específicos de CD4 o CD8.

La interacción *péptido antigénico-MHC-II* y *TCR* genera una señal de activación parcial. De hecho, si solo se produce esta interacción muchos linfocitos T pueden entrar en estado de anergia dejando de ser efectivos. Por esto, es necesario que se produzca una segunda señal de activación para que la función sea completa. Esta segunda señal coestimuladora se basa en la unión de CD28, presente en el linfocito T, y CD80 o CD86, presente en la CPA. Ambas señales permitirán la activación y proliferación de linfocitos T (Th1 o Th2) y por tanto, la respuesta inmune adaptativa de tipo celular.

**ACTIVACIÓN LINFOCITO B:** A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B reconocen al antígeno a través de inmunoglobulinas de membrana. El BCR interacciona con el antígeno activándose y generando su expansión clonal que da lugar a células B memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. A veces, la interacción *BCR-Ag* no es suficiente y son necesarias señales coestimuladoras para completar la acción. Algunas de estas proteínas son el correceptor de linfocito B, formado por un trímero constituido por CD19, CD21 y CD81, que amplifica la señal cuando el antígeno se encuentra rodeado de proteínas del complemento. Existen otras moléculas accesorias que amplifican la señal en el interior del linfocito con el resultado final de la activación de genes relacionados con la síntesis de anticuerpos.

**COLABORACIÓN B-T-B:** Los linfocitos B expresan MHC-II y actúan como CPA de manera que internalizan y procesan antígenos para presentárselos a los linfocitos T. Estos linfocitos T se activan y liberan una serie de citoquinas que permiten la completa activación y diferenciación de las células B en células plasmáticas (Figura 15).



**Figura 15:** Colaboración linfocito B-T-B. La parte izquierda de la figura muestra la interacción del antígeno con el BCR del linfocito B. Las moléculas CD79a y CD79b son moléculas accesorias que transmiten la señal al interior celular. El antígeno es internalizado y procesado en péptidos que posteriormente son unidos al MHC-II para su presentación al linfocito T en la superficie celular. La parte derecha de la figura muestra la interacción entre el péptido-MHC-II y el TCR que induce la expresión de genes para CD40L, OX40 y 4-1BB. Las interacciones CD40/CD40L y B7/CD28 generan las segundas señales coestimuladoras para la activación del linfocito B y linfocito T respectivamente. La completa activación del linfocito B se produce tras la liberación de citoquinas por el linfocito T una vez activado. Adaptada de (15).

## REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune está regulada por una serie de mecanismos donde interaccionan una red de células y mediadores (citoquinas) competentes. El balance entre inflamación y anti-inflamación va a ser determinante en la resolución del proceso infeccioso aunque se deben tener en cuenta múltiples factores que regulan la intensidad y duración de la respuesta. En primer lugar, tenemos los factores relacionados con el antígeno. Debemos considerar la naturaleza del antígeno (características fisicoquímicas y factores de virulencia), la dosis inoculada, la vía de acceso y la competencia antigénica (capacidad inmunógena). En segundo lugar, las propias células efectoras de la respuesta inmune tienen acciones reguladoras. Según la teoría de la red idiotípica de Jerne (Premio Nobel 1984), durante la respuesta inmune se generan anticuerpos antiidiotipo, es decir, anticuerpos unidos a anticuerpos que forman una red que tiene como objetivo final la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas, que en condiciones de reposo mantiene un equilibrio cuanti- y cualitativo (42). Existe también la retroregulación negativa por IgG donde estas inmunoglobulinas bloquean el antígeno en su epítipo impidiendo la unión al BCR, y por tanto, la activación y diferenciación del linfocito B. Los inmunocomplejos pueden activar la respuesta inmune por la unión del inmunocomplejo al BCR a través de la Fc de la inmunoglobulina, favoreciendo la internalización y presentación de antígeno, o suprimirla por entrecruzamiento de receptores Fc y BCR a través del inmunocomplejo donde se genera una señal inhibitoria que impide la proliferación y diferenciación celular. Los linfocitos Th participan en la activación de las respuestas tanto humoral como celular, y se autorregulan. Los linfocitos T CD8 reguladores o supresores mantienen la tolerancia a lo propio (autotolerancia).

Las citoquinas inmunomoduladoras en condiciones fisiológicas limitan reacciones inflamatorias potencialmente excesivas manteniendo la homeostasia celular. En cambio en condiciones patológicas, esta actividad inmunomoduladora puede, o no ser suficiente o ser excesiva, de manera que se inhibe la respuesta inmune aumentando el riesgo infeccioso del huésped. La complejidad del sistema inmune hace que el balance entre citoquinas anti- y proinflamatorias que regulan la respuesta ante un proceso infeccioso no sea tan fácil. Existen múltiples vías que generan las mismas citoquinas, y muchas citoquinas con las mismas funciones. Son muchos los factores a controlar en la regulación de la respuesta citoquinica: concentración y tiempo de citoquina secretada, presencia o ausencia de elementos que potencien la respuesta, capacidad de respuesta del tejido agredido, etc (43).

Los factores genéticos deben tenerse en cuenta ya que los genes codificantes del MHC son altamente polimórficos y por tanto, estructuralmente diferentes entre individuos, lo que condiciona una variabilidad interindividual ante un mismo estímulo antigénico.

Por último, se conoce que existe una estrecha vinculación entre los sistemas endocrino, nervioso e inmunológico. El sistema nervioso responde ante situaciones de estrés o procesos inflamatorios mediante la liberación de neurotransmisores, hormonas o corticoides a través del eje *hipotálamo-hipófisis-adrenal*. Las células inmunológicas poseen receptores para neurotransmisores como la adrenalina, o para glucocorticoides como el cortisol justificando de esta manera la acción inmunosupresora de estos mediadores sobre las células inmunológicas en procesos de estrés prolongado.

La respuesta inmune no puede ser mantenida indefinidamente, una vez que desaparece el estímulo antigénico, el sistema inmunitario vuelve a su estado basal disminuyendo su actividad a través de señales celulares inhibitorias (31)(44).

**MODELOS DE INFECCION Y EVASIÓN INMUNOLÓGICA**

A pesar de los múltiples y complejos mecanismos inmunitarios existentes, los microorganismos han desarrollado estrategias para evadir la acción de las células inmunológicas y conseguir infectar al huésped (Tabla 4).

PATÓGENO	MEC. DE EVASION INMUNE	EJEMPLO	MECANISMO DE ACCION
<b>Bacterias</b> (34)	Resistencia a fagocitosis	<i>S. pneumoniae</i>	Capsula polisacáridica
	Resistencia a especies reactivas de oxígeno	<i>S. aureus</i>	Catalasa
	Resistencia al complemento	<i>N. meningitidis</i>	Inhibe C3 y C5 convertasa
	Resistencia a bacteriocinas	<i>Pseudomonas sp.</i>	Modifica LPS
	Evita formación fagolisosoma	<i>L. monocytogenes</i>	Listeriolisina O
	Inhibe respuesta inmune innata y adaptativa	<i>M. tuberculosis</i> (45)	Modula producción citoquímica huésped, presentación antigénica e inhibe acidificación fagolisosoma
<b>Virus</b> (46)	Destrucción CD4	VIH	Supresión respuesta inmune adaptativa
	Variación antigénica	Gripe	Evita reconocimiento por MHC-I y NK (47)(48)
	Inhibe expresión MHC-I	Adenovirus (49)	Suprime acción citotóxica (CD8)
<b>Hongos</b>	Inhibe maduración fagosoma	<i>C. glabrata</i> (50)	Limita acceso nutrientes e inhibe acidificación.
<b>Parásitos</b>	Reduce presentación de Ag a linfocitos T	<i>T. gondii</i> (51)	Regulación negativa de MHC-II
	Induce citocinas Th1	<i>E. histolytica</i> (52)	Modula respuesta inmune

**Tabla 4:** Ejemplos de evasión inmunológica por microorganismos patógenos.

Esto pone de manifiesto la estrecha vinculación existente entre la infección y la respuesta inmune del huésped. Las variabilidades interindividuales y la diversidad de patógenos existentes, guían las actuales líneas de investigación hacia una medicina individualizada donde se tenga conocimiento no solo de los factores asociados al microorganismo sino del estudio exhaustivo del estado inmunitario del huésped, permitiendo de esta manera, controlar o minimizar una mala respuesta inmunológica por fallos o *déficits* preexistentes no conocidos. Monitorizar el estado inmunitario podría prevenir y disminuir la incidencia de procesos infecciosos, ampliar el conocimiento sobre factores de riesgo asociados a la infección, y mejorar la toma de decisiones clínicas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas.

---

## **Infección grave**

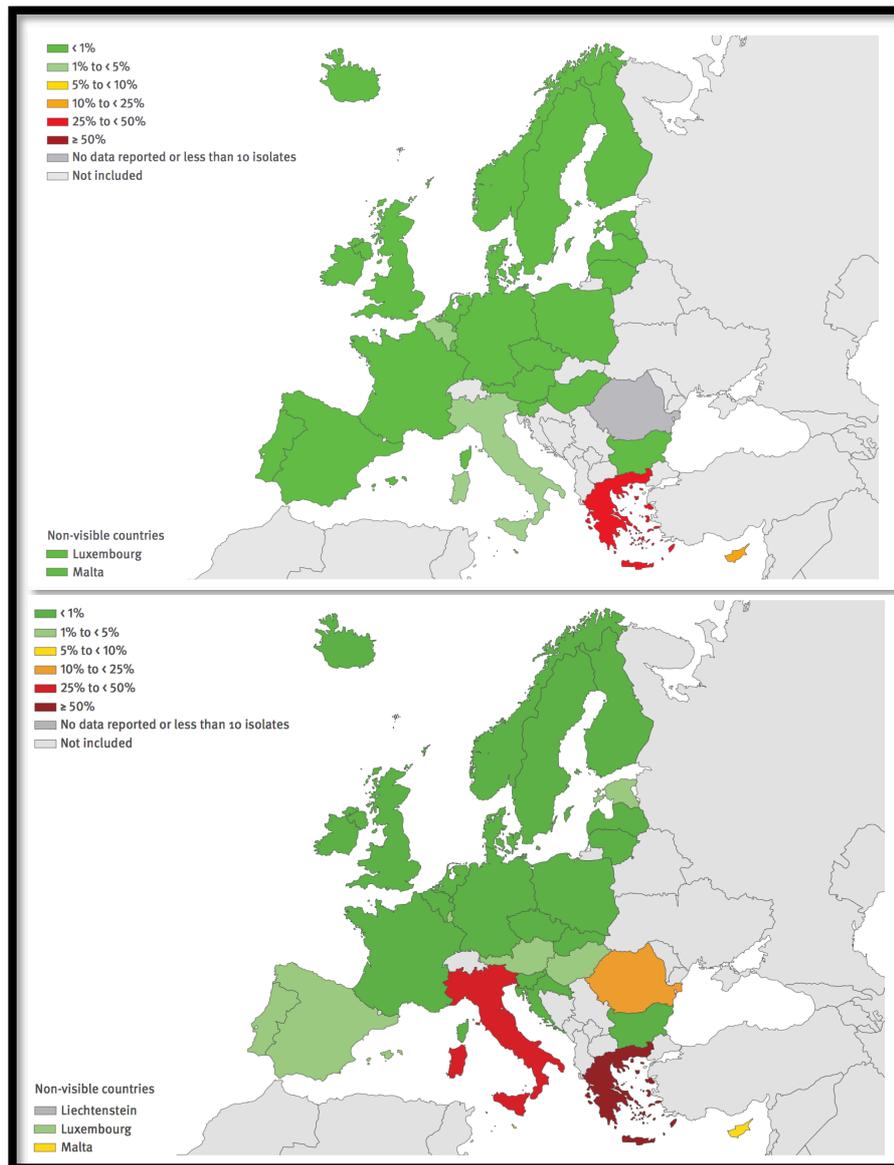
---

Las enfermedades infecciosas representan un problema de salud pública siendo una de las principales causas de asistencia sanitaria tanto en atención primaria como a nivel hospitalario. Las infecciones del tracto respiratorio inferior (TRI), el VIH o la sepsis tienen un gran impacto en la morbi-mortalidad mundial, situándose entre las 20 primeras causas de muerte produciendo más de 5 millones de fallecimientos mundiales anuales (53). El envejecimiento actual de la población atendida, así como la mayor agresividad de los procedimientos diagnósticos y terapéuticos, son algunas de las razones que han dado lugar al aumento de la incidencia de infecciones, con una notable repercusión a nivel comunitario (54). La propia senescencia genera fallos en los mecanismos de defensa inmunológica haciendo al huésped más susceptible de infectarse. Existe un aumento de las infecciones por microorganismos oportunistas, no solo por la propia senectud, sino por las comorbilidades y los factores de riesgo asociados como el uso de sondas, drenajes, o el consumo de antibióticos que conlleva a la selección de cepas resistentes que hacen ineficaces los tratamientos empíricos habituales (55).

Las enfermedades infecciosas, a diferencia de otras especialidades médicas, tienen el problema de la diseminación de los microorganismos y la resistencia antibiótica, hechos que comprometen no solo la salud del enfermo sino la de otras personas y pacientes que se encuentren en el mismo ambiente. El tratamiento empírico inadecuado supone una amenaza y uno de los principales factores de riesgo para la resistencia antibiótica.

Los datos de los que se dispone actualmente son alarmantes y muestran una rápida diseminación (Figura 16). Se han puesto en marcha medidas para la prevención y control de la infección tanto a nivel internacional, por organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC), como a nivel estatal con el Plan Nacional de Resistencia Antibiótica liderado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Se estima que en Europa la resistencia antibiótica provoca 25.000 muertes anuales y más de 2,5 millones de días extra de estancia hospitalaria (56)(57). Si nos centramos en datos mundiales, las cifras disponibles estiman que existen 700.000 muertes asociadas a resistencias antibióticas, y los modelos de predicción establecen que en 2050 se producirán más de 10 millones de muertes anuales si no se toman medidas adecuadas para el control de este problema; todo ello con un coste estimado en 100 trillones de dólares (58).

Por todo ello, es necesario el compromiso y concienciación tanto de profesionales sanitarios como de cualquier persona vinculada con el paciente para minimizar este problema sanitario mundial. Se trata de una prioridad de interés general donde se necesita la participación gubernamental, de sociedades científicas, profesionales sanitarios y campañas de información para la población general con el objetivo de disminuir la incidencia de la infección, no solo con un interés sanitario sino también económico.



**Figura 16:** Evolución de la diseminación a nivel europeo de la resistencia a carbapenems en aislados de *Klebsiella pneumoniae* de muestras invasivas (sangre y LCR). La parte superior de la figura muestra la distribución de la resistencia en el año 2009, y la parte inferior en el año 2013. Datos obtenidos de la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia Antibiótica (EARS-Net) (59).

Antiguamente, las infecciones se clasificaban en comunitarias y hospitalarias. Sin embargo, recientemente se ha descrito una nueva categoría asistencial que subyace de los grandes cambios en las características demográficas de la población, en los perfiles de comorbilidades y factores de riesgo, en el desarrollo de la hospitalización a domicilio y el aumento de residencias de larga estancia (60). Esta nueva modalidad se denomina: *infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria* (IRAS).

El compromiso vital del ser humano por la invasión de un agente patógeno constituye lo que denominamos *infección grave*.

#### **INFECCIÓN COMUNITARIA E INFECCION RELACIONADA CON LA ASISTENCIA SANITARIA**

La infección comunitaria se define como aquel proceso infeccioso desarrollado en cualquier ámbito que no sea una institución de salud. Aquella infección desarrollada en ámbito sanitario que no cumpla criterios de infección nosocomial se denomina IRAS.

El ingreso hospitalario condicionado por un proceso infeccioso grave está fundamentado en una serie de criterios entre los que se encuentran las manifestaciones clínicas y el compromiso vital del paciente (estabilidad hemodinámica, necesidad de medidas de soporte), y se complementa con pruebas radiológicas, la analítica de laboratorio (monitorización de marcadores biológicos), y el diagnóstico directo del laboratorio de microbiología. El conocimiento etiológico de forma rápida ayuda a la toma de decisiones clínicas y al manejo del paciente con infección grave.

En España, la prevalencia de infección comunitaria se sitúa en torno al 18% y dentro de las infecciones comunitarias graves destacan: la neumonía adquirida en la comunidad, las meningitis y encefalitis, las infecciones urinarias y la sepsis (61)(62). En cuanto a la etiología infecciosa, los microorganismos más frecuentemente aislados son enterobacterias seguidos de cocos gram positivos, con un 36% y 28% respectivamente (63).

La IRAS surgió a raíz de los cambios en las características demográficas de la población. Cada vez existen más pacientes de edad avanzada, con situaciones clínicas más complejas (múltiples comorbilidades y factores de riesgo) que requieren de una atención a largo plazo constituyendo un grupo muy susceptible de padecer un proceso infeccioso grave. Actualmente, se pretende mejorar las medidas de prevención y control de la infección así como profundizar en la investigación sobre nuevos parámetros que nos permitan identificar aquellos pacientes con un mayor riesgo de padecer una infección grave.

Para establecer esta nueva categoría, se evaluaron las características clínicas y demográficas de pacientes con infección comunitaria y pacientes con infección que estuviesen institucionalizados, encontrándose diferencias significativas que hicieron necesario el establecimiento de esta nueva categorización de la infección. Entre estos factores destaca un mayor riesgo de padecer infecciones por microorganismos multirresistentes en el grupo de pacientes con IRAS, hecho que condiciona los tratamientos antibióticos empleados. Esta forma de estratificar a los pacientes permite que, en el grupo de pacientes institucionalizados, se modifiquen las terapias antibióticas empíricas y se propongan nuevos algoritmos que minimicen el fracaso terapéutico (64). En un estudio de Gaynes R. *et al* donde se estudiaron pacientes con neumonía en los tres ámbitos -comunitario, nosocomial e instituciones sanitarias- se encontró que la mortalidad en los grupos de pacientes hospitalarios e institucionalizados era parecida. Sin embargo, la mortalidad fue significativamente superior que la del grupo de pacientes comunitarios (65). Estos autores remarcaron en sus conclusiones la importancia de considerar el impacto sanitario de este tercer grupo.

La “*American Thoracic Society*” (ATS) y la “*Infectious Diseases Society of America*” (IDSA) ya han publicado múltiples guías clínicas con los criterios para definir las diferentes categorías de infección (66), y las medidas a llevar a cabo en función del proceso clínico (67)(68). En España, la relevancia del problema ha provocado la misma necesidad y concienciación y se ha puesto en marcha un Plan Nacional para el control y prevención de la IRAS.

## INFECCIÓN NOSOCOMIAL

La infección nosocomial (IN) se define como aquella infección localizada o sistémica resultado de la acción de un agente infeccioso o de sus toxinas que se establece transcurridas 48 horas o más desde el ingreso hospitalario, que no estaba presente en el momento del ingreso ni en periodo de incubación (69).

Las tasas de prevalencia a nivel Europeo de IN se encuentra entre un 3,5% y un 11,5% en áreas médicas, quirúrgicas y pediátricas. En cambio, las unidades de cuidados intensivos tienen una prevalencia mucho más elevada alcanzando cifras en torno al 25% (70). En España, la prevalencia de infección nosocomial general es del 7%, y en las unidades de cuidados intensivos se sitúa en un 21%. En cuanto a la etiología infecciosa, los microorganismos más frecuentemente aislados fueron enterobacterias (principalmente *E. coli*) y cocos gram positivos (fundamentalmente *S. aureus*), ambos grupos con una prevalencia del 35% (63)(71).

Las IN se producen en diferentes localizaciones y existen factores de riesgo asociados siendo la inmunosupresión, cirugía, uso de sondas urinarias y la ventilación mecánica los principales. El conocimiento de la epidemiología infecciosa y el estudio de la infección nosocomial en nuestro área asistencial se hace fundamental para conocer la prevalencia de estas infecciones y la identificación de nuevos factores de riesgo que permitan la incorporación de nuevas medidas de prevención, diagnóstico y pronóstico más efectivas.

El coste de un episodio de infección nosocomial es muy difícil de calcular debido a la heterogeneidad de los estudios publicados y a la no existencia de un modelo claro para dicha estimación. A partir de una revisión bibliográfica publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo en 2008, el coste de una infección nosocomial se sitúa entre 1.000 y 40.000 euros, aumentando si la infección es causada por un microorganismo con una resistencia antibiótica relevante (72)(73).

## Inmunidad y neumonía asociada a ventilación mecánica

---

### DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA INFECCIOSA

La neumonía se define como una infección del parénquima pulmonar. Se puede clasificar en cuatro clases: infección extrahospitalaria (neumonía asociada a la comunidad, -NAC), hospitalaria o nosocomial (NN), asociada al uso de ventilador mecánico (NAV), y la denominada neumonía relacionada con la atención sanitaria (NACS) (74). Se produce como consecuencia de la proliferación de microorganismos a nivel alveolar y de la respuesta inmunitaria desencadenada por el hospedador.

La neumonía asociada a ventilación mecánica se define como neumonía que se instaura en un periodo superior a 48 horas desde el momento de la intubación endotraqueal (75). Se puede clasificar en función del momento de instauración en: *precoz* o *temprana*, si se produce en los cinco primeros días de ventilación, o *tardía*, si supera dicho periodo. La etiología infecciosa más frecuente varía en función del estudio pero todos apuntan a que los microorganismos más frecuentemente aislados en la neumonía asociada a ventilación mecánica son enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* o *Escherichia coli*, no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*, y cocos gram positivos, principalmente *Staphylococcus aureus*, objetivándose un mayor aislamiento de microorganismos multirresistentes en la NAV tardía (76)(77)(78).

A pesar del incremento de las neumonías asociadas a ventilación mecánica producidas por enterobacterias y microorganismos no fermentadores en los últimos años, los cocos gram positivos, más concretamente *Staphylococcus aureus*, sigue siendo uno de los principales y más agresivos causantes de esta patología.

### INMUNOPATOLOGÍA DE LA NAV

#### INMUNIDAD EN LAS MUCOSAS

La piel y mucosas forman la primera línea de defensa entre el organismo y el medio externo. Actúan como barrera física limitando el acceso de agentes patógenos así como las múltiples funciones fisiológicas que desempeñan: nutrición, hidratación, etc. Además, estas superficies se encuentran protegidas por un sistema inmunitario especializado denominado: **tejido linfoide asociado a mucosas** (MALT, "*Mucosa associated lymphoid tissue*").

Se trata de un sistema extremadamente especializado debido a que, a diferencia del sistema inmune sistémico que generalmente actúa frente a agentes potencialmente

patógenos, el MALT protege órganos donde existe flora microbiana comensal y donde se generan productos antigénicos que no son dañinos. Por tanto, deben existir mecanismos efectores que regulen y eviten un excesivo daño tisular y una respuesta inmune innecesaria (79).

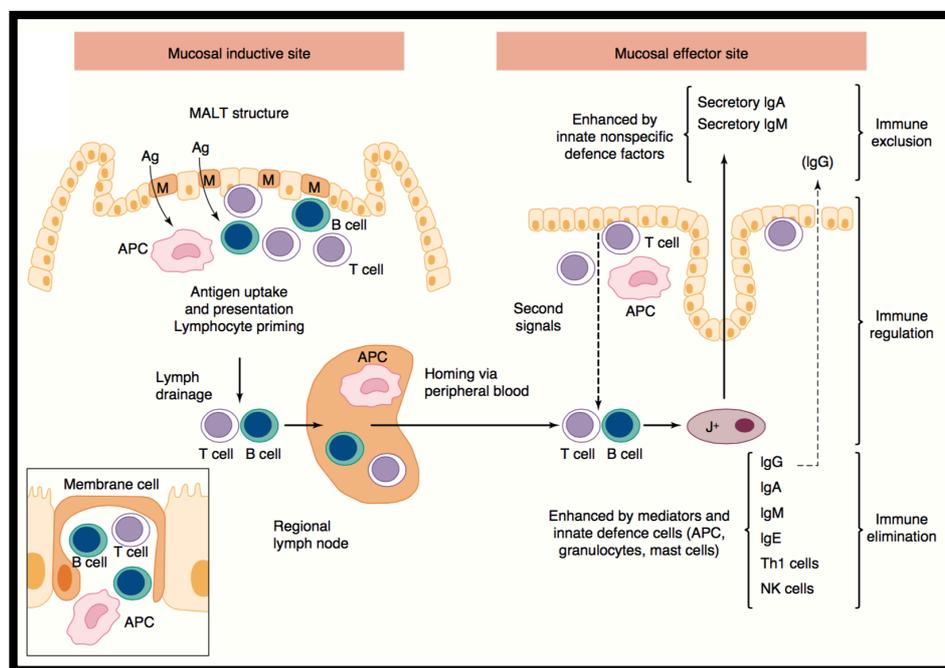
Las principales células efectoras del MALT son: linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas, y células de la inmunidad innata como neutrófilos o macrófagos. El MALT más conocido es el gastrointestinal y está formado por:

*Epitelio intestinal*: linfocitos intraepiteliales (CD4 Th1 y CD8)

*Lamina propia*: linfocitos T CD4 Th2, linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos.

*Placas de Peyer*: Función efectora.

La estimulación antigénica en el **MALT inductor** estimula la migración de linfocitos B, linfocitos T y células dendríticas vía linfática hacia órganos linfoides regionales para después alcanzar a través del torrente circulatorio el **MALT de tipo secretor**, donde se produce la proliferación y diferenciación de los linfocitos extravasados. Las células plasmáticas localizadas a este nivel producen IgA2. Además, se producen pequeñas cantidades de IgM e IgG que atraviesan las células epiteliales (Figura 17).



**Figura 17:** Mecanismo de activación y funciones efectoras en la inmunidad del MALT. Modificado de (80).

La IgA presente en las mucosas se encuentra en su forma secretada o isotipo IgA2, y representa más del 80% de los anticuerpos generados a este nivel. Se trata de una molécula de estructura dimérica caracterizada estructuralmente por resistir la proteólisis e hidrólisis ácida,

ser capaz de atravesar el epitelio mediante el receptor polimérico de inmunoglobulina (pIgR) y de unirse a determinados antígenos evitando la activación innecesaria del complemento y de la respuesta inflamatoria.

Las respuestas ante un antígeno local pueden ser de dos tipos y depende de la naturaleza del antígeno presente. Así, ante antígenos propios de la alimentación o metabolitos de la flora comensal se genera una respuesta inmune local tipo Th2 suprimiendo la respuesta sistémica, y frente antígenos patógenos se activa una respuesta inmune sistémica propiciada por la detección de PAMPs y el microambiente citoquínico (81).

#### **RESPUESTA INMUNOLÓGICA A NIVEL PULMONAR**

El tracto respiratorio constituye la segunda mayor superficie mucosa después del tracto gastrointestinal, y sus características varían en función de su localización: en el tracto respiratorio superior se encuentra el tejido linfoide asociado a nariz (NALT) y laringe (LALT), que presenta unas características diferenciales con la mucosa del TRI donde encontramos el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT). Las diferencias radican fundamentalmente en que la parte superior está en contacto directo con la flora comensal de la cavidad orofaríngea, y sin embargo, el tracto inferior es estéril (82)(80).

El pulmón de un adulto sano presenta habitualmente una pequeña cantidad de linfocitos (CD4 y CD8  $\alpha\beta$ ), distribuida en cuatro compartimentos principales: espacio broncoalveolar, BALT, tejido pulmonar intersticial y espacio intravascular. La presencia de esta población linfocitaria aún no está clara y no se sabe si están en constante recirculación o si constituyen una población residente fija a nivel pulmonar (15). En cambio, a nivel intraepitelial existe una población residente de linfocitos T tipo  $\gamma\delta$  con una reorganización estructural de su TCR diferente a los  $\alpha\beta$ , y con una participación en la respuesta inmune innata por reconocer péptidos antigénicos a través de sus TLR, y ejercer como células presentadoras de antígeno (83). Esta subpoblación linfocitaria sirve de nexo entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa aunque aún no se conocen bien sus funciones (84)(85).

La infección pulmonar bacteriana ocurre habitualmente tras la inhalación o aspiración de bacterias que han conseguido superar los mecanismos de protección de la vía aérea tales como la tos o el aclaramiento mucociliar permitiendo la invasión bacteriana de la vía respiratoria inferior. La primera barrera de defensa inmune lo constituye la presencia de IgA en las secreciones broncoalveolares que evita la adherencia de la bacteria al epitelio por neutralización. La presencia de productos bacterianos genera un estado proinflamatorio a nivel pulmonar que activa la respuesta inmune innata con la actuación de  $\alpha$  y  $\beta$ -defensinas

(péptidos con acción antimicrobiana), catelicidinas (función quimioatrayente), o surfactante pulmonar (opsonización), todos productos presentes en la mucosa respiratoria, que promueven junto con el sistema fagocítico la resolución de la infección. A su vez, las CPA captan y procesan el antígeno para migrar a órganos linfoides secundarios donde se produce la activación de las células T, y la posterior colaboración con células B para desencadenar una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral. A continuación, los anticuerpos junto con las células B y T activadas son recircularizadas hasta alcanzar la cavidad pulmonar donde finalmente, se produce la eliminación efectiva del patógeno con ayuda de las citocinas y factores quimiotácticos liberados. La presencia de IgG1, IgG3 e IgM en el área de infección permite la activación del complemento y la posterior lisis bacteriana.

En el desarrollo de la neumonía nosocomial, además de la modificación de la microbiota orofaríngea por el uso prolongado de antibióticos, se produce una inmunosupresión temporal que se manifiesta por una disminución de la expresión de algunos marcadores de superficie celular como el HLA-DR en monocitos y macrófagos alveolares, y por el aumento de mediadores inflamatorios como la IL-10 (86).

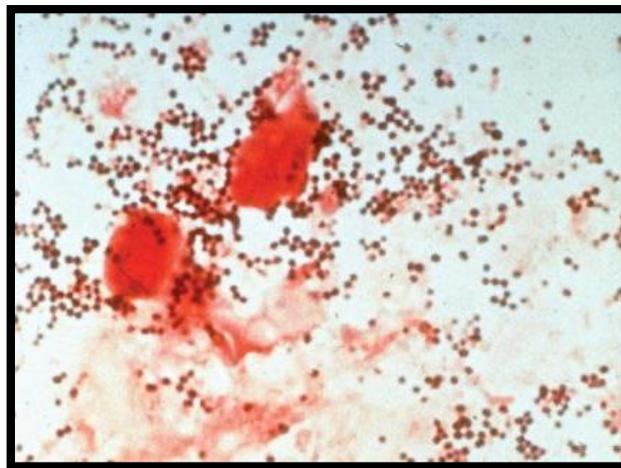
### **EPIDEMIOLOGÍA DE LA NAV**

La neumonía grave afecta tanto a pacientes comunitarios, siendo una de las principales patologías que requieren ingreso hospitalario, como a pacientes ingresados que la desarrollan con carácter nosocomial. Afecta sobre todo al paciente crítico en aquellos que requieren ventilación mecánica (87). Numerosos estudios han demostrado que las neumonías nosocomiales tienen una importante repercusión a nivel hospitalario tanto en el aumento de la estancia hospitalaria (entre 7 y 10 días, siendo aún mayor en aquellos pacientes que padecen NAV), como en el coste económico asociado (88)(89).

La tasa de incidencia de neumonías en el paciente crítico se sitúa alrededor del 3% de los pacientes ingresados, y si nos centramos únicamente en las NAV se alcanza más de un 5%. Se trata de una patología asociada a una elevada mortalidad, difícil de estimar ya que se relaciona directamente con las comorbilidades, el motivo de ingreso, y la adecuación del tratamiento antibiótico, entre otros. Muchos estudios han evaluado la mortalidad atribuible a la NAV y oscila aproximadamente entre un 10 y un 17% con una mayor incidencia en pacientes de edad avanzada (90)(91)(92). En cambio, la mayoría de estudios hablan de mortalidad global asociada a NAV donde se alcanzan cifras en torno al 50%. Las comorbilidades más frecuentes en estos pacientes son el EPOC, la diabetes, la insuficiencia renal, las neoplasias y la inmunosupresión.

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, EPIDEMIOLÓGICAS Y PATOGENIA**

*Staphylococcus aureus* pertenece al género *Staphylococcus* de la familia Micrococcaceae. El nombre *Staphylococcus* fue introducido por Alexander Ogston en 1883 y deriva del griego *staphylé* (“racimo de uvas”) que es la forma de agregación del microorganismo, aunque también se pueden encontrar en parejas o tétradas (Figura 18). El género está compuesto por 40 especies de las cuales 16 tienen reservorio humano. Se trata de cocos gran positivos que miden entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos. *Staphylococcus aureus* está caracterizado fenotípicamente por poseer coagulasa y catalasa fundamentalmente, lo que le diferencia de la mayoría de especies de su género .



**Figura 18:** Tinción de Gram. Se observan cocos Gram positivos agrupados en racimos. Morfología típica de *Staphylococcus aureus*. Extraído de (93).

Se encuentra distribuido mundialmente y es colonizador habitual de piel y mucosas, sobre todo de la mucosa nasal. La colonización de pacientes hospitalizados por *Staphylococcus aureus* se sitúa en torno al 7% alcanzando más del 15% en el personal sanitario. Las medidas de prevención deben estar estrictamente reguladas y protocolizadas para evitar la transmisión y diseminación del microorganismo. El aumento de *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente (SARM) tanto en hospitales como en la comunidad constituye una señal de alarma para la propuesta de campañas formativas y medidas de control de la infección, como el *screening* de SARM que se realiza en muchos servicios de urgencias de hospitales españoles. Se estima que la media para el aclaramiento de *Staphylococcus aureus* es de 88 semanas.

Boucher H. *et al* y los sucesivos estudios epidemiológicos de Klein E. *et al*, describen el importante aumento en el número de hospitalizaciones, tiempo de estancia hospitalaria, gasto y mortalidad asociada a infecciones graves por *S. aureus*: desde 1999 hasta 2005 se llegaron a

duplicar las cifras. A partir de 2009, parece que se han estabilizado incluso disminuido lo que consolida las medidas de control que se han tomado (94)(95)(96).

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* tienen enorme importancia tanto a nivel comunitario como nosocomial. A nivel hospitalario, supone uno de los principales microorganismos productores de neumonía nosocomial, infección postquirúrgica y bacteriemias (97). En cuanto a las infecciones en pacientes críticos (infecciones intra-UCI), sigue siendo uno de los principales microorganismos aislados, asociados a patologías de enorme interés clínico como son la NAV, infecciones urinarias relacionadas con sonda uretral y bacteriemias asociadas a catéter, entre otras (98).

*Staphylococcus aureus* posee numerosos factores de virulencia lo que le hace una de las especies más patógenas de su género pudiendo causar infecciones graves asociadas a elevada mortalidad. Para desarrollar su acción patógena *S. aureus* dispone de componentes de la pared celular, toxinas y enzimas que le van a permitir colonizar, invadir, multiplicarse y diseminarse (Tabla 5).

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Funciones</b>
Componentes de la pared celular:	
Peptidoglicano	Confiere plasticidad y tolerancia osmótica. Induce la producción de IL-1 por monocitos y estimula la quimiotaxis.
Proteínas de superficie	
a) Proteína fijadora de colágeno ( <i>cna</i> ) y proteína fijadora de fibronectina A y B (FnBPA y FnBPB)	Adherencia.
b) Factor de agrupamiento A (ClfA, <i>Clumping factor A</i> ) o factor de agrupamiento B (ClfB, <i>Clumping factor B</i> )	Agregación bacteriana.
c) Proteína A	Bloquea la fracción Fc de las Ig G. Acción antifagocítica.
Cápsula	Acción antifagocítica.
<i>Biofilm</i>	Confiere resistencia inmunológica. Adherencia.
Ácidos teicoicos y lipoteicoicos	Función metabólica y de adherencia. Estimulan la liberación de citoquinas por macrófagos.
Toxinas:	
Hemolisinas: $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$	Actividad citotóxica frente a eritrocitos, leucocitos y plaquetas.
Leucocidina de Pantón-Valentine	Lisis de leucocitos a través de la formación de poros en las paredes celulares.
Enterotoxinas	Termoestables. Resistentes a enzimas digestivos. Inmunomoduladoras. Superantígeno.
Epidermolisina o exfoliatina (A, termoestable; B, termolábil)	Destrucción de desmosomas en epidermis (sin inflamación ni citolisis).
TSST-1 (Toxina 1 del Síndrome del shock tóxico)	Induce la liberación de citoquinas por macrófagos. Superantígeno.
Enzimas:	
Catalasa	Degrada el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno). Protección.
Coagulasa libre o ligada ( <i>Clumping factor</i> )	Convierte fibrinógeno en fibrina (formación de coágulos).
Hialuronidasa	Degrada ácido hialurónico de los tejidos facilitando la invasión tisular.
Otras:	DNasa, lipasa, proteasa, nucleasa, fibroquinasa (también denominada estafiloquinasa).

Tabla 5: Factores de virulencia más importantes en *Staphylococcus aureus*.

Puede causar múltiples infecciones mediante la penetración a través de la piel alcanzando tejidos profundos:

- **Infecciones respiratorias:** sinusitis, infección bronquial, traqueobronquitis y sobre todo neumonías en pacientes sometidos a ventilación mecánica.
- **Infecciones de piel y tejidos blandos:** foliculitis, impétigo, fascitis, celulitis, mastitis, hidrosadenitis y paroniquia.
- **Bacteriemias, endocarditis y pericarditis, sepsis grave (SG) y shock séptico (SS):** En la literatura se describe el concepto de bacteriemia persistente definida como aquella bacteriemia con una duración mayor o igual a tres días que adquiere una notable importancia en *S. aureus*. Es bastante frecuente incluso sin fiebre (33-55%), asociada a mayor mortalidad en caso de SARM y mayores complicaciones sépticas (99)(100).
- **Infecciones musculo-esqueléticas:** osteomielitis, artritis crónica, piomiositis entre otras,
- **Otras:** infecciones urinarias, infecciones del SNC, cuadros toxigénicos, etc.

La resistencia antibiótica también ha tenido una enorme repercusión en las infecciones por Gram positivos, especialmente en *Staphylococcus aureus*. Los datos históricos sitúan la primera resistencia antibiótica descrita para este microorganismo en 1940 con la producción de penicilinas. Esta resistencia se ha extendido mundialmente y hoy en día el 80-93% de las cepas la poseen. En los años 60 se empiezan a detectar resistencias a oxacilina, lo que supone la aparición de cepas SAMR que han ido aumentando progresivamente constituyendo actualmente un problema de gran importancia tanto hospitalaria como comunitaria (Tabla 6).

AÑO	DESCRIPCIÓN
1940	Descripción penicilinasa en <i>Staphylococcus aureus</i>
1961	Primera descripción de SAMR (gen <i>mecA</i> – PBP2a)
1989	Descripción de <i>Enterococcus</i> sp. Resistentes a vancomicina
1996	Emergencia de cepas GISA
1999	Descripción de SAMR comunitario (SAMR-CO)
2001	Resistencia a linezolid (mutación ribosómica)
2002	Aparición cepas VRSA
2005	Resistencia a daptomicina
2007	Resistencia a linezolid (plasmídica, gen <i>cfr</i> )
2011	Descripción gen <i>mecC</i> en SAMR
2011	Establecimiento de nueve operones <i>van</i> en enterococos
2013	Resistencia a ceftarolina en <i>S. aureus</i>
2015	Resistencia a linezolid: genes transferibles <i>cfrB</i> , <i>optrA</i>

**Tabla 6:** Evolución histórica de la resistencia en gram positivos.

#### DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA NAV: TIEMPO DE RESPUESTA

Los protocolos diagnósticos son necesarios para 1) objetivar una patología tras la aparición de nuevos signos o síntomas, y 2) para estudiar la etiología de la misma. Para ello, a parte de la clínica del paciente son necesarias herramientas radiológicas y de laboratorio que ayuden a definir un diagnóstico. La colaboración entre los médicos solicitantes y el laboratorio es imprescindible para obtener el mayor beneficio para el paciente.

La toma de decisiones clínicas muchas veces no puede esperar a los resultados de laboratorio, pero si que dichas decisiones pueden modificarse tras un resultado analítico o microbiológico. Por ello, unas de las funciones del laboratorio es generar resultados con la mayor calidad y brevedad posible. El tiempo de respuesta se define como el tiempo transcurrido desde la recepción de una muestra en el laboratorio hasta la emisión del resultado de los análisis solicitados. El diagnóstico microbiológico resulta esencial para la determinación del agente etiológico y la instauración de un tratamiento antimicrobiano adecuado. Sin embargo, en la actualidad, el papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de las infecciones del TRI presenta importantes limitaciones (101). La confirmación etiológica de NAV que se realiza mediante el cultivo cuantitativo de secreciones del TRI, obtenidas o no mediante broncoscopia, presenta baja rentabilidad debido a la fácil

contaminación de las muestras con flora del tracto respiratorio superior, y al tiempo empleado para su procesamiento y la posterior emisión de resultados, que conlleva aproximadamente 48 horas. Las técnicas clásicas como la tinción de Gram, siguen siendo una de las piezas fundamentales que permiten una primera aproximación muy útil para la orientación etiológica y la instauración de una antibioterapia inicial. Sin embargo, no presenta buena especificidad ya que un resultado negativo no permite descartar la infección. El antibiograma directo, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o las técnicas de detección antigénica apoyan el diagnóstico rápido permitiendo generar información de gran utilidad clínica (102)(103). La reciente incorporación de técnicas como la espectrometría de masas a los laboratorios ha permitido adelantar 24 horas la identificación microbiana. De hecho, ya existen protocolos de identificación microbiana a partir de muestra directa, lo que permite determinar de qué microorganismo se trata en pocas horas desde la recepción (104)(105).

Aún así, muchas veces no es posible reducir el tiempo de respuesta ya que la técnica más utilizada para el diagnóstico de infecciones del TRI es el cultivo, que requiere de 18-24 horas. Por ello, se hace necesario el estudio de nuevos parámetros que nos permitan mejorar el diagnóstico tanto de la NAV como de cualquier otro tipo de patología grave.

## Inmunidad y sepsis

---

### ORIGEN Y CONCEPTO

El concepto de sepsis más antiguo data en Grecia hace más de 2.700 años. “σηψις” (palabra griega para sepsis) se definió como la descomposición de la materia orgánica animal o vegetal en presencia de bacterias (106). El término ha sufrido grandes cambios desde lo descrito en textos hipocráticos. En ellos aparecen los conceptos de sepsis y pepsis como conceptos complementarios y relacionados, recordando al *yin y el yang* de la cultura china. La pepsis era concebida como un proceso biológico beneficioso para el organismo -generación, fermentación o maduración-. En cambio, la sepsis se asociaba al mal olor y a la putrefacción (107).

En 1991 tiene lugar la primera conferencia del “*American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*” (ACCP/SCCM) con el objetivo de consensuar las definiciones de los términos de SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), sepsis y sus diferentes grados de gravedad (108). El avance de la medicina hace necesaria la actualización de estos conceptos y el establecimiento de criterios más concretos y precisos que permitan profundizar y llegar a entender la fisiopatología de la sepsis. Por ello, en 2001 diferentes organizaciones como la SCCM, la “*European Society of Intensive Care Medicine*” (ESICM), el ACCP, el ATS, y el “*Surgical Infection Society*” (SIS) junto con otros grupos de investigadores, se reúnen en una conferencia internacional y crean un documento actualizado sobre el manejo de la sepsis (109). Estas definiciones y las indicaciones clínicas respecto del diagnóstico y tratamiento han sido actualizadas periódicamente gracias a iniciativas como la “*Surviving Sepsis Campaign*” (SSC), cuyas últimas recomendaciones se recogen en un documento publicado en 2012 tanto en “*Critical Care Medicine*” como en “*Intensive Care Medicine*”.

### CATEGORÍAS DE LA SEPSIS

Las guías clínicas han permitido disminuir la elevada mortalidad y mejorar el manejo de los pacientes con esta patología tan grave. Las definiciones y criterios diagnósticos actuales se describen a continuación (108)(110):

El **SIRS** se define como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica caracterizado por los criterios expuestos en la tabla 7:

CRITERIOS SIRS
Temperatura > 38°C o < 36°C.
Frecuencia Cardíaca ≥ 90 lpm.
Frecuencia Respiratoria ≥ 20 rpm (o PaCO <sub>2</sub> <32 mmHg).
Concentración de Leucocitos ≥ 12.000/μl o ≤ 4.000μl o >10% de formas inmaduras.

**Tabla 7:** Características definitorias de SIRS.

**SEPSIS:** Cualquier infección documentada a sospechada con uno o más de los criterios agrupados en la tabla 8.

**SEPSIS GRAVE:** Hipoperfusión o hipotensión con disfunción de al menos un órgano inducida por la sepsis (Tabla 9).

**SHOCK SÉPTICO:** Si la sepsis grave se acompaña de hipotensión que no responde a vasopresores a pesar de fluidoterapia se denomina shock séptico, siendo este la máxima expresión de gravedad en esta patología (109)(111).

**DISFUNCIÓN MULTIORGÁNICA (MODS- "Multiple organ dysfunction syndrome"):** Presencia de alteraciones funcionales en dos o más órganos que requieren de intervención para mantener la homeostasis.

SEPSIS	
TIPO DE VARIABLE	CRITERIOS
General	Temperatura > 38°C o < 36°C.
	Frecuencia cardiaca >90 lpm.
	Taquipnea.
	Estado mental alterado.
	Edema importante o equilibrio positivo de fluidos (> 20mL/kg durante más de 24h).
	Hiperglucemia (glucosa en plasma > 140mg/dl o 7,7mmol/l) en ausencia de diabetes.
Inflamatoria	Concentración de Leucocitos $\geq 12.000/\mu\text{l}$ , $\leq 4.000/\mu\text{l}$ o >10% de formas inmaduras.
	PCR en plasma superior a dos DS por encima del valor normal.
	PCT en plasma superior a dos DS por encima del valor normal.
Hemodinámica	PAS <90mmHg. PAM <70mmHg o una disminución de la PAS >40mmHg en adultos o inferior a dos DS por debajo de lo normal según la edad.
Disfunción orgánica	Hipoxemia arterial ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$ ).
	Oliguria aguda (diuresis < 0,5ml/kg/h durante al menos 2 horas a pesar de una adecuada reanimación con fluidos) .
	Aumento de creatinina > 0,5mg/dl o 44,2 $\mu\text{mol/L}$ .
	Anomalías en la coagulación (RIN > 1,5 o aPTT > 60 s).
	Íleo (ausencia de borborigmos).
	Trombocitopenia (recuento de plaquetas <100 000 $\mu\text{L}^{-1}$ ).
Perfusión tisular	Hiperlactatemia (>1mmol/L).
	Reducción en llenado capilar o moteado.

**Tabla 8:** Criterios para definir sepsis. DS: Desviación standard. Modificado de (110).

CRITERIOS SEPSIS GRAVE
Hipotensión inducida por sepsis.
Lactato por encima de los límites máximos normales de laboratorio.
Diuresis < 0,5ml/kg/h durante más de 2 h a pesar de una reanimación adecuada con fluidos.
Lesión pulmonar aguda con $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 250$ con ausencia de neumonía como foco de infección.
Lesión pulmonar aguda con $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$ por neumonía como foco de infección.
Creatinina > 2,0mg/dl (176,8 $\mu\text{mol/L}$ ).
Bilirrubina > 2mg/dl (34,2 $\mu\text{mol/L}$ ).
Recuento de plaquetas < 100 000/ $\mu\text{l}$ .
Coagulopatía (RIN > 1,5).

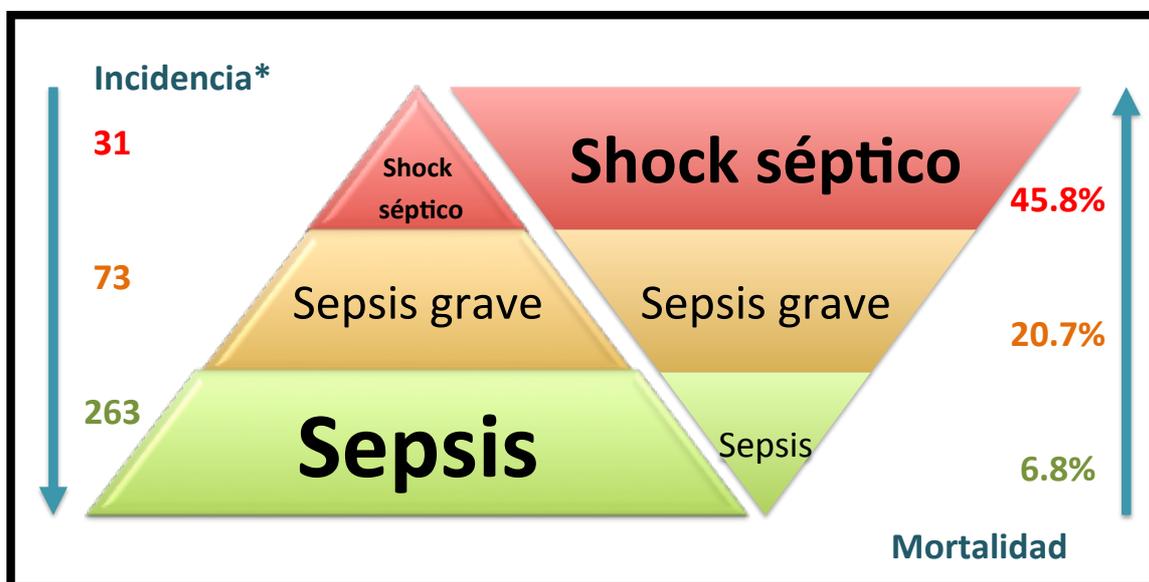
**Tabla 9:** Criterios de sepsis grave. Modificado de (110).

## SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA ACTUAL DE LA SEPSIS

La Incidencia de sepsis está aumentando por el envejecimiento de la población actual que se encuentra directamente relacionado con el crecimiento exponencial de pacientes con enfermedades crónicas, y al uso de fármacos inmunosupresores o que inducen a un estado de inmunosupresión, entre otras causas (112).

Se trata de una de las 10 primeras causas de muerte afectando a todos los rangos de edad, tanto en la comunidad y centros de cuidados sanitarios, como en pacientes ingresados en el hospital afectando a cualquier especialidad médica (111)(113).

La sepsis está asociada a una elevada mortalidad, alcanzando en su máximo grado de expresión – el shock séptico- una mortalidad que oscila entre un 40% y un 70% (111). Existen pocos estudios en España que reflejen los datos de incidencia y mortalidad de las diferentes categorías de gravedad de sepsis. El primero fue publicado en “*Critical Care Medicine*” por Palencia E. *et al* en 2007 donde se ponía de manifiesto la gravedad del shock séptico, alcanzando una mortalidad del 45,8% (Figura 19) (114). La sepsis provoca más de 300 casos por 100.000 habitantes anuales en España, y en EEUU ha pasado de provocar 621.000 casos en el año 2000 a más de 1.100.000 casos en el 2008 lo que supuso ese año un gasto en hospitalización por sepsis en torno a los 14.000 millones de dólares (115).



**Figura 19:** Incidencia y mortalidad en sepsis. \*N de casos por 100.000 habitantes anuales. Datos extraídos de (114).

Uno de los últimos estudios publicados sobre la epidemiología de la sepsis por Page DB. *et al* en “*Critical Care Medicine*”, indica que más del 60% de las sepsis son de origen comunitario, seguidas de las sepsis que se producen en centros de cuidados sanitarios y, en

ultimo lugar, las sepsis hospitalarias (11%). Sin embargo, la mortalidad se relaciona de forma inversa, siendo la sepsis hospitalaria la que se asocia con una mayor incidencia y mayores costes sanitarios al requerir mayor tiempo de hospitalización y estancia en unidades de cuidados intensivos (116).

La mayoría de los estudios describen a pacientes de edad avanzada, con comorbilidades como la patología respiratoria o cardiovascular crónica, diabetes o la inmunosupresión, como el grupo de mayor riesgo para desarrollar una sepsis ya sea de origen comunitario o nosocomial (117)(118). A nivel comunitario, adquiere gran importancia la sepsis de origen urinario ya que más de un tercio de los pacientes que acuden a servicios de urgencias con infección urinaria, y que requieren hospitalización, son posteriormente diagnosticados de SG o SS (119).

Los principales focos que dan lugar al desarrollo de sepsis son el respiratorio, abdominal y el genitourinario. En cuanto a la etiología, los microorganismos más frecuentemente aislados suelen formar parte de la flora saprofita del huésped, actuando como agentes oportunistas. Entre ellos destacan *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. aureus*, siendo la proporción entre gram negativos y gram positivos bastante equiparable aunque varía en función de la serie consultada. Por último, y en un porcentaje mucho más bajo, se encuentran las sepsis polimicrobianas o fúngicas (117)(120)(121).

El tratamiento de esta patología es muy difícil y es necesario generar nuevas y efectivas terapias para mejorar el pronóstico de esta enfermedad. Las últimas terapias probadas han sido: la proteína C activada, y el CytoFab, ambas sin beneficio clínico demostrado a través de un ensayo clínico (113).

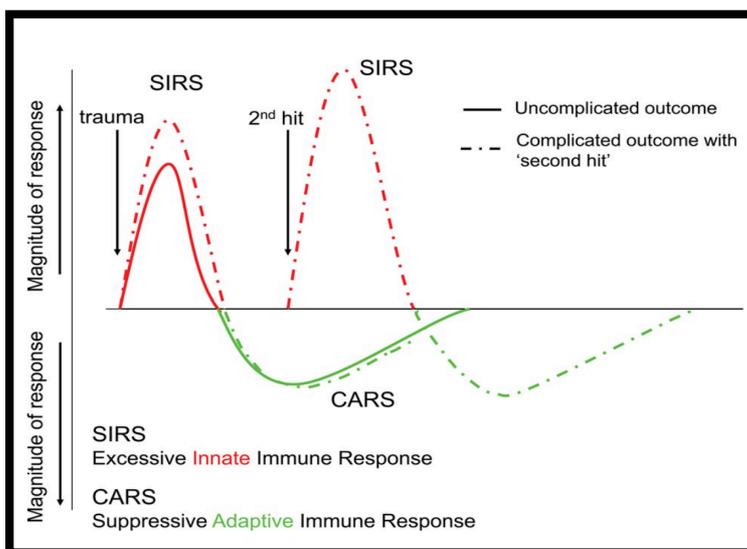
En cuanto a los pacientes que sobreviven a un proceso séptico, hasta el 20% son reingresados en un periodo no superior a 30 días. Si ampliamos este periodo a 6 meses, se alcanza un 48%, siendo la sepsis la causa más frecuente de reingreso. Esto tiene importantes repercusiones ya que haber sufrido un proceso infeccioso de estas características provoca déficits funcionales y cognitivos importantes, genera un estado de salud empeorado y por tanto, un perfil de riesgo mucho más acentuado. De hecho, se estima una mortalidad en torno al 8% de los pacientes reingresados. Se trata de un problema social y económico que debería ser profundamente investigado, incidiendo no solamente en medidas orientadas a la disminución de la mortalidad, sino también en evitar que se produzca esta patología tan grave detectando a los pacientes con mayor riesgo de padecerla (122)(123).

La última publicación de la Campaña para Sobrevivir a la Sepsis recoge los resultados de un estudio observacional multi-continental donde se incluyeron más de 1794 pacientes de 62 países diferentes con SG y SS, con el objetivo de analizar la adecuación del paquete de medidas propuesto por la SSC y su impacto sobre la mortalidad en función de su aplicabilidad. Los resultados muestran una notable diferencia en función del área geográfica así como una baja tasa de aplicación general. Los pacientes que recibieron estrictamente estas medidas tuvieron hasta un 40% menos de mortalidad (124).

### FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS: DOGMA CENTRAL Y NUEVAS PERSPECTIVAS

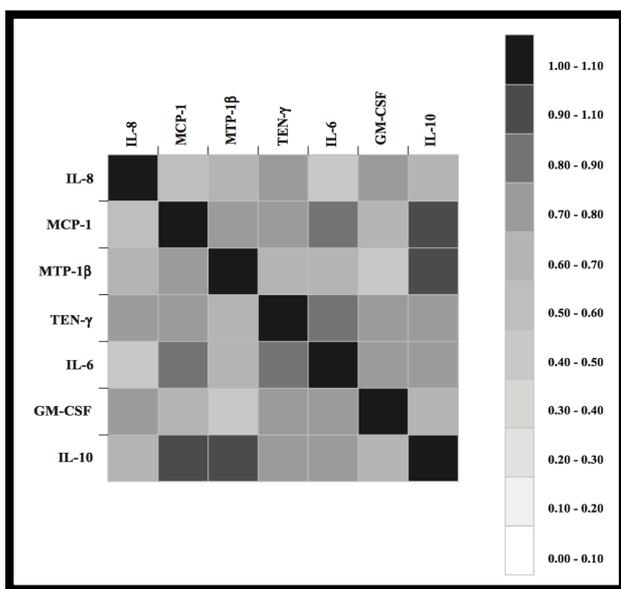
Los mecanismos fisiopatológicos que explican la sepsis son complejos y actualmente son discutidos en la comunidad científica sin tener una idea definida de que es lo que sucede. A lo largo del tiempo se han postulado diferentes teorías que expliquen esta patología. Los factores que van a influir en el desarrollo de una sepsis son dependientes del patógeno (inóculo infeccioso, factores de virulencia, etc.) y del huésped (edad, comorbilidades, condicionantes genéticos, etc.).

Inicialmente, se pensó que la sepsis generaba una respuesta pro-inflamatoria exagerada ante la presencia de un patógeno. Mas tarde, Bone R.C. *et al* estableció que en consecuencia a la excesiva inflamación, existía a continuación una fase anti-inflamatoria compensatoria (CARS- “Compensatory anti inflammatory response syndrome”). Estos se conoce como la **teoría clásica o bifásica** (Figura 20) (125).



**Figura 20:** Teoría clásica basado en una primera fase proinflamatoria seguida de una segunda fase anti-inflamatoria. Adaptado de (126).

Desde hace unos años, se piensa que ambas fases se producen al mismo tiempo con el objetivo de resolver lo más rápido posible el proceso infeccioso. La respuesta inflamatoria se encarga de eliminar de forma directa al patógeno aunque el exceso de inflamación produce daño tisular, y los mediadores anti-inflamatorios se encargan de limitar la diseminación a pesar de generar un estado inmunosupresor que aumenta la susceptibilidad del huésped a infecciones secundarias (127)(128). Tamayo E. *et al* publicaron un estudio de correlación de diferentes tipos de citoquinas pro y anti inflamatorias confirmando la existencia simultánea de ambas fases desde los primeros momentos del diagnóstico del SS (Figura 21) (129). La intensidad y duración de ambas fases dependerán de las características del patógeno y del huésped.



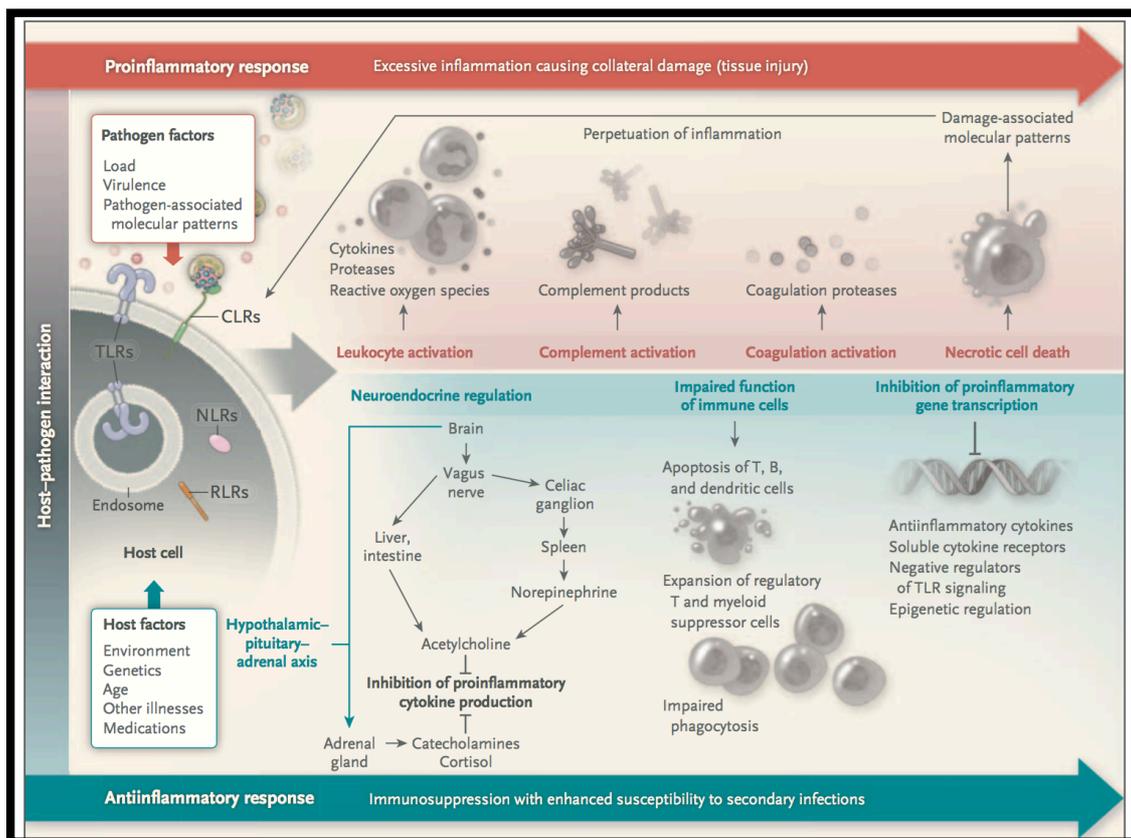
**Figura 21:** “Heat map” representando los coeficientes de correlación de Spearman significativos. Adaptado de (129).

La presencia de un estímulo infeccioso va a activar una serie de procesos inmunológicos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para el huésped. Los microorganismos presentes en el foco infeccioso presentan PAMPs que van a interactuar con los receptores de las células de la inmunidad innata reconociendo el antígeno y activando la secreción de mediadores proinflamatorios (TNF-α, IL-12, IL-8, MIP-1α, MIF, PAF, HMGP-1, leucotrienos, prostaglandinas, etc.). Esto da lugar a un aumento de la permeabilidad vascular que facilita el reclutamiento y acceso del sistema fagocítico mononuclear al tejido infectado. Se trata de una primera fase de respuesta local que intenta limitar la infección. Cuando el estímulo inicial no se puede controlar se da lugar a una respuesta inflamatoria a nivel sistémico dando lugar a una pérdida de la homeostasis por diferentes mecanismos donde el endotelio es el principal afectado (112)(113) (Figura 22):

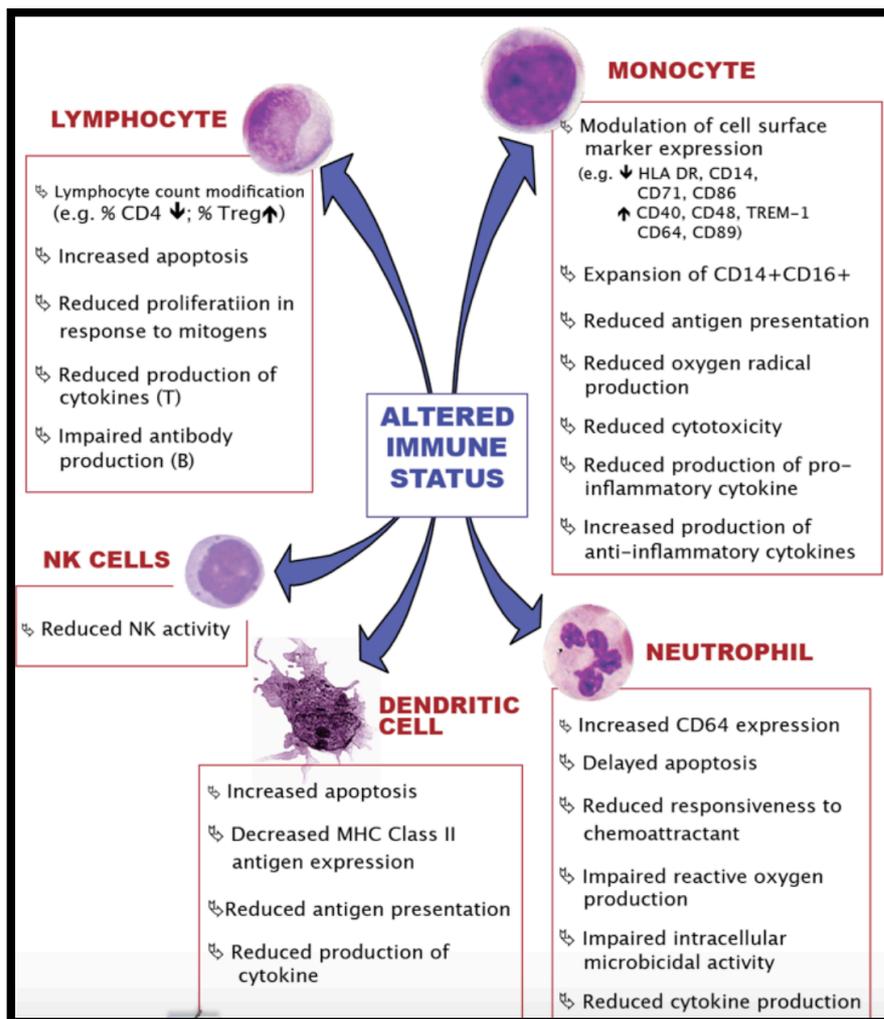
1. Alteración función inmune y liberación sistémica de mediadores pro- y antiinflamatorios: De forma simultánea, se liberan citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, y anti-inflamatorias como IL-10. El sistema inmune es incapaz de controlar la infección de manera que responde de forma exagerada. Existe evidencia de que estas alteraciones inmunológicas están presentes desde los primeros momentos del diagnóstico de sepsis (130). Se deprimen algunas funciones tanto de la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa pero sobre todo, existe una desregulación en la inmunidad celular. Disminuye el número de células NK, se ve alterada la presentación antigénica, aumento de apoptosis de linfocitos T CD4 pero aumentan los T reguladores (CD4+CD25+) que ejercen una acción inmunosupresora (Figura 23).

2. Producción NO y moléculas de adhesión endoteliales (integrinas, selectinas): Produce la agregación y activación leucocitaria.

3. Activación coagulación y disminución fibrinólisis: Producción de trombina (microtrombosis). Reducción de Proteína C, Proteína S, antitrombina III y TFPI (anticoagulantes). Incremento PAI-1 y TAFIa, y agotamiento t-PA (fibrinolíticos).



**Figura 22:** Respuesta inmunológica del huésped en la sepsis: Fases pro- y anti-inflamatorias de forma simultánea. Adaptado de (113).



**Figura 23:** Alteraciones celulares inmunológicas durante la sepsis. Adaptado de (131).

La consecuencia inmediata es la **disfunción del endotelio vascular**: se produce la rotura del endotelio provocando un incremento de la permeabilidad vascular que ocasiona pérdidas considerables de líquidos (edema), la vasodilatación descontrolada genera hipotensión, y todo esto da lugar a una hipoxia celular con aumento del lactato por metabolismo anaeróbico que conlleva al fallo de uno o más órganos pudiendo dar lugar a una **disfunción multiorgánica** que provoca el fallecimiento del paciente.

La **inmunoparálisis** se ha descrito como otro posible mecanismo que intenta explicar la fisiopatología de la sepsis. Existe un grupo de pacientes con déficits inmunológicos importantes tales como pérdida de marcadores de superficie celular como el HLA-DR, incapacidad de producir TNF- $\alpha$  o la incapacidad de presentar antígenos por monocitos y macrófagos. Esta depresión inmunológica hace que estos pacientes no sean capaces de aclarar el microorganismo y por tanto, haya un fallo en la resolución de la infección dando lugar a un

agravamiento del proceso y un aumento de la probabilidad de infecciones secundarias (132)(133).

Por último, se debe tener en cuenta la posible existencia de una **inmunosupresión previa** del huésped que haga que ante un proceso infeccioso de estas características no consiga resolverlo. Este es uno de los puntos que se deben tener en cuenta a la hora de valorar un paciente susceptible de padecer sepsis (pacientes añosos, que se vayan a someter a cirugías, pacientes que requieran de ventilación mecánica, o padezcan enfermedades graves de base). Sería fundamental el conocimiento del estado inmunológico previo de estos pacientes permitiendo tomar decisiones para la prevención de la sepsis y sus fatales consecuencias.

## Biomarcadores en el paciente con infección grave

---

### CONSIDERACIONES GENERALES: USOS Y REPERCUSIONES CLÍNICAS

Históricamente, los primeros biomarcadores de infección utilizados eran indicadores fisiológicos como la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca o la presión sanguínea. De hecho, las manifestaciones clínicas de los procesos infecciosos son a menudo inespecíficas y variables, y el diagnóstico resulta, en ocasiones, complicado. No fue hasta el siglo XX cuando se empezaron a evaluar y utilizar moléculas detectables en suero, plasma u otros tejidos para mejorar el diagnóstico o predecir el pronóstico. Actualmente, se utilizan marcadores cuantificables en sangre periférica (suero o plasma) y los más conocidos son la PCR o la PCT (134) que han demostrado ser muy útiles en el seguimiento del paciente grave.

Un biomarcador ideal debería cumplir las siguientes características: ser específico, poseer una elevada sensibilidad, fácil de medir, económico, rápido, que se correlacione con la clínica y evolución del paciente, y pueda predecir mortalidad. Es decir, se le debería de exigir una serie de condiciones que nos permitan: establecer un diagnóstico precoz, medir la gravedad y el riesgo, identificar a los pacientes con infección grave, evaluar el pronóstico o monitorizar la evolución en respuesta a un tratamiento determinado.

De esta forma, podemos clasificar los biomarcadores en función de su utilidad clínica: biomarcadores diagnóstico, biomarcadores pronóstico, biomarcadores con utilidad predictiva y biomarcadores respuesta (135).

En los últimos años, se ha desarrollado una importante inquietud en la búsqueda y validación de nuevas herramientas que faciliten el manejo de la infección grave.

### SCORES DE GRAVEDAD

Las escalas de gravedad son herramientas que recogen variables con el objetivo de ayudar a determinar un diagnóstico, pronóstico o de alguna manera, normalizar decisiones terapéuticas. Estas escalas tratan de resolver problemas que interesan a los profesionales sanitarios por su impacto en la supervivencia o evolución de los pacientes. Estas escalas se diseñan a partir de enormes bases de datos donde se incorporan las variables de mayor interés o de mayor impacto sobre el fenómeno a medir. Las variables que forman parte de un determinado “score” deben ser previamente ponderadas no solo a través de la opinión de expertos en la temática sino por métodos estadísticos que evalúen su utilidad. La validación por tanto, depende de la función que vaya a desarrollar dicha variable, y solo es aplicable al

grupo de población donde se haya evaluado. Habitualmente, las escalas deben cumplir dos características: la primera es la capacidad de predecir supervivencia, valorada por el área bajo la curva ROC (*“Receiver operating characteristic”*), que se conoce como calibración. En segundo lugar, la capacidad de discriminación o la exactitud de una predicción dada. La principal dificultad para la aplicación de estas escalas se debe a la variedad de los casos tratados. Las escalas impiden su utilización como ayuda para tomar una decisión individual, pero si dan una orientación de carácter general (136).

Los *“scores”* permiten una mejor definición y evaluación del estado de gravedad del paciente recogiendo múltiples parámetros, los más utilizadas son:

**APACHE-II (*“Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II”*)**: Sistema de valoración pronóstica de mortalidad a través de la medición de 12 variables fisiológicas que se puntúan y suman obteniendo un valor final que es predictivo de mortalidad. Se trata de una escala estática que se mide en el momento de ingreso de un paciente en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y se utilizan los peores valores obtenidos en las primeras 24 horas del ingreso (117).

**SAPS (*“Simplified Acute Physiology Score”*)**: Escala simplificada parecida al APACHE-II de valoración de gravedad. El cálculo se efectúa con los peores valores de las primeras 24 horas tras el ingreso del paciente en la UCI (118).

**SOFA (*“Sequential Organ Failure Assessment”*)**: Escala de evaluación dinámica utilizada para valorar la situación de seis órganos o sistemas (disfunción y fallo orgánico) (119)(120).

**MEDS (*“Mortality in Emergency Department Sepsis”*)**: Se trata de una escala de predicción de mortalidad a los 28 días que se utiliza en los servicios de urgencias en pacientes con sepsis mediante la valoración de ocho variables (121).

**IPS (*“Infection Probability Score”*)**: Se trata de una escala de predicción de infección donde se evalúan seis variables fácilmente medibles. Un resultado inferior a 14 reduce la probabilidad de infección a un 10% (137).

**CPIS (*“Clinical Pulmonary Infection Score”*)**: Se trata de una escala predictora de NAV donde se evalúan seis ítems relacionados con infección. Sirve como herramienta complementaria a otros marcadores diagnóstico pero presenta múltiples limitaciones ya que no tiene una buena sensibilidad ni especificidad tanto diagnóstica como pronóstica (138).

**Otros**: MPM-II (*“Mortality Prediction Model-II”*), PSI (*“Pneumonia Severity Index”*), etc.

**BIOMARCADORES EN INFLAMACION E INFECCION GRAVE**

Los servicios de urgencias hospitalarios reciben aproximadamente un 10% de consultas relacionadas con procesos infecciosos. Las decisiones diagnóstico-terapéuticas en pacientes con infecciones graves tienen una importante repercusión sobre su supervivencia. La rápida identificación de pacientes con infección grave con mayor riesgo de morir es uno de los principales problemas que han afectado a los profesionales médicos hospitalarios, sobre todo al intensivista ya que maneja a pacientes en estado crítico. En patologías como la sepsis, donde el tiempo es crucial, la administración de una terapia antimicrobiana correcta y rápida es vital (139).

Los biomarcadores más extensamente utilizados y de los que se tiene un conocimiento más amplio en inflamación e infección son la PCR y PCT.

La **proteína C reactiva** (PCR) fue descubierta por Tillet y Francis en 1930 como una molécula presente en el suero de pacientes con neumonía por *S. pneumoniae* que precipitaba con el polisacárido C de la pared celular del neumococo (140). De este fenómeno derivó su nombre: proteína C reactiva. Es liberada por los hepatocitos durante un proceso inflamatorio agudo tras la estimulación por IL-6 e IL-8. Es un marcador de referencia aunque presenta ciertas limitaciones como su farmacocinética que varía en función de edad, sexo, raza, o estilo de vida (tabaquismo, obesidad, alcohol), y su elevación tanto en procesos inflamatorios infecciosos como no infecciosos.

La **procalcitonina** (PCT) se describió por primera vez como precursor de la calcitonina, marcador tumoral en cáncer medular de tiroides. Se trata de una pro hormona sintetizada en la glándula tiroides y en células neuroendocrinas de pulmón. En condiciones normales, su concentración es prácticamente indetectable. En cambio, se ha descrito que la presencia de LPS y otros productos bacterianos impiden la hidrólisis de procalcitonina en calcitonina, y por eso en procesos bacteriémicos o sépticos, se eleva específicamente. Es de gran utilidad debido a que se eleva a las 4-6 horas post infección, tiene un pico máximo a las 12 horas de evolución y un aclaramiento en 20-36 horas por lo que permite tomar decisiones tempranas para el manejo de los pacientes con sepsis.

Muchos estudios han comparado estos dos biomarcadores, recalcando en su mayoría la superioridad tanto en sensibilidad como especificidad de la procalcitonina para diferenciar procesos sépticos de otros procesos no infecciosos, al igual que para diferenciar infección bacteriana de vírica, relevando la utilidad de la PCR a cuadros localizados (139). En la NAV es uno de los pocos biomarcadores que ha demostrado utilidad. En un meta-análisis realizado por

Sotillo-Díaz *et al* encontraron que niveles plasmáticos elevados de PCT se asociaban a una mayor probabilidad de desarrollar NAV (141), y los estudios de Pugh R. *et al* y Tang H. *et al* demostraron la utilidad de la PCT como biomarcador de evolución en el tratamiento antibiótico de la NAV (142)(143). Aun así, existe mucha variabilidad en los diferentes estudios publicados abarcando una diferencia de sensibilidad para la PCT entre el 40% y el 100% (144).

La **NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA** es una patología en la que existe una gran necesidad de identificar biomarcadores. La clínica parece ser bastante sensible pero no lo suficientemente específica. Además, la identificación del agente causal y la susceptibilidad antibiótica puede llevar varios días de procesamiento a pesar de las nuevas tecnologías disponibles en los laboratorios (espectrometría de masas, PCR a tiempo real, técnicas de hibridación, etc.). El CPIS parece aumentar la especificidad cuando se obtiene un “score” superior a 6 pero aún no es suficiente. Entre los biomarcadores que se están estudiando para mejorar el diagnóstico y pronóstico de NAV se encuentra el **receptor de superficie expresado en las células mieloides (sTREM1)**. Se trata de una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que aumenta su expresión en presencia de antígenos bacterianos o fúngicos, y en otros procesos inflamatorios. Se puede medir en diferentes fluidos corporales y aumenta de forma significativa en pacientes infectados. No hay mucha literatura al respecto, y los pocos estudios muestran una importante variabilidad donde uno de los factores limitantes parece ser el consumo previo de antibióticos antes de obtener el lavado broncoalveolar. Actualmente, no existen datos suficientes para establecer la relación de este marcador con la NAV (144)(145).

La **pentraxina 3 (PTX3)** es una proteína liberada principalmente por neutrófilos y células dendríticas ante estímulos inflamatorios. Hasta el momento, se ha probado en cohortes pequeñas de pacientes con NAV y aunque parece aumentar la especificidad con respecto a la PCR, se necesitan series más largas para evaluar su utilidad (146).

La **neopterina** es un marcador de infección vírica con buena sensibilidad y especificidad que se eleva de forma más acentuada que en la infección bacteriana. Su utilidad se ha demostrado sobre todo en procesos respiratorios (especialmente en la neumonía). Entre sus limitaciones se encuentra que su pico máximo se detecta a partir de las 72 horas de la infección y que puede elevarse en infecciones respiratorias por bacterias intracelulares, así que es importante utilizarlo junto con otros biomarcadores que complementen el diagnóstico.

Otros biomarcadores como perfiles de citoquinas se están estudiando donde la **IL-8** o **IL-1 $\beta$**  pueden tener un papel relevante (147).

Por último, la tecnología de los **microarrays** también parecen ser prometedoras en el campo de los biomarcadores. Martin-Loeches *et al* observaron en 2012 una disminución en la expresión de los genes relacionados con la activación del complemento en pacientes que desarrollaban NAV con respecto de pacientes con traqueobronquitis, siendo el perfil de expresión génica un prometedor marcador predictivo de NAV (148). Recientemente, Xu X. *et al* han detectado un conjunto de genes diferencialmente expresados en pacientes con NAV que, aunque necesitan ser validados en cohortes con más pacientes, pueden ayudar a explicar la fisiopatología de NAV y constituir nuevas dianas diagnósticas (149).

Como se puede observar en la literatura, la gravedad del cuadro de NAV requiere del estudio de nuevas moléculas que permitan un mejor diagnóstico ya que actualmente ningún marcador cumple completamente las expectativas.

La utilidad de **BIOMARCADORES EN LA SEPSIS** radica en la necesidad médica de establecer un diagnóstico para facilitar la toma de decisiones clínicas. El tiempo en la sepsis es vida, y por cada hora de retraso en la administración de un correcto tratamiento antibiótico, aumenta un 8% el riesgo de muerte (150). Se trata de una patología crítica en la que se necesitan herramientas rápidas y precisas.

A parte de la PCT y la PCR, otros biomarcadores son utilizados para definir el diagnóstico y pronóstico de la sepsis (139):

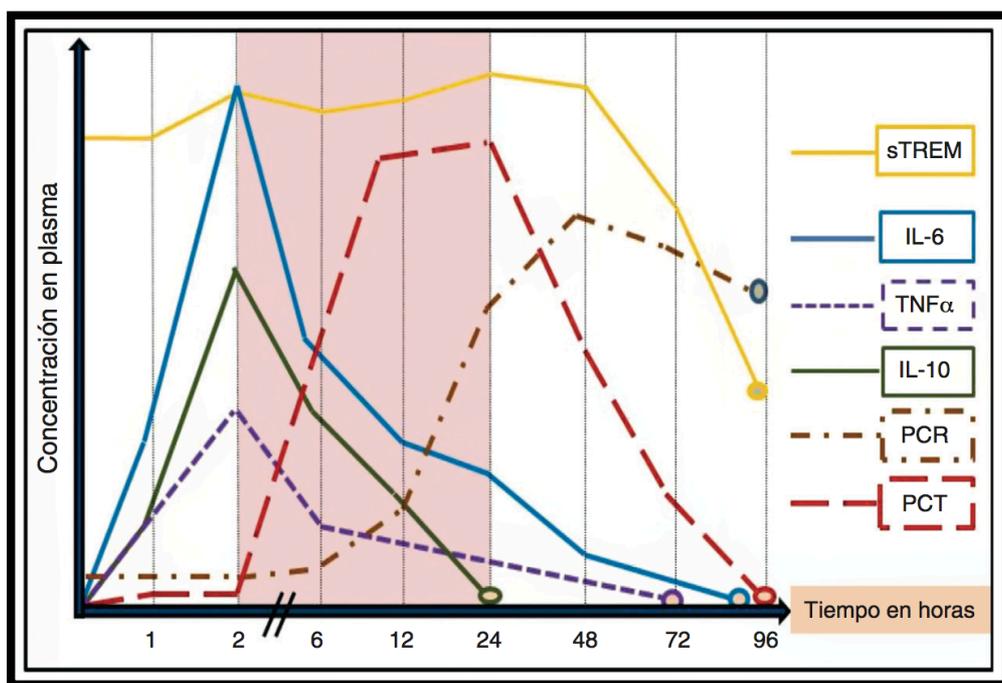
La elevación del **lactato** supone la confirmación de hipoxia e hipoperfusión tisular consecuencia del metabolismo anaerobio propio de los procesos sépticos. La elevación del lactato ha demostrado ser útil como marcador de mala evolución clínica y mortalidad. Su monitorización se ha relacionado con el pronóstico, disminuyendo la mortalidad hasta un 11% en aquellos pacientes con un aclaramiento de lactato del 10% en las seis primeras horas. Recientemente se han descrito importantes funciones de la **pro-adrenomedulina (proADM)** tanto en la sepsis como en la NAC. La adrenomedulina fue descrita por primera vez como un potente vasodilatador en 1993 por Kitamura *et al* (151). Su concentración plasmática en condiciones normales es muy baja, habiéndose evidenciado aumento en procesos patológicos relacionados con patología cardiovascular, renal, respiratoria y sepsis. Como biomarcador se utiliza la porción media de la proADM debido a que presenta mayor estabilidad. La síntesis y secreción de adrenomedulina está regulada por citoquinas inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), LPS, hormonas (glucocorticoides, angiotensina II, aldosterona, etc.), y otros factores como hipoxia, isquemia, el estrés oxidativo y la hiperglucemia (152). En el SS se ha descrito una disminución de su aclaramiento, y un aumento de producción por la estimulación citoquinica

lo que eleva significativamente los niveles plasmáticos. Igualmente, la proADM parece ser de gran utilidad para predecir la gravedad de pacientes sépticos, permitiendo estratificar el riesgo y el pronóstico de la sepsis. Los valores de proADM son significativamente más elevados en los pacientes sépticos que fallecen, comparándolos con los supervivientes con diferentes grados de gravedad en sepsis (sepsis, SG o SS) (153)(154)(155).

La **Interleucina 6** junto con la **interleucina 8** han demostrado utilidad para distinguir sepsis de SIRS, y por su poder predictivo de mortalidad. Es utilizada sobre todo en población pediátrica ya que los niveles fisiológicos de procalcitonina en este conjunto son superiores a los de la población adulta.

**Otros marcadores citoquínicos:** Existen múltiples moléculas que han demostrado cierta utilidad como biomarcadores en la sepsis. Algunos como la IL-10, IL-18, TNF- $\alpha$ , MIF o MCP-1 están elevados en pacientes con sepsis que fallecen cuando son comparados con los supervivientes. Otros como RANTES o MIP-1 y 2 están elevados en pacientes que padecen sepsis en comparación con controles sanos. Finalmente, algunos como IL-2, IL-4, IL-13 y GRO- $\alpha$  nos permiten estratificar el riesgo estando más elevados en pacientes con SS, o asociarlos a una mayor gravedad (receptor antagonista de la IL-1 o IL-8) (156). Por último, Andaluz-Ojeda D. *et al* han descrito una combinación de cuatro citoquinas pro- y antiinflamatorias (IL-6, IL-8, MCP-1, e IL-10) que están asociadas con un peor pronóstico en pacientes con sepsis (157).

Es fundamental el conocimiento de la cinética de los biomarcadores (concentración plasmática máxima, vida media, etc.) para monitorizar el proceso patológico y aprovechar al máximo su utilidad diagnóstica, pronóstica o de cualquier otra finalidad (Figura 24).



**Figura 24:** Cinética de los principales biomarcadores en inflamación e infección. Adaptada de (139).

Otros biomarcadores en investigación (158):

**CD163** es una proteína transmembrana que forma parte de células fagocíticas y regula la expresión de citoquinas como IL-10. Niveles plasmáticos de esta proteína parecen estar relacionados con procesos inflamatorios y sus aplicaciones clínicas parecen estar orientadas a la evaluación del pronóstico en sepsis. Los **microARNs** son nuevas dianas de investigación en sepsis. Se trata de moléculas de ARN no codificantes formados por aproximadamente 22 nucleótidos bastante estables en diferentes fluidos corporales. Parecen desempeñar un importante papel inhibiendo ARNs mensajeros y concretamente, la molécula miR-150 podría estar relacionada con disfunciones inmunológicas y constituir un nuevo mecanismo fisiopatológico para explicar la sepsis.

A continuación, se agrupan los principales biomarcadores de infección grave y su utilidad pronóstica y/o diagnóstica en inflamación e infección (Tabla 10):

BIOMARCADOR	CAPACIDAD DIAGNÓSTICA <sup>A</sup>	CAPACIDAD PRONÓSTICA <sup>B</sup>	OTROS <sup>C</sup>	OBSERVACIONES
<i>Citoquinas</i>				
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	++	-	Permite distinguir entre supervivientes y fallecidos a los 28 días en pacientes con SS.
<b>IL-6</b>	+++	+++	+	Relacionado con gravedad (SG-SS), mala evolución (FMO), mortalidad a los 28 días, sepsis neonatal y en pacientes pediátricos. Utilidad en neutropénicos.
<b>IL-8</b>	++	+++	+	
<b>IL-10</b>	+	+	-	Relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a 28 días.
<b>IL-12</b>	+++	++	-	Relacionado con infección bacteriana y sepsis, más en pacientes pediátricos.
<i>Proteínas de fase aguda</i>				
<b>PCR</b>	+++	++	+	Relacionado con infección bacteriana, sepsis, gravedad (SG-SS), bacteriemia, mala evolución, mortalidad, como guía de tratamiento antimicrobiano.
<b>PCT</b>	+++++	++++	+++	Relacionado con infección bacteriana, sepsis, gravedad (SG-SS), mortalidad, bacteriemia, mala evolución (FMO), guía de tratamiento antimicrobiano (sepsis, NAC, EPOC), evolución, Utilidad en: neutropénicos, pacientes onco-hematológicos, reumatológicos, con insuficiencia renal o hepática. Asociación con escalas pronosticas de gravedad. Orientación de etiología microbiana específica (NAC, meningitis). Biomarcador con mayor poder diagnóstico.
<b>ET1 y Pro-ET1</b>	-	++	-	Mortalidad a los 28 días y correlación con SOFA
<i>Receptores solubles</i>				
<b>sTREM1</b>	++	+++	+	Relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a los 28 días.
<b>CD14</b>	-	+	-	Mortalidad a los 28 días.
<b>CD64</b>	+++	++	-	Diferenciación sepsis y SIRS con buena especificidad. Correlación con APACHE-II y SOFA.
<b>CD11b</b>	+++	+	-	Diferenciación sepsis y SIRS con buena especificidad y sensibilidad. Utilidad en neonatos.
<i>Factores coagulación</i>				
<b>Trombopenia</b>	-	++	+	Predice FMO y mortalidad 28 días.
<b>Dímero D</b>	-	+++	-	Relacionado con la gravedad (SG-SS), mala evolución (FMO, CID), APACHE II y mortalidad a los 28 días.
<b>TTPa</b>	+	++	-	Correlación con FMO, CID y mortalidad.
<b>AT-III</b>	-	++	-	Predice FMO y mortalidad.
<b>Proteínas C y S</b>	-	++	-	La reducción de proteínas C y S predicen mala evolución y mortalidad.
<i>Daño vascular</i>				
<b>Endocan</b>	++	++	-	Relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a los 28 días.
<b>Neopterinina</b>	+	++	++	Se relaciona con infección vírica y mortalidad a los 28 días, Orientación etiológica en NAC.
<i>Continúa.</i>				

<i>Continuación.</i>				
<b>Pro-ADM</b>	+	+++++	+	Relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a los 3, 28, 90, 180 días. Asociación con escalas pronósticas de gravedad en NAC. Es el biomarcador con mayor poder pronóstico de mortalidad.
<b>Pro-ANP</b>	-	++	-	Relacionado con mortalidad a los 28 días en pacientes con SS con depresión miocárdica y distensión auricular. Disfunción orgánica
<b>Copeptina</b>	-	++	-	Mortalidad a los 28 días y correlación con APACHE-II.
<b>Oxido nítrico</b>	+	++	-	Relacionado con gravedad (SG-SS).
Otros				
<b>Fosfolipasa A II</b>	+++	+++	-	Relacionado con sepsis y bacteriemia con sensibilidad y especificidad > 90%. Mortalidad a los 28 días.
<b>Lactato</b>	-	+++++	+	Mejor marcador de hipoperfusión e hipoxia tisular. Predictor de mala evolución, gravedad (SG-SS) y mortalidad.
<b>Complemento (C3, C4, C5a)</b>	+	++	-	Mortalidad a los 28 días.

**Tabla 10:** Principales biomarcadores de utilidad en la infección grave. <sup>A</sup>Capacidad diagnóstica de infección bacteriana y/o sepsis sobre infección viral y otras causas de SIRS; <sup>B</sup>Capacidad pronóstica de mala evolución, desarrollo de SG o SS y mortalidad; <sup>C</sup>Otras utilidades como monitorización clínica o guía de terapia antibiótica. Modificado de (156)(139).

#### UTILIDAD DEL HEMOGRAMA COMO BIOMARCADOR

El hemograma es una prueba analítica realizada de forma sistemática en los laboratorios de los servicios hospitalarios asistenciales. Se trata de una herramienta ampliamente conocida, rápida, disponible las 24 horas del día y económicamente rentable. La fórmula leucocitaria recoge las principales subpoblaciones celulares alteradas en procesos patológicos.

Históricamente, las alteraciones del hemograma y su interpretación han ayudado a establecer un diagnóstico tanto de etiología infecciosa como no infecciosa. La extensa literatura avala la importancia de las variaciones que se observan en un sistemático sanguíneo relacionadas con enfermedades infecciosas. La leucocitosis con neutrofilia (desviación izquierda) generalmente en infecciones bacterianas, acompañada de eosinofilia en los casos de escarlatina, o de trombocitopenia en meningococemia. Otras veces, las infecciones cursan con leucopenia que si está acompañada de desviación izquierda podría ser compatible con cuadros de fiebre tifoidea o brucelosis. La linfocitosis con o sin leucocitosis suelen ser compatibles con infecciones virales, y alteraciones en los eosinófilos han sido asociadas con

infecciones parasitarias (159). De forma mas excepcional, la basofilia se ha relacionado con infecciones virales como varicela o gripe (160).

No cabe duda de que el hemograma ha servido y sirve como herramienta diagnóstica pero sus características operacionales (sensibilidad y especificidad) son limitadas. Sin embargo, recientemente se han publicado estudios sobre el valor de las subpoblaciones leucocitarias que han suscitado gran interés científico ya que su utilidad parece estar orientada al diagnóstico y pronóstico de la infección grave.

La evaluación del ratio neutrófilo/linfocito como marcador infeccioso parece estar dando buenos resultados: Jager CP. *et al* publicaron en un estudio de casos y controles con más de 90 pacientes pareados provenientes del servicio de urgencias, que la linfopenia y el ratio N/L eran mejores predictores de bacteriemia que otros más habitualmente utilizados como la PCR (161). Posteriormente, evaluaron el ratio N/L en pacientes con NAC donde establecieron que un ratio superior a 10 estaba asociado a un peor pronóstico (entendido como aumento de mortalidad y estancia hospitalaria) (162). Wibrow BA. *et al* publicaron un estudio de casos y controles con pacientes adultos y pediátricos donde la eosinopenia era indicativa de bacteriemia (163). La leucocitosis y eosinopenia en cuadros inflamatorios sistémicos están fuertemente relacionadas con infecciones bacterianas según Gil H. *et al* (164). Nuestro grupo, en un estudio de pacientes con shock séptico evidenció que una concentración de neutrófilos igual o por debajo de  $7.226,5$  células/mm<sup>3</sup> en las primeras 24 horas desde el momento del diagnóstico del shock séptico, se asociaba con mayor riesgo de mortalidad en los primeros 28 días (165).

Por tanto, el estudio de las subpoblaciones leucocitarias parecen tener un enorme potencial que puede extenderse a otras células y parámetros inmunológicos relacionados con la fisiopatología que nos permitan mejorar la caracterización de la infección grave. El estudio de nuevos biomarcadores supone un avance y una mejora en la toma de decisiones que afectan al tratamiento, pronóstico y evolución de estos pacientes. El tiempo es un parámetro crítico en estos casos y por tanto, la aparición de nuevos biomarcadores que nos permitan adelantarnos a situaciones muchas veces irreversibles, supone una mejora en la calidad asistencial a nivel hospitalario, reduciendo tasas de mortalidad y los costes económicos que esta problemática genera.

En esta tesis doctoral demostramos el valor de marcadores sencillos relacionados con el sistema inmune tales como la concentración de eosinófilos o la concentración de inmunoglobulinas plasmáticas para predecir el pronóstico del paciente con infección grave.



***V- Hipótesis y objetivos***

---



## **HIPÓTESIS**

---

La utilización de herramientas simples para el estudio del sistema inmunológico, como el hemograma y la concentración de inmunoglobulinas plasmáticas, tiene utilidad clínica para predecir el pronóstico en pacientes con infección grave.



## OBJETIVOS PRINCIPALES

---

1. Evaluar la influencia de la concentración de las subpoblaciones leucocitarias en sangre periférica en el pronóstico de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.
2. Evaluar la utilidad de los niveles de inmunoglobulinas plasmáticas para predecir el pronóstico en pacientes con sepsis grave y shock séptico.

## OBJETIVOS SECUNDARIOS

---

1. Describir las características clínicas de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.
2. Describir las características clínicas de pacientes con sepsis grave y shock séptico.
3. Definir puntos de corte para las subpoblaciones leucocitarias e inmunoglobulinas plasmáticas para predecir el pronóstico en estas patologías.
4. Evaluar potenciales factores de confusión que influyan en la capacidad pronóstica de los biomarcadores identificados.



## ***VI- Material y métodos***

---



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Primer estudio: Cohorte NAV

#### DISEÑO DEL ESTUDIO

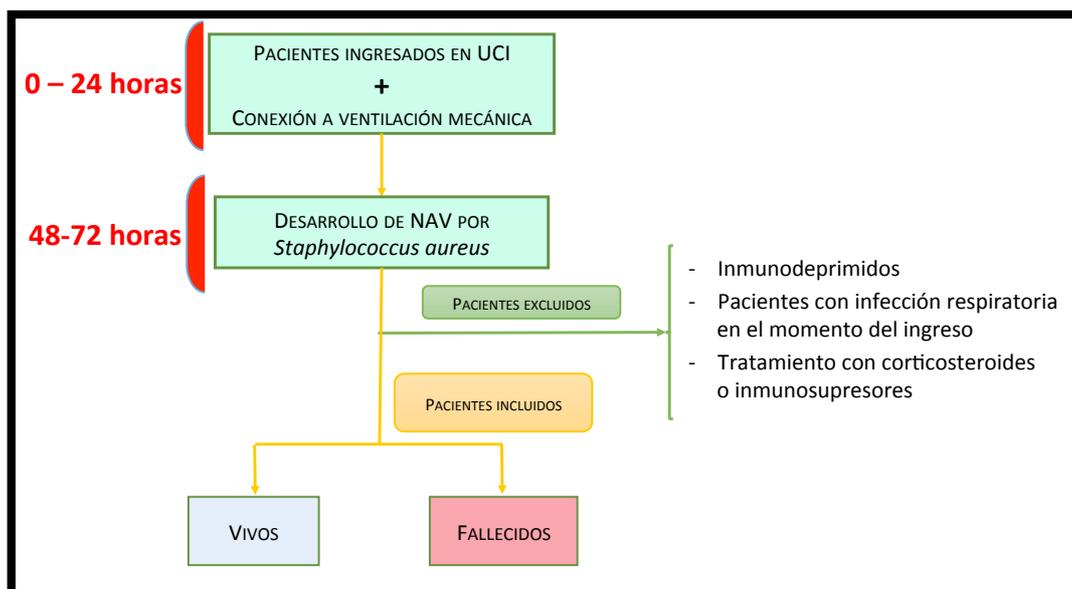
Se trata de un estudio retrospectivo observacional donde se recogieron datos demográficos, clínicos y de laboratorio correspondientes de pacientes ingresados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV) durante el periodo 2006-2011 y que desarrollaron neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.

#### PACIENTES

El equipo investigador definió una serie de requisitos para la selección de los pacientes que formaron parte del estudio:

**Criterios de inclusión:** se incluyeron todos aquellos pacientes adultos ( $\geq$  de 18 años de edad) que ingresaron en la UCI del HCUV, que requirieron intubación en el momento del ingreso y que posteriormente desarrollaron NAV por *Staphylococcus aureus* (Figura 25).

**Criterios de exclusión:** todos aquellos pacientes con una edad menor de 18 años, pacientes que presentaban síntomas clínicos de infección respiratoria en el momento del ingreso, en tratamiento con fármacos inmunosupresores o corticoides, así como pacientes inmunodeprimidos (Figura 25).



**Figura 25:** Representación esquemática del diseño del estudio de NAV por *Staphylococcus aureus*. Criterios de inclusión y exclusión.

**RECOGIDA DE DATOS**

Las características demográficas junto con los datos clínicos y de laboratorio, tanto microbiológicos como analíticos de los pacientes, fueron recogidos en una base de datos formato excel (.xlsx) y formato SPSS (.sav) para su posterior análisis bioestadístico. Las variables de interés clínico fueron recogidas de las historias clínicas tanto informatizadas como en formato papel a través del programa interno de historias clínicas y del servicio de registro del HCUV respectivamente. Los datos microbiológicos y analíticos fueron obtenidos de los programas Microb dynamic (Francisco Soria Melguizo S.A) y Omega 3000/4000 (Roche Diagnostics®) respectivamente.

**VARIABLES DE ESTUDIO**

**VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS:** Las variables recogidas fueron edad, sexo, antecedentes personales (diabetes (tipo I o tipo II), enfermedad cardiovascular, insuficiencia renal crónica, enfermedad respiratoria crónica, enfermedad cerebrovascular, hábito tabáquico, enfermedad neurológica, hipertensión, cáncer hematológico, cirrosis hepática, metástasis, enfermedad gastrointestinal, quimioterapia, consumo de alcohol, usuario de drogas por vía parenteral, obesidad y dislipemia) y días en ventilación mecánica. Se incluyó la valoración de la situación de gravedad en el momento del ingreso en UCI expresada mediante el “score” APACHE-II donde se incluyen múltiples parámetros recogidos en la Tabla 11. Se recogieron igualmente las fechas del ingreso en UCI, la fecha de diagnóstico de NAV y la fecha de fallecimiento.

Puntuación APACHE II									
APS	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Tª rectal (°C)	> 40,9	39-40,9		38,5-38,9	<b>36-38,4</b>	34-35,9	32-33,9	30-31,9	< 30
Pres. arterial media	> 159	130-159	110-129		<b>70-109</b>		50-69		< 50
Frec. cardíaca	> 179	140-179	110-129		<b>70-109</b>		55-69	40-54	< 40
Frec. respiratoria	> 49	35-49		25-34	<b>12-24</b>	10-11	6-9		< 6
Oxigenación:	> 499	350-499	200-349		<b>&lt; 200</b>				
Si FiO2 ≥ 0.5 (AaDO2)					<b>&gt; 70</b>	61-70		56-60	< 56
Si FiO2 ≤ 0.5 (paO2)									
pH arterial	> 7,69	7,60-7,69		7,50-7,59	<b>7,33-7,49</b>		7,25-7,32	7,15-7,24	< 7,15
Na plasmático (mmol/l)	> 179	160-179	155-159	150-154	<b>130-149</b>		120-129	111-119	< 111
K plasmático (mmol/l)	> 6,9	6,0-6,9		5,5-5,9	<b>3,5-5,4</b>	3,0-3,4	2,5-2,9		< 2,5
Creatinina * (mg/dl)	> 3,4	2-3,4	1,5-1,9		<b>0,6-1,4</b>		< 0,6		
Hematocrito (%)	> 59,9		50-59,9	46-49,9	<b>30-45,9</b>		20-29,9		< 20
Leucocitos (x 1000)	> 39,9		20-39,9	15-19,9	<b>3-14,9</b>		1-2,9		< 1
<b>Suma de puntos APS</b>									
<b>Total APS</b>									
<b>15 - GCS</b>									
<b>EDAD</b>	<b>Puntuación</b>	<b>ENFERMEDAD CRÓNICA</b>		<b>Puntos APS (A)</b>	<b>Puntos GCS (B)</b>	<b>Puntos Edad (C)</b>	<b>Puntos enfermedad previa (D)</b>		
≤ 44	0	Postoperatorio programado	2						
45 - 54	2	Postoperatorio urgente o Médico	5						
55 - 64	3								
65 - 74	5								
≥ 75	6								
				<b>Total Puntos APACHE II (A+B+C+D)</b>					
				Enfermedad crónica:					
				Hepática: cirrosis (biopsia) o hipertensión portal o episodio previo de fallo hepático					
				Cardiovascular: Disnea o angina de reposo (clase IV de la NYHA)					
				Respiratoria: EPOC grave, con hipercapnia, policitemia o hipertensión pulmonar					
				Renal: diálisis crónica					
				Inmunocomprometido: tratamiento inmunosupresor inmunodeficiencia crónicas					

Tabla 11: Esquema para el cálculo del score de gravedad APACHE-II.

**VARIABLES DE LABORATORIO:**

*Datos microbiológicos:* A través del sistema de información de laboratorio del Servicio de Microbiología e Inmunología del HCUV se obtuvo la relación de pacientes con aislamiento de *S. aureus* en muestras del TRI y la susceptibilidad antibiótica a la oxacilina.

*Datos analíticos:* El auto-analizador empleado para la realización del sistemático de sangre (hemograma) fue el Sysmex XE-5000 (Roche Diagnostics®) que usa la citometría de flujo fluorescente con diodo laser como tecnología para medir y diferenciar tipos celulares tanto en sangre como en otros fluidos corporales (Figura 26). La medición de la fluorescencia revela la proporción núcleo-citoplasma de cada célula teñida individualmente, permitiendo diferenciar las subpoblaciones leucocitarias. La combinación de dispersión lateral (complejidad celular interna), dispersión frontal (volumen) y fluorescencia de los ácidos nucleicos determina la clasificación de cada leucocito.

Las **VARIABLES ANALÍTICAS** recogidas fueron todas aquellas incluidas en el “score” APACHE-II, para su cálculo en aquellos pacientes de los que no se disponía del valor, y los porcentajes de las subpoblaciones leucocitarias tanto en el momento del ingreso en UCI como en el momento del diagnóstico de NAV. Se calcularon las concentraciones de las subpoblaciones leucocitarias (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos) a partir de los porcentajes, y el número total de leucocitos totales de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Si existían varios hemogramas del mismo día, se seleccionó aquel con mayor número de leucocitos totales.



**Figura 26:** Auto-analizador Sysmex XE-5000 (Roche Diagnostics®).

### DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La NAV se define como aquella neumonía que se produce al menos 48-72 horas después de la intubación endotraqueal y se caracteriza por la presencia de nuevo o aumento de infiltrado radiográfico asociado a dos o más de los siguientes criterios:

- a) Temperatura superior a 38,5 °C o inferior a 36,5 °C.
- b) Leucocitos por encima de 12000/ $\mu$ l o por debajo de 4500/ $\mu$ l.
- c) Aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar purulento.
- d) Aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar positivo ( $\geq 10^6$  UFC/ml).

Esta definición corresponde a los criterios propuestos por el CDC (166).

Los procedimientos diagnósticos descritos fueron corroborados con los servicios implicados.

### DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

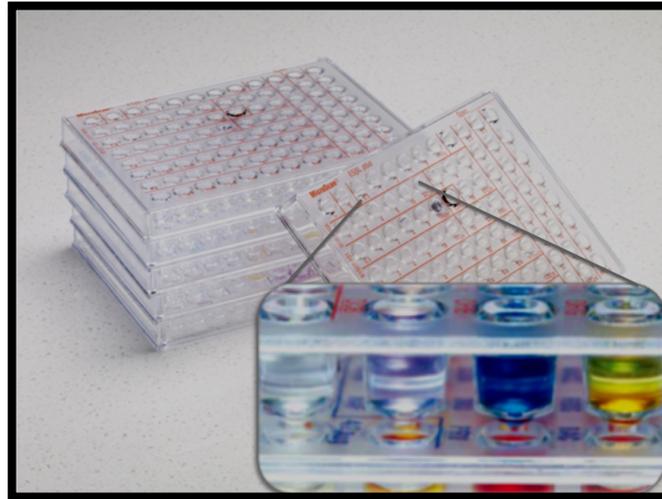
El diagnóstico microbiológico se realizó de acuerdo a los protocolos internos de laboratorio basados en el cultivo cuantitativo de las muestras obtenidas del TRI (aspirado endotraqueal, -BAS o lavado broncoalveolar, -BAL). Para ello, cada muestra se cultivó en los siguientes medios: agar Sangre, agar Chocolate, agar McConkey, agar Chapman y agar Saboraud-Cloramfenicol.

La identificación microbiana se realizó mediante técnicas fenotípicas y/o proteómicas incluyendo la espectrometría de masas MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight") (Bruker®) (Figura 27).



**Figura 27:** Espectrómetro de masas (MALDI-TOF, Bruker®) para identificación.

Para la realización del antibiograma se utilizaron paneles de microdilución deshidratados comerciales y la lectura se realizó de forma automatizada por el sistema Wider (Francisco Soria Melguizo S.A) (Figura 28). Para determinar si se trataba de una cepa SAMR o SAMS, se utilizó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de oxacilina presente en el panel y se interpretó mediante reglas del “*Clinical and Laboratory Standard Institute*” (CLSI) lo que supone que con una CMI  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ , la cepa de estudio es resistente a la oxacilina, y por tanto definida como SAMR.



**Figura 28:** Panel de microdilución para evaluar la susceptibilidad antibiótica de una cepa bacteriana.

#### ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO

Para el análisis bioestadístico de los datos se utilizó el programa SPSS para Windows versión 20.0 (IBM-SPSS, Chicago, Illinois, USA).

Los datos correspondientes a variables cuantitativas se expresaron en mediana y rango intercuartilico (RIC) ya que en este trabajo se emplearon test no paramétricos. Las variables cualitativas se presentaron según su distribución de frecuencias: número absoluto (n) y %.

Los datos demográficos y las características clínicas de los pacientes se analizaron comparando los dos grupos (supervivientes y fallecidos) mediante el test Chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) para variables categóricas y el test U-Mann-Whitney para variables continuas.

Se crearon *ratios* que relacionaban entre si las principales subpoblaciones leucocitarias que participan en los procesos infecciosos (neutrófilos, monocitos y linfocitos): ratio N/L, ratio N/M, ratio L/N, ratio L/M, ratio M/N, ratio M/L.

Los valores absolutos de todas las subpoblaciones leucocitarias se utilizaron en el análisis comparativo entre grupos y solo se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en los eosinófilos.

Se calcularon los incrementos en el número de eosinófilos definidos como la diferencia entre la concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico y la concentración de eosinófilos en el ingreso en UCI. Posteriormente, los valores obtenidos se compararon entre los grupos de supervivientes y fallecidos.

Se calcularon los percentiles de la concentración de eosinófilos transformando dicha variable cuantitativa en categórica, y así poder estimar el punto de corte significativo en el estudio de supervivencia.

El estudio de supervivencia se realizó analizando la mortalidad a 28 días mediante el test de Kaplan-Meier, comparando los percentiles de la concentración de eosinófilos mediante el test log Rank y representando gráficamente las curvas de supervivencia.

Se obtuvo el Hazard Ratio (HR) y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) mediante regresión de Cox para evaluar la influencia de los incrementos de los eosinófilos y los valores absolutos de eosinófilos en la mortalidad en función del tiempo.

El análisis multivariante se realizó mediante un método de selección de variables por pasos denominado: análisis de Wald.

Los valores con  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### **COMITÉ ÉTICO. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

La aprobación tanto científica como ética del protocolo de estudio se obtuvo de la *Comisión de Investigación y el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC)* del HCUV.

Los datos fueron tratados de manera confidencial y anónima. No se obtuvo el consentimiento informado debido a la naturaleza observacional del estudio.

## Segundo estudio: Cohorte sepsis (Estudio GRECIA)

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo multicéntrico promovido por el grupo GRECIA (Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos) donde se incluyeron nueve UCIs generales pertenecientes al Sistema Nacional de Salud de Castilla y León (SACYL), desde Enero a Diciembre de 2012.

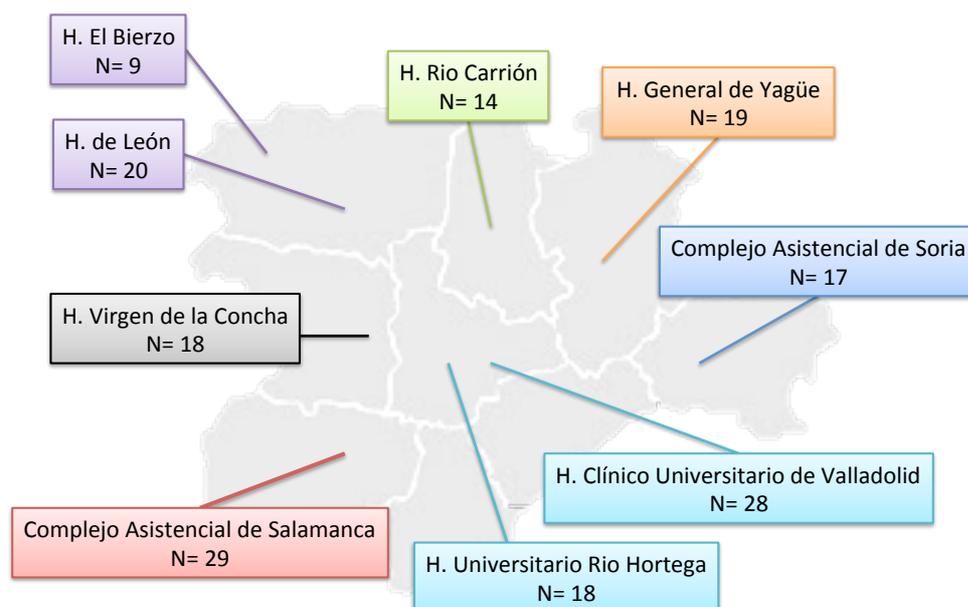
### PACIENTES

Se seleccionaron todos los pacientes que en el momento de ingreso en la UCI presentaron SG o SS. Los criterios de elegibilidad de los pacientes fueron los siguientes:

*Criterios de inclusión:* Se incluyeron en el estudio pacientes adultos ( $\geq$  de 18 años de edad) que ingresaron en la UCI con diagnóstico de SG o SS.

*Criterios de exclusión:* Se excluyeron aquellos pacientes con cardiopatía isquémica, arritmias o aquellos que no firmaron el consentimiento. A su vez, se excluyeron las sepsis fúngicas por el especial perfil que presentan estos pacientes evitando la posible interferencia con los resultados.

La distribución final de los pacientes incluidos en el estudio en función del hospital de procedencia fue la siguiente (Figura 29):



**Figura 29:** Procedencia de los pacientes incluidos en el estudio.

## RECOGIDA DE DATOS

Se utilizaron formularios estandarizados para la recogida de los datos de cada hospital y UCI participante (Anexos 1 y 2) así como los datos clínicos, incluyendo la historia, la exploración física, la investigación hematológica, bioquímica, radiológica y microbiológica de los pacientes incluidos en el estudio (Anexo 3 y 4).

## DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de sepsis grave o shock séptico se realizó siguiendo las definiciones propuestas por el ACCP/SCCM (109).

La toma de decisiones en cuanto al tratamiento de los pacientes no fue estandarizada dejándose a cargo de los médicos responsables de cada centro.

## VARIABLES DE ESTUDIO

Las **VARIABLES DEMOGRÁFICAS** recogidas fueron la edad, el sexo y los antecedentes personales que se agruparon como se detalla a continuación:

1. **INMUNOSUPRIMIDOS:** Los pacientes VIH positivos, aquellos que habían recibido radioterapia, o en tratamiento inmunosupresor (tanto con quimioterápicos como corticoesteroides) durante los últimos tres meses.
2. **CÁNCER METASTÁSICO:** Metástasis comprobadas por imagen, cirugía o marcadores tumorales.
3. **ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR CRÓNICA.**
4. **ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA:** Incluidos pacientes en programas de hemodiálisis o diálisis peritoneal crónica.
5. **ENFERMEDAD RESPIRATORIA CRÓNICA:** Enfermedad obstructiva, restrictiva o vascular que restringe las actividades de la vida diaria, o hipoxia crónica documentada, o pacientes con oxigenoterapia domiciliaria o ambulatoria, policitemia secundaria o hipertensión pulmonar grave (> de 40 mm de Hg).
6. **ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA:** Cirrosis hepática documentada por biopsia y con hipertensión portal documentada por historia de sangrado gastrointestinal o de fallo hepático, encefalopatía hepática o coma.

7. **DIABETES MELLITUS:** hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, en su acción o ambos, y que requiere de administración periódica de insulina exógena para su control.

8. **ALCOHOLISMO CRÓNICO:** definido en hombres como ingesta de más de 14 copas semanales (equivalentes a 400 ml de vino diarios, 750 ml de cerveza diarios), y en mujeres como ingesta de más de 7 copas semanales (equivalentes a 200 ml de vino diarios, 375 ml de cerveza diarios).

**VARIABLES CLÍNICAS:** Se incluyeron el estado de gravedad en el momento del ingreso expresado mediante el “score” APACHE-II, la necesidad de ventilación mecánica (invasiva o no invasiva), los días de estancia en la UCI y los días de estancia hospitalaria.

**VARIABLES RELACIONADAS CON EL FOCO DE INFECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:** La relación de pacientes con foco infeccioso presuntivo o confirmado del proceso séptico se agruparon en las siguientes variables: sepsis de origen abdominal, respiratorio, urológico, catéter o bacteriemia primaria, piel y tejidos blandos, prótesis o dispositivos intravasculares (DIV), y otros/desconocido.

Las variables relacionadas con la documentación microbiológica quedaron definidas de la siguiente manera: pacientes infectados con microorganismos gram positivos, gram negativos, polimicrobianos (aislamiento de dos o más microorganismos) o sin confirmación microbiológica.

**VARIABLES ANALÍTICAS:** Las variables de tipo bioquímico, hematológico, etc. se determinaron con los equipos disponibles en cada centro participante.

#### **CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS PLASMÁTICAS**

**RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:** A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre de 5 ml en un tubo de EDTA (Ácido etilen-diamino-tetraacético) en el momento del diagnóstico de SG o SS.

**CONSERVACIÓN DE MUESTRAS:** Todas las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos obteniéndose plasma que fue inmediatamente alicuotado y congelado a -80°C hasta su posterior procesamiento.

**CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS:** Los niveles en plasma de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM e IgE se midieron en una plataforma Luminex, utilizando un *kit* proporcionado por Biorad TM® (Hércules, CA, USA), para la medición de isotipos y subclases de inmunoglobulinas.

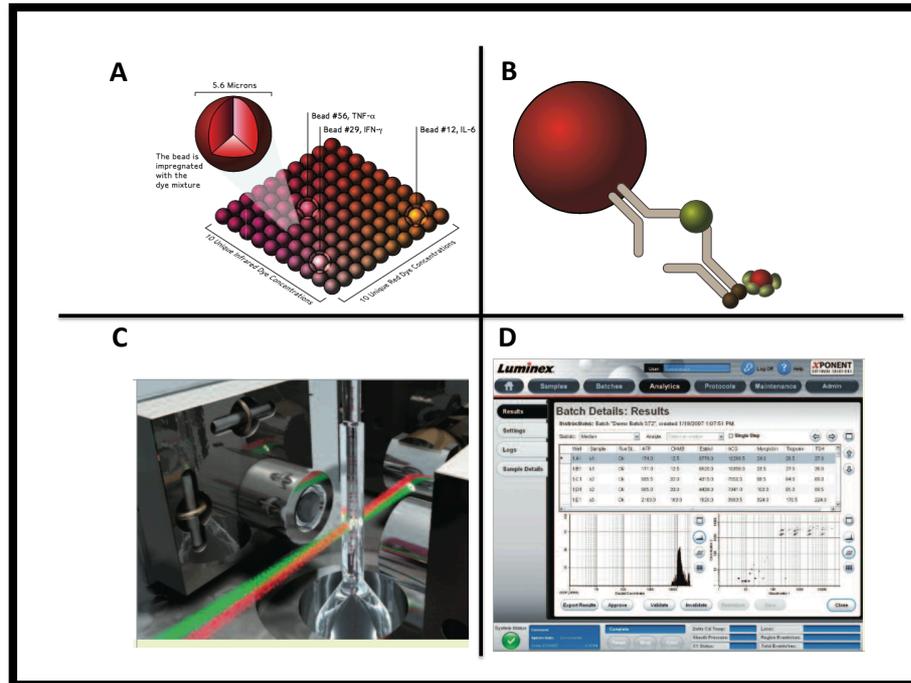
El análisis de las concentraciones de inmunoglobulinas de todas las muestras de plasma fue analizado por el mismo equipo para evitar errores técnicos.

**Plataforma Luminex (Figura 30):**

Se basa en la tecnología xMAP que utiliza microesferas de poliestireno con un diámetro aproximado de 8  $\mu\text{m}$ . Estas microesferas están marcadas con dos fluorocromos en distintas proporciones (hasta cien combinaciones diferentes), y a su vez conjugadas a una molécula de captura específica para una determinada diana. Tras la hibridación de las microesferas con los analitos presentes en la muestra, se procede a la lectura mediante el equipo Luminex. El equipo LX100/200 se fundamenta en la citometría de flujo y posee dos láseres para la lectura. El primero de ellos se encarga de la excitación de la microesfera, detectando la proporción de cada fluorocromo y generando un espectro asociado previamente a un determinado analito. El segundo, excita la molécula de captura marcada con estreptavidina-ficoeritrina y unida o no al analito que se pretende detectar. Finalmente, la fluorescencia emitida por cada microesfera es procesada y analizada por un *software* de análisis permitiendo la detección de forma cuali- y cuantitativa de las dianas (Figura 31).



**Figura 30:** Plataforma Luminex.



**Figura 31:** Flujo de trabajo mediante la tecnología xMAP.

#### Protocolo:

Para la detección y cuantificación de inmunoglobulinas se empleó el kit **“Bio-Plex Pro™ Assays Immunoglobulin Isotyping”** (Biorad®, Hércules, CA, USA). Se trata de un inmunoensayo tipo sándwich que permite la detección simultánea de los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas (7 dianas) en tan solo 10 µl de plasma o suero en aproximadamente 3 horas. Se utilizaron tres placas de 96 micropocillos para las 172 muestras iniciales que se procesaron. Tanto los *standards* como el control se pusieron por duplicado.

1. PRE-DILUCIÓN MUESTRAL: Se diluyeron las muestras de plasma con un diluyente específico (**“Bio-Plex Isotyping Diluent”**) hasta alcanzar una concentración final de 1:10.000.
2. PREPARACIÓN DE *STANDARDS*: Se reconstituyó el liofilizado con 500 µl de diluyente (**“Bio-Plex Isotyping Diluent”**) (S1). A continuación, se vorteo durante 1-3 segundos y se incubó en hielo durante 30 minutos. A partir del S1 se realizaron diluciones seriadas (1:4) hasta disponer de ocho *standards* (S1-S8).
3. PREPARACIÓN DEL CONTROL: Se reconstituyó el vial liofilizado del control en 1.000 µl de diluyente (**“Bio-Plex Isotyping Diluent”**). Se vorteo durante 1-3 segundos y se incubó en hielo durante 30 minutos.

4. PREPARACIÓN MICROESFERAS (“MULTIPLEX BEAD WORKING SOLUTION”):

POCILLOS	MICROESFERAS (µl)	DILUYENTE (“BIO-PLEX ASSAY BUFFER”) (µl)	VOLUMEN TOTAL (µl)
96	240	5.760	6.000
48	120	2.880	3.000
24	60	1.440	1.500

**Tabla 12:** Volúmenes requeridos para la preparación de microesferas.

A esta mezcla se añadió el conjugado (anti-isotipo/subclase) en un volumen de 2 µl/pocillo.

5. PREPARACIÓN DILUCIÓN ANTICUERPO (“BIO-PLEX ANTIBODY DETECTION”): Homogenizar previamente mediante centrifugación (*spin*) durante 30 segundos.

POCILLOS	ANTICUERPO (“STOCK DETECTION ANTIBODY”) (µl)	DILUYENTE (“DETECTION ANTIBODY DILUENT”) (µl)	VOLUMEN TOTAL (µl)
96	300	2.700	3.000
48	150	1.350	1.500
24	75	675	750

**Tabla 13:** Volúmenes requeridos para la preparación de la dilución de anticuerpo detector.

6. PREPARACIÓN ESTREPTAVIDINA-FICOERITRINA (SA-PE): Se preparó en el momento previo al uso por su fotosensibilidad e inestabilidad, y homogenizó previamente mediante centrifugación (*spin*) durante 30 segundos.

POCILLOS	ESTREPTAVIDINA-FICOERITRINA (µl)	DILUYENTE (“BIO-PLEX ASSAY BUFFER”) (µl)	VOLUMEN TOTAL (µl)
96	60	5.940	6.000
48	30	2.970	3.000
24	15	1.485	1.500

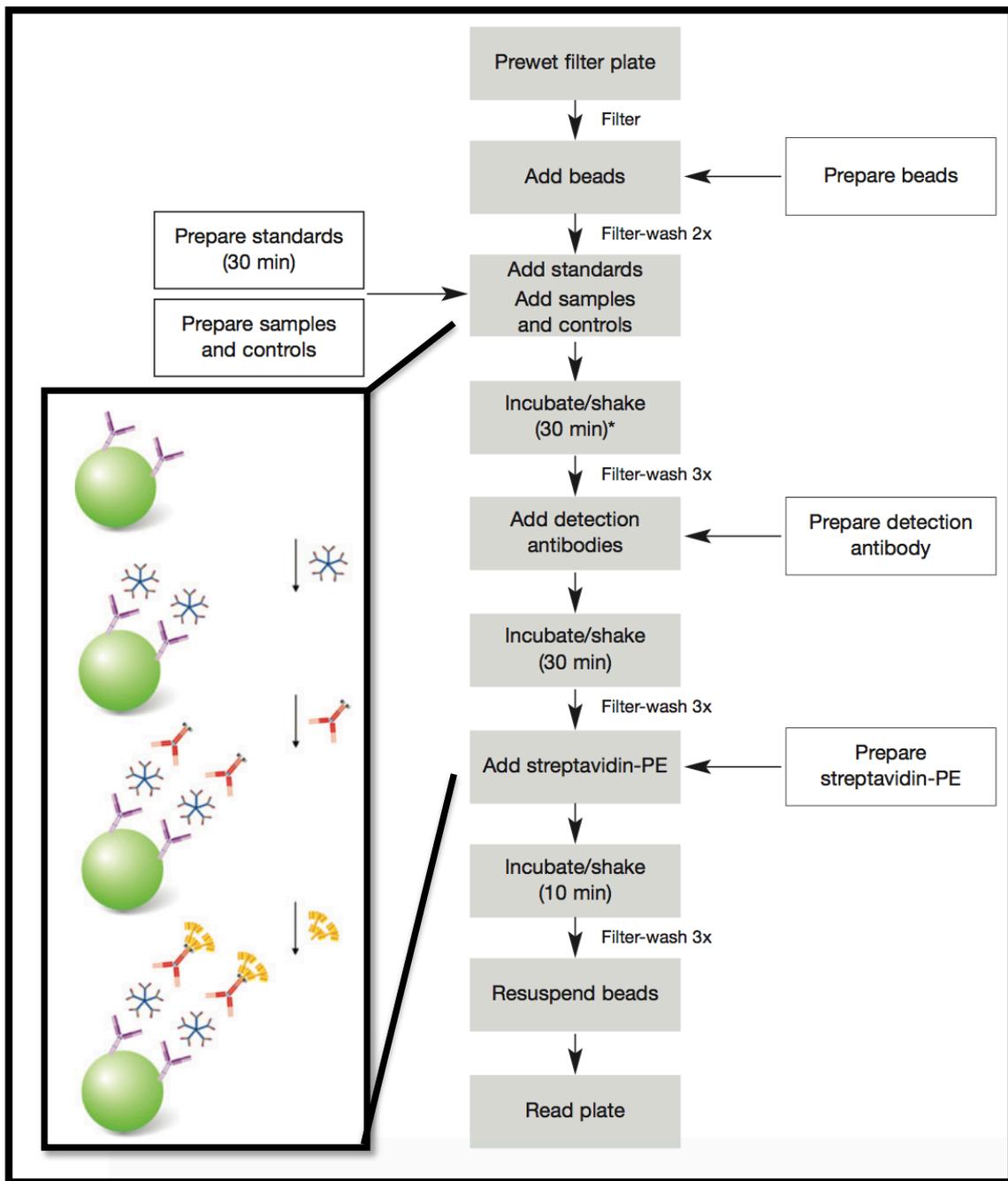
**Tabla 14:** Volúmenes requeridos para la preparación de SA-PE.

7. Los volúmenes finales por reacción se detallan a continuación (Tabla 15):

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
Muestra / Control / Standard	50
Microesferas (“Multiplex bead working solution”)	50
Anticuerpo (“Bio-Plex antibody detection”)	25
SA-PE	50
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>175</b>

**Tabla 15:** Volúmenes finales requeridos por reacción.

8. Una vez con los reactivos preparados se procedió a la realización del ensayo (Figura 32):
  - a) Se identificó la placa y los pocillos para las muestras, *standards* y control.
  - b) Primer lavado: Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de "*Bio-Plex assay buffer*" a cada pocillo y se desecharon.
  - c) Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la dilución con las microesferas a cada pocillo.
  - d) Segundo lavado: 100  $\mu\text{l}$  de "*Bio-Plex assay buffer*" a cada pocillo y a continuación, se desecharon.
  - e) Se pipetearon 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra, *standard* o control en los pocillos correspondientes.
  - f) Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación (primeros 30 segundos a 1.100 rpm, y después se redujo a 300 rpm). Una vez terminado el tiempo de incubación, se lavó tres veces la placa.
  - g) A continuación, se añadió la mezcla con el anticuerpo y se incubó la placa en agitación durante 30 minutos (primeros 30 segundos a 1.100 rpm, y después se redujo a 300 rpm). Una vez finalizada la incubación se lavó tres veces la placa.
  - h) Se preparó la dilución SA-PE añadiendo a cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  y de nuevo se incubó la placa en agitación durante 30 minutos (primeros 30 segundos a 1.100 rpm, y después se redujo a 300 rpm). Una vez finalizada la incubación, se lavó tres veces la placa y se re-suspendieron las microesferas en 125  $\mu\text{l}$  de "*Bio-Plex assay buffer*".
  - i) Finalmente, se procedió a la lectura del producto final mediante una plataforma Luminex: La adquisición e interpretación de datos se realizó mediante el *software* "*Bio-Plex Manager TM*".



**Figura 32:** Flujo de trabajo para la realización del inmunoensayo "Bio-Plex Pro TM" para la detección y cuantificación de inmunoglobulinas plasmáticas.

### CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA PLASMÁTICA

Para la determinación de albumina plasmática, se utilizó un Cobas Integra Gen2 de Roche Diagnostics® (Basilea, Suiza) que utiliza un ensayo colorimétrico para su cuantificación (Figura 33). A pH 4.1, la albumina presenta carácter catiónico suficiente para unirse al verde de bromocresol dando lugar a un compuesto coloreado azul verdoso. La intensidad de color o aumento de absorbancia, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra y se mide fotométricamente.



**Figura 33:** Cobas Integra de Roche Diagnostics®.

### ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO

Para el análisis bioestadístico de los datos se utilizó el programa SPSS para Windows versión 20.0 (IBM-SPSS, Chicago, Illinois, USA).

Para evaluar las diferencias en las variables demográficas y en las características clínicas de los pacientes incluidos en los dos grupos (supervivientes y fallecidos), se compararon los datos utilizando el test estadístico Chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) para variables categóricas, y el test U Mann-Whitney para variables continuas.

Se calcularon los deciles de las concentraciones de inmunoglobulinas para clasificar a los pacientes por encima o por debajo de una concentración conocida, generando de esta forma una variable de clasificación de tipo categórica.

Para el análisis de supervivencia, se utilizó el estimador Kaplan-Meier, censurando a día 28 el análisis desde el momento del diagnóstico de SG o SS. El decil que mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, utilizando el test Log-Rank, se consideró como punto de corte.

Se construyeron Inmunoscores (IS) para identificar aquellos pacientes que mostraban simultáneamente valores bajos de dos o más inmunoglobulinas (por debajo de los puntos de corte anteriormente definidos). De esta manera, se generaron los siguientes IS (Tabla 16):

NOMBRE	DEFINICIÓN
Inmunoscore (IgG1 IgM IgA)	Pacientes con valores de IgG1, IgM e IgA por debajo de los puntos de corte establecidos.
Inmunoscore (IgG1 IgM)	Pacientes con valores de IgG1 e IgM por debajo de los puntos de corte establecidos.
Inmunoscore (IgG1 IgA)	Pacientes con valores de IgG1 e IgA por debajo de los puntos de corte establecidos.
Inmunoscore (IgM IgA)	Pacientes con valores de IgM e IgA por debajo de los puntos de corte establecidos.

**Tabla 16:** Inmunoscores (IS) generados para estudio de supervivencia.

A los pacientes con la presencia concomitante de valores por debajo del punto de corte de las inmunoglobulinas que forman parte de cada respectivo IS, se les dio un 0, mientras que al resto de pacientes se les dio un 1.

Las variables dicotómicas creadas para cada inmunoglobulina utilizando el punto de corte anteriormente identificado, junto con los IS, fueron introducidas en un análisis de regresión univariante y multivariante para estudiar la asociación entre los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas y la mortalidad en la UCI.

Para validar la influencia del efecto sinérgico de niveles bajos de inmunoglobulinas se crearon IS mediante un corte transversal para los percentiles p10, p20, p30 y p40. El percentil que presentó significación estadística para todos los IS se introdujo en un análisis de Regresión logística binaria (RLB) univariante y multivariante.

Además, se crearon IS que contenían IgG total en vez de IgG1 para mejorar la utilidad clínica del IS.

Las variables de ajuste para los análisis multivariantes fueron las siguientes: edad, sexo, y "score" APACHE-II calculado en el momento del diagnóstico de SG o SS. También se incluyeron en el análisis multivariante aquellas variables correspondientes a los antecedentes personales, con una significación estadística de  $p < 0,1$  en el análisis univariante.

Para determinar si existía correlación entre los niveles de albúmina e inmunoglobulinas en plasma se utilizó el test estadístico Spearman-Kärber.

El nivel de significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

#### **COMITÉ ÉTICO. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

La aprobación tanto científica como ética del protocolo de estudio se obtuvo de la *Comisión de Investigación y CEIC* de cada uno de los hospitales participantes. Además, todos los pacientes o en su defecto la de sus representantes legales, firmaron una hoja de consentimiento informado (Anexo 5) a través de la cual aceptaban su participación en el estudio.



## ***VII- Resultados***

---

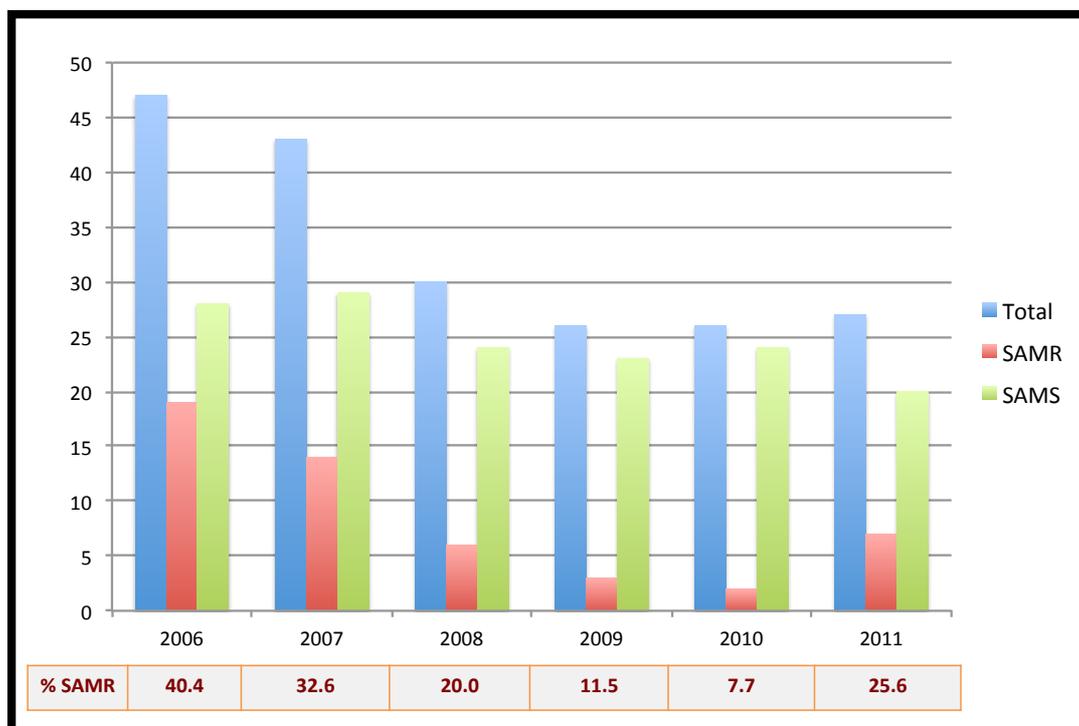


## RESULTADOS

### Primer estudio: Cohorte NAV

#### CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE LA POBLACIÓN

Para establecer la población de estudio, se seleccionaron en primer lugar todos aquellos pacientes procedentes de la UCI, con muestras del tracto de respiratorio inferior donde se había aislado *Staphylococcus aureus* entre los años 2006 y 2011 (N=199), de los cuales 51 fueron SAMR (25,6%). La mayoría de los pacientes con SAMR pertenecían al año 2006 donde se objetivó el mayor y alarmante porcentaje de resistencia a oxacilina del periodo de estudio que superó el 40% (Figura 34). A continuación, se revisaron las historias clínicas y seleccionamos aquellos que habían requerido ventilación mecánica en el momento del ingreso (N=97). Por último, se categorizaron en función de la patología desarrollada en pacientes con NAV (N=48), traqueobronquitis (N=34) y colonizaciones (N=15). De los pacientes con NAV, se eliminaron 4 que no cumplían los criterios de inclusión siendo la población final de estudio 44 pacientes.



**Figura 34:** Distribución resistencia a oxacilina en los pacientes procedentes de la UCI del HCUV con *Staphylococcus aureus* en muestras del TRI durante el periodo 2006-2011.

Los pacientes se clasificaron en supervivientes o fallecidos a los 28 días de seguimiento. En la tabla 17 se muestran los resultados de frecuencia de la población estudiada, comparando los pacientes que sobreviven con los fallecidos respecto de las variables demográficas y clínicas (edad, sexo, "score" APACHE-II, días en ventilación mecánica, características infecciosas y antecedentes personales). Los resultados se muestran expresados en mediana y rango intercuartílico ( $\bar{X}$ ,RIC) para las variables cuantitativas (o continuas), y con la distribución de frecuencias (n,%) en las variables cualitativas. La significación estadística se expresa con el valor *p*.

De la población total estudiada, 26 pacientes sobrevivieron y 18 fallecieron lo que supuso una mortalidad del 40,9%.

La mayoría de nuestros pacientes eran hombres (68,2%) de edad avanzada ( $\geq 60$  años), aunque dentro de los pacientes fallecidos lo fueron las mujeres (61,1%).

Los pacientes fallecidos presentaron un estado más grave al ingreso, con un "score" APACHE-II de 22 de mediana aunque el tiempo medio en ventilación mecánica fue similar, entre 4 y 5 días en ambos grupos. La infección por una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible o resistente a meticilina no mostró diferencias significativas.

Entre las comorbilidades que presentaban los pacientes incluidos en el estudio, las más frecuentes fueron la hipertensión, presente en el 45,5% de los pacientes, la enfermedad cardiovascular (25,0%) y el hábito tabáquico (20,5%). Otros antecedentes como el enolismo o el uso de drogas por vía parenteral fueron muy poco prevalentes. No se registraron apenas pacientes con historia clínica previa de tipo oncológico, ya sea por haber padecido un proceso canceroso, metástasis de cualquier localización o tratamiento quimioterápico.

Se definió coinfección bacteriana como la presencia de otras bacterias aisladas en muestras clínicas de cualquier localización en nuestros pacientes con significación clínica. De los 44 pacientes incluidos en el estudio, el 68,2% estaban coinfectados. El porcentaje de pacientes fallecidos coinfectados fue del 55% no presentando diferencias significativas al compararse con el grupo de los supervivientes. Los principales focos de coinfección fueron: respiratorio, urológico y la bacteriemia primaria o por catéter (Tabla 18). Los microorganismos más frecuentemente aislados por paciente fueron bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (43,3%), *Acinetobacter baumannii* (26,7%) y *Staphylococcus coagulasa negativa* (23,3%). Algunos pacientes presentaron más de una coinfección. El número total de microorganismos aislados fue de 40 y su frecuencia se detalla en la tabla 19.

VARIABLE	SUPERVIVIENTES (n=26)	FALLECIDOS (n=18)	TOTAL (n=44)	p
Edad (Años)	60,0 (35,0)	63,5 (26,0)	62,0 (33,0)	n.s
Sexo (Hombre)	23 (88,5)	7 (38,9)	30 (68,2)	n.s
Score APACHE-II	17,0 (11,0)	22,0 (12,0)	17,5 (13,0)	n.s
Días en ventilación mecánica hasta el diagnóstico de NAV	4,0 (4,0)	4,5 (4,0)	4,0 (4,0)	n.s
SAMR/SAMS	8 (30,8)	4 (22,2)	12 (27,3)	n.s
Coinfección bacteriana (S/N)	20 (76,9)	10 (55,6)	30 (68,2)	n.s
Diabetes (Tipo I o II) (S/N)	4 (15,4)	2 (11,1)	6 (13,6)	n.s
Enfermedad cardiovascular (S/N)	6 (23,1)	5 (27,8)	11 (25,0)	n.s
Enfermedad renal crónica (S/N)	2 (7,7)	1 (5,6)	3 (6,8)	n.s
Enfermedad respiratoria crónica (S/N)	6 (23,1)	0 (0,0)	6 (13,6)	n.s
Enfermedad cerebrovascular (S/N)	6 (23,1)	0 (0,0)	6 (13,6)	n.s
Fumador (alguna vez) (S/N)	8 (30,8)	1 (5,6)	9 (20,5)	n.s
Enfermedad neurológica (S/N)	4 (15,4)	0 (0,0)	4 (9,1)	n.s
Hipertensión (S/N))	12 (46,2)	8 (44,4)	20 (45,5)	0,084
Cáncer hematológico (alguna vez) (S/N)	1 (3,8)	0 (0,0)	1 (2,3)	n.s
Cirrosis hepática (S/N)	2 (7,7)	0 (0,0)	2 (4,6)	n.s
Metástasis (alguna vez) (S/N)	0 (0,0)	2 (11,1)	2 (4,6)	0,018
Enfermedad gastrointestinal (S/N)	9 (34,6)	1 (5,6)	10 (22,7)	n.s
Quimioterapia (alguna vez) (S/N)	1 (3,8)	2 (11,1)	3 (6,8)	n.s
Enolismo (S/N)	4 (15,4)	0 (0,0)	4 (9,1)	n.s
Usuario de drogas por vía parenteral (S/N)	2 (7,7)	0 (0,0)	2 (4,6)	n.s
Obesidad (S/N)	3 (11,5)	1 (5,6)	4 (9,1)	n.s
Dislipemia (S/N)	4 (15,4)	2 (11,1)	6 (13,6)	n.s

**Tabla 17:** Características demográficas y clínicas de los pacientes supervivientes y fallecidos.

N.s: no significativo.

FOCO COINFECCIÓN	N
Abdominal	1
Respiratorio	11
Urológico	11
Catéter/Bacteriemia primaria	10
Piel/Tejidos blandos	1
Otros/Desconocido	2

**Tabla 18:** Número de pacientes y foco asociado a la coinfección.

MICROORGANISMO	N (%)
<b>Enterobacterias</b>	<b>13 (32,5)</b>
<i>E. coli</i>	3
<i>K. pneumoniae</i>	6
<i>K. oxytoca</i>	2
<i>E. cloacae</i>	1
<i>P. mirabilis</i>	1
<b>BGNF*</b>	<b>11 (27,5)</b>
<i>P. aeruginosa</i>	2
<i>A. baumannii</i>	9
<b>Estafilococos coagulasa negativos</b>	<b>7 (17,5)</b>
<i>S. epidermidis</i>	5
Otros S.CoN**	2
<b>Enterococos</b>	<b>4 (10,0)</b>
<i>E. faecalis</i>	4
<i>E. faecium</i>	0
<b>Otros microorganismos</b>	<b>5 (12,5)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>

**Tabla 19:** Microorganismos aislados en los pacientes coinfectados. N: Número total de microorganismos aislados. BGNF\*: Bacilo Gram negativo no fermentador; SCoN\*\*: Estafilococo coagulasa negativa.

Se compararon las concentraciones de las subpoblaciones leucocitarias tanto del momento de ingreso en la UCI como en el momento del diagnóstico de NAV, entre el grupo de supervivientes y fallecidos (Tablas 20 y 21). Los pacientes que fallecían presentaban valores de leucocitos totales superiores respecto del grupo de supervivientes en ambos momentos de análisis, aunque no se encontraron diferencias significativas. El análisis mostró únicamente diferencias estadísticamente significativas en la concentración de eosinófilos ( $p=0,043$ ). La concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV en el grupo de los fallecidos eran inferiores que en el grupo de los supervivientes (Tabla 21).

VARIABLE	SUPERVIVIENTES (N=26)	FALLECIDOS (N=18)	P
Leucocitos totales (celulas/mm <sup>3</sup> )	9565 (6873)	11720 (9725)	n.s
Linfocitos (células/mm <sup>3</sup> )	960,9 (1017,3)	812,3 (1336,9)	n.s
Monocitos (células/mm <sup>3</sup> )	480,3 (442,9)	465,8 (436,6)	n.s
Neutrófilos (células/mm <sup>3</sup> )	7801,9 (7053,9)	9504,0 (9101,8)	n.s
Basófilos (células/mm <sup>3</sup> )	11,5 (22,0)	10,5 (28,0)	n.s
Eosinófilos (células/mm <sup>3</sup> )	14,9 (119,0)	20,3 (195,0)	n.s

**Tabla 20:** Comparación de leucocitos totales y subpoblaciones leucocitarias en el momento del ingreso en UCI. N.s: No significativo.

VARIABLE	SUPERVIVIENTES (N=26)	FALLECIDOS (N=18)	P
Leucocitos totales (células/mm <sup>3</sup> )	9835 (5998)	14240 (17245)	n.s
Linfocitos (células/mm <sup>3</sup> )	983,0 (734,4)	919,6 (973,1)	n.s
Monocitos (células/mm <sup>3</sup> )	501,3 (238,2)	707,1 (473,8)	n.s
Neutrófilos (células/mm <sup>3</sup> )	8261,4 (5372,3)	12182,5 (15051,7)	n.s
Basófilos (células/mm <sup>3</sup> )	13,3 (32,3)	14,2 (16,5)	n.s
Eosinófilos (células/mm <sup>3</sup> )	112,2 (231,0)	51,5 (118,8)	0,043

**Tabla 21:** Comparación de leucocitos totales y subpoblaciones leucocitarias en el momento del diagnóstico de NAV en la UCI. N.s: No significativo.

Se calcularon los *ratios* entre las principales subpoblaciones leucocitarias implicadas en los procesos infecciosos (neutrófilos, linfocitos y monocitos) para evaluar si existían diferencias entre los supervivientes y los fallecidos, pero no se hallaron diferencias significativas. Únicamente, en el *ratio* neutrófilo/linfocito calculado en el momento del diagnóstico de NAV parece existir una tendencia al alza en los pacientes que fallecen aunque no se alcanzó significación estadística ( $p < 0,005$ ) (Tabla 22).

VARIABLE	SUPERVIVIENTES (N=26)	FALLECIDOS (N=18)	P
<b>INGRESO UCI</b>			
Ratio N/L	7,2 (9,3)	11,7 (20,1)	n.s
Ratio N/M	14,96 (7,21)	17,99 (26,71)	n.s
Ratio L/N	0,13 (0,16)	0,08 (0,11)	n.s
Ratio L/M	2,04 (2,31)	1,81 (1,95)	n.s
Ratio M/N	0,06 (0,03)	0,05 (0,05)	n.s
Ratio M/L	0,48 (0,47)	0,55 (0,42)	n.s
<b>DIAGNÓSTICO NAV</b>			
Ratio N/L	7,3 (7,6)	10,4 (13,5)	0,059
Ratio N/M	14,25 (9,98)	18,54 (19,91)	n.s
Ratio L/N	0,13 (0,13)	0,09 (0,10)	n.s
Ratio L/M	1,86 (1,30)	1,54 (2,03)	n.s
Ratio M/N	0,07 (0,04)	0,05 (0,05)	n.s
Ratio M/L	0,53 (0,46)	0,64 (0,72)	n.s

**Tabla 22:** Comparación ratios de las principales subpoblaciones leucocitarias tanto en el momento del ingreso como en el diagnóstico de NAV en la UCI. N: neutrófilo; M: monocito; L: linfocito; N.s: No significativo.

### EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EOSINÓFILOS

La única subpoblación leucocitaria que había mostrado diferencias significativas en el análisis comparativo fue la de los eosinófilos. Por tanto, se evaluó el cambio en la concentración de eosinófilos entre supervivientes y fallecidos, calculando los incrementos en ambos grupos.

Los incrementos de eosinófilos se definieron como:

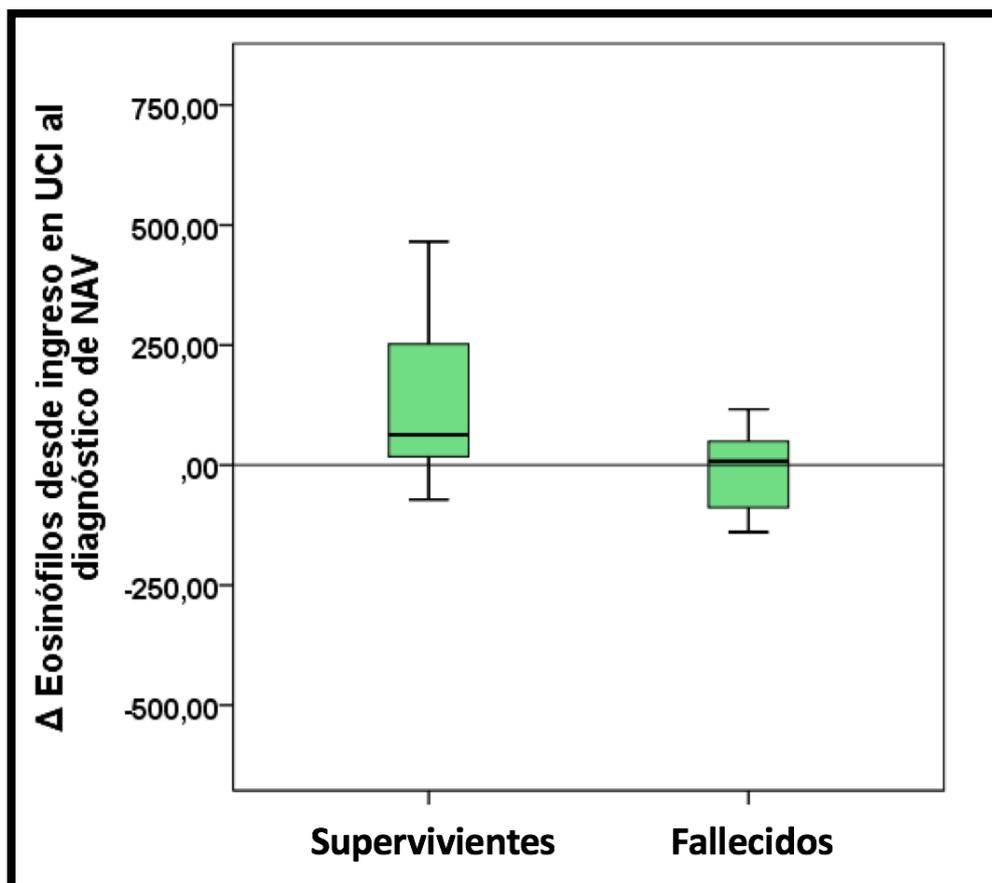
$$\Delta = [\text{Eosinófilos en diagnóstico de NAV}] - [\text{Eosinófilos en el ingreso en UCI}]$$

Los incrementos en los dos grupos fueron los siguientes ( $\bar{X}$  - RIC):

Pacientes supervivientes: (63,4 - 246,4)

Pacientes fallecidos: (8,5 - 167,7)

Los incrementos en el grupo de fallecidos eran significativamente menores que en el grupo de los supervivientes ( $p = 0,016$ ) (Figura 35).



**Figura 35:** Diagrama de cajas mostrando los incrementos de eosinófilos: [concentración en diagnóstico de NAV] – [concentración en el ingreso en UCI] en los pacientes supervivientes y fallecidos.

**ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE MORTALIDAD MEDIANTE REGRESIÓN DE COX**

Para el análisis multivariante de mortalidad mediante regresión de Cox, se introdujeron todas aquellas variables consideradas de confusión como la [edad], [sexo], [score APACHE-II], [NAV por SAMR versus SAMS], [coinfección bacteriana] y [días en ventilación mecánica].

Se decidió aplicar el método de Wald de selección de variables por pasos como test estadístico, para generar el modelo que mejor explicara la asociación de las variables de interés clínico introducidas con el riesgo de mortalidad. El análisis multivariante mediante regresión de Cox se realizó para evaluar las dos variables que habían mostrado significación estadística previamente: *concentración eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV e incrementos de eosinófilos*.

**MODELO DE REGRESIÓN DE COX MULTIVARIANTE PARA EL ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EOSINÓFILOS EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO DE NAV EN LA MORTALIDAD:**

Se introdujeron todas las variables de interés junto con la [concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV (valores *log*)]. Se utilizaron los valores logaritmizados de esta variable como mecanismo de transformación ya que no presentaba una distribución normal.

Para [concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV (valores *log*)], el test de Wald seleccionó [concentración eosinófilos en el diagnóstico de NAV (valores *log*)] como la única variable implicada en el pronóstico (Tabla 23):

MODELO	HR	IC 95%		P
		INFERIOR	INFERIOR	
Concentración eosinófilos en el diagnóstico de NAV	0,37	0,18	0,75	0,006

**Tabla 23:** Modelo de regresión de Cox multivariante seleccionado por el método de Wald de pasos hacia delante para “concentración de eosinófilos en el diagnóstico de NAV”.

**MODELO DE REGRESIÓN DE COX MULTIVARIANTE PARA EL ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LOS INCREMENTOS DE EOSINÓFILOS EN LA MORTALIDAD:**

Se introdujeron todas las variables de interés junto con los [incrementos de eosinófilos].

El test de Wald seleccionó la variable [score APACHE-II] e [incrementos de eosinófilos] como las variables asociadas a mortalidad (Tabla 24):

MODELO	HR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
Score APACHE-II	1,07	1,01	1,15	0,050
Incrementos de eosinófilos	0,99	0,99	0,99	0,010

**Tabla 24:** Modelo de regresión de Cox multivariante seleccionado por el método de Wald de pasos hacia delante para "incrementos de eosinófilos".

Por lo tanto, el análisis multivariante mediante regresión de Cox mostró que tanto los [incrementos de eosinófilos] como los [concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV (valores *log*)] eran factores de protección frente al riesgo de morir en los primeros 28 días de seguimiento tras el diagnóstico de NAV, por presentar valores significativos y un HR inferior a 1.

**ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER**

Se calcularon los deciles desde el percentil 10 hasta el percentil 90 de la concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV. Se crearon las correspondientes variables categóricas distribuyendo a los pacientes por encima y por debajo de cada decil para comparar supervivencia entre pacientes con alta o baja concentración de eosinófilos (Tabla 25).

El primer decil que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos aplicando el test log-Rank se utilizó como punto de corte. El tiempo fue censurado a día 28 de seguimiento desde el momento del diagnóstico de NAV.

PERCENTIL	N (EOSINÓFILOS/MM <sup>3</sup> )	TEST LOG RANK (P)
10	16	n.s
<b>20</b>	<b>30</b>	<b>0,003</b>
30	56	0,031
40	75	0,075
50	104	n.s
60	121	n.s
70	173	n.s
80	301	n.s
90	498	n.s

**Tabla 25:** Percentiles calculados para la concentración de eosinófilos.

Los percentiles 20 y 30 mostraron significación estadística pero finalmente se decidió establecer el punto de corte en 30 eosinófilos/mm<sup>3</sup> (percentil 20) ya que presentaba un mayor impacto en la supervivencia ( $p= 0,003$ ) (Figuras 36 y 37).

La representación gráfica del análisis de supervivencia mediante el test Kaplan-Meier mostró que aquellos pacientes con una concentración de eosinófilos por debajo de 30 células/mm<sup>3</sup> en el momento del diagnóstico de NAV, fallecían más rápidamente que aquellos con valores por encima del punto de corte (Figura 36).

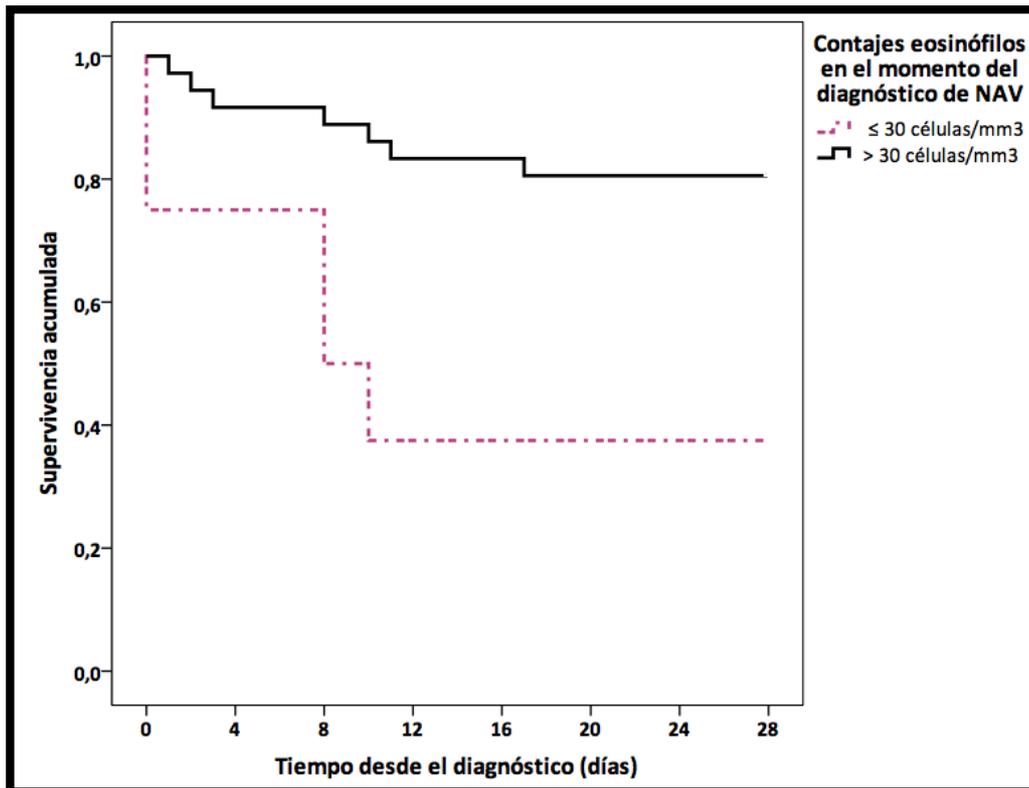


Figura 36: Curvas Kaplan-Meier para supervivencia aplicando el percentil 20.

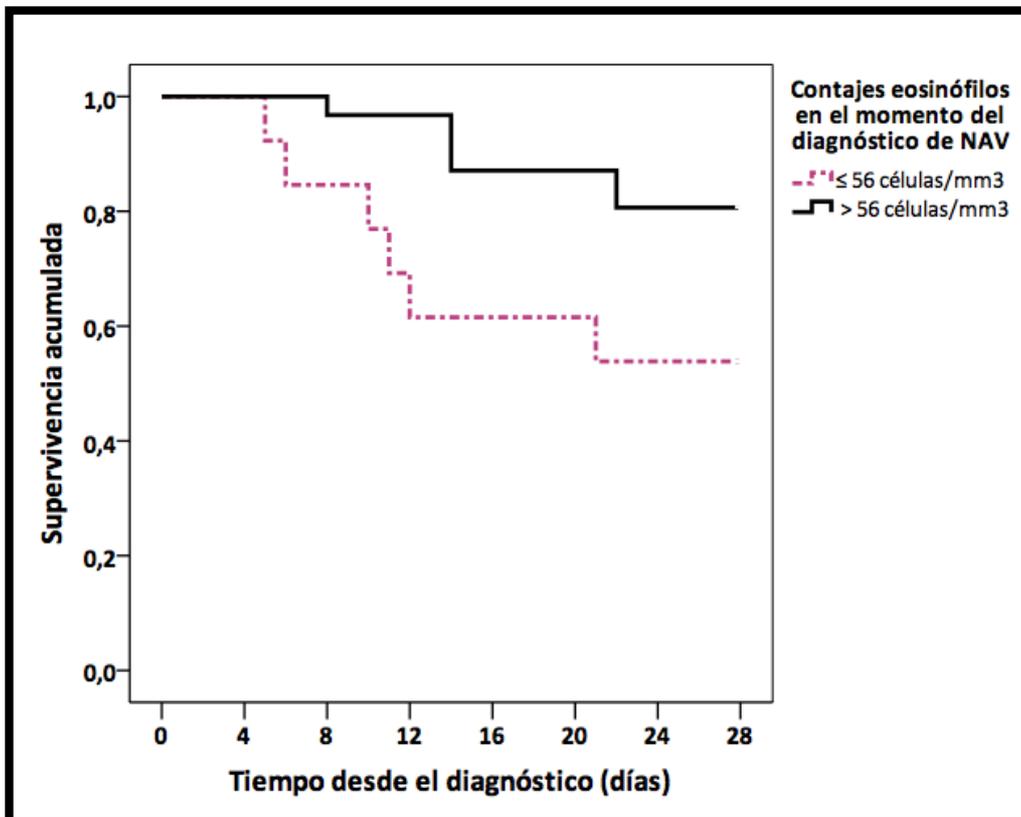


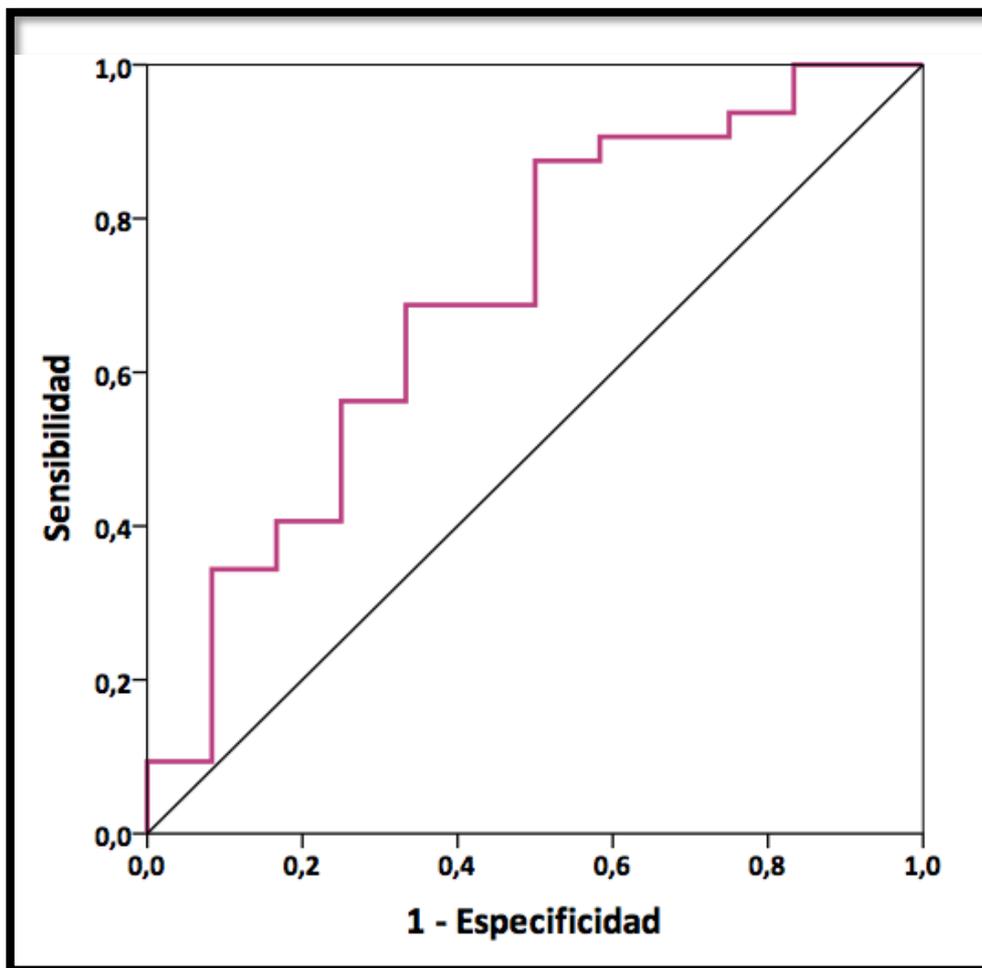
Figura 37: Curvas Kaplan-Meier para supervivencia aplicando el percentil 30.

**ANÁLISIS CURVAS AUROC**

La precisión y los valores predictivos de eosinófilos para detectar supervivientes en los primeros 28 días tras el diagnóstico de NAV se evaluó calculando el área bajo la curva ROC.

El análisis del área bajo la curva ROC confirmó que la concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV puede ser un buen test para predecir supervivencia en pacientes con NAV por *Staphylococcus aureus* (Figura 38):

área [IC 95%],  $p$ : 0,701 [0,519 -0,882], 0,042



**Figura 38:** Análisis del área bajo la curva ROC para la concentración de eosinófilos en el momento del diagnóstico de NAV para diagnosticar supervivencia.

---

## Segundo estudio: Cohorte sepsis (Estudio GRECIA)

---

### CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE LA POBLACIÓN

Inicialmente, se incluyeron 187 pacientes con diagnóstico de SG o SS en el momento de ingreso en UCI. De los 187 pacientes iniciales, 15 de ellos fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión en el estudio. Por tanto, el estudio se realizó finalmente con 172 pacientes.

Los pacientes se clasificaron en función de si estaban vivos o muertos a los 28 días de seguimiento. Las tablas muestran los datos globales y los datos correspondientes a ambos grupos por separado (supervivientes y fallecidos). Los resultados se muestran expresados en mediana y rango intercuartílico ( $\bar{X}$ ,RIC) para las variables cuantitativas (o continuas), y con la distribución de frecuencias (n,%) en las variables cualitativas. La significación estadística de las diferencias encontradas entre ambos grupos se expresa con el valor  $p$ .

En las tablas 26 y 27, se recogen los resultados de la comparación entre las variables demográficas (edad, sexo) y antecedentes personales, así como y las variables relacionadas con el proceso agudo de la enfermedad ("score" APACHE-II, shock séptico en el momento del ingreso, requerimiento de ventilación mecánica ya sea invasiva o no invasiva, días de estancia en UCI y hospitalaria).

De los 172 pacientes incluidos en el estudio, 42 fallecieron durante su ingreso en la UCI siendo la mortalidad global del 24,4%.

En cuanto a las características demográficas, la edad mostró diferencias estadísticamente significativas siendo los pacientes fallecidos mayores, con una mediana de edad de 74 años con respecto de los que sobrevivieron cuya mediana se situó en los 65,5 años. Los pacientes fallecidos fueron mayoritariamente hombres (71,4%) aunque en comparación con los supervivientes, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al sexo.

Entre los antecedentes personales, la enfermedad respiratoria crónica, que afectaba al 14,5% de la población estudiada, mostró diferencias estadísticamente significativas entre supervivientes y fallecidos. El grupo de pacientes inmunosuprimidos estuvo formado por pacientes infectados por el VIH (n=1), trasplantados de órganos sólido (n=4), pacientes oncológicos en tratamiento con quimioterapia o radioterapia (n=7), pacientes con enfermedad respiratoria crónica en tratamiento con corticosteroides (n=6) y pacientes en tratamiento con fármacos inmunosupresores por enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias sistémicas (n=17). La inmunosupresión afectó en total al 20,3% de pacientes, siendo más

frecuente su presencia en el grupo de pacientes fallecidos ( $p= 0,001$ ). Otros antecedentes como la diabetes, la enfermedad renal crónica o el alcoholismo se situaron en torno al 10% de frecuencia entre los pacientes incluidos, aunque no se encontraron diferencias entre grupos.

ANTECEDENTES PERSONALES	SUPERVIVIENTES (N=130)	FALLECIDOS (N=42)	TOTAL (N=172)	P
<b>Edad (Años)</b>	65,5 (21,0)	74 (11,0)	68,5 (19,0)	<b>0,007</b>
<b>Sexo (Varón)</b>	85 (65,4)	30 (71,4)	115 (66,9)	n.s
<b>Inmunosupresión (S/N)</b>	19 (14,6)	16 (38,1)	35 (20,3)	<b>0.001</b>
<b>Enf. Cardiovascular crónica (S/N)</b>	5 (3,8)	4 (9,5)	9 (5,2)	n.s
<b>Enf. Respiratoria crónica (S/N)</b>	14 (10,8)	11 (26,2)	25 (14,5)	<b>0.014</b>
<b>Enf. Renal crónica (S/N)</b>	10 (7,7)	3 (7,1)	13 (7,6)	n.s
<b>Enf. Hepática crónica (S/N)</b>	3 (2,3)	1 (2,4)	4 (2,3)	n.s
<b>Diabetes (S/N)</b>	17 (13,1)	4 (9,5)	21 (12,2)	n.s
<b>Cáncer metastásico (S/N)</b>	8 (6,2)	2 (4,8)	10 (5,8)	n.s
<b>Alcoholismo (S/N)</b>	10 (7,7)	3 (7,1)	13 (7,6)	n.s

**Tabla 26:** Comparación de las características demográficas y antecedentes personales clasificadas en función del desenlace en la UCI.

Entre las variables evaluadas, relacionadas con el estado de gravedad en el momento del ingreso y la evolución del proceso patológico, no se encontraron diferencias significativas en relación al número de pacientes que ingresaron con SG o SS. Igualmente, cabe destacar que el 80% del total de pacientes incluidos en el estudio ingresaron con SS. El “score” APACHE-II, calculado en el momento del ingreso, fue significativamente superior en el grupo de pacientes fallecidos con una mediana de 27, muy por encima del obtenido en los pacientes supervivientes. De los 172 pacientes, 148 requirieron de ventilación mecánica, precisando 120 de ellos métodos invasivos. Los pacientes fallecidos necesitaron ventilación mecánica invasiva más frecuentemente (92,9%) ( $p=0,000$ ). Por último, la estancia hospitalaria de los pacientes fallecidos fue significativamente inferior, con una mediana de 21 días en comparación a los 27 días de los pacientes supervivientes.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	SUPERVIVIENTES (N=130)	FALLECIDOS (N=42)	TOTAL (N=172)	P
<b>Shock séptico en el ingreso en UCI</b>	100 (76,9)	34 (80,9)	134 (77,9)	n.s
<b>Score APACHE-II</b>	19 (8,0)	27 (8,0)	21 (10,0)	<b>0,000</b>
<b>Ventilación mecánica invasiva (S/N)</b>	81 (62,3)	39 (92,9)	120 (69,8)	<b>0,000</b>
<b>Ventilación mecánica no invasiva (S/N)</b>	18 (13,8)	10 (23,8)	28 (16,3)	n.s
<b>Estancia en UCI (días)</b>	8 (12,0)	10 (15,0)	8 (12,0)	n.s
<b>Estancia hospitalaria (días)</b>	27 (34,0)	21 (20,0)	25 (25,0)	<b>0,002</b>

**Tabla 27:** Comparación de las características clínicas en función del desenlace en la UCI.

En la tabla 28 se caracteriza el proceso infeccioso en función del foco sospechado o documentado (abdominal, respiratorio, urológico, catéter o bacteriemia primaria, etc.), así como el tipo de microorganismo implicado (gram positivo, gram negativo o polimicrobiana), en el caso de estar confirmado.

El principal foco séptico fue el abdominal, representando el 34,9% de los pacientes, seguido del foco respiratorio con un 33,1%. La comparación entre los grupos de supervivientes y fallecidos mostró diferencias estadísticamente significativas en el foco respiratorio, siendo el origen del proceso séptico más frecuente en los pacientes fallecidos (33,1%). En relación a las sepsis de origen abdominal, y a pesar de no observarse significación estadística, fue el foco más frecuente en el grupo de pacientes que sobrevivieron (36,2%).

La confirmación microbiológica de la sepsis se obtuvo en el 56,4% de los casos. Los microorganismos gram negativos fueron la causa infecciosa del 33,7% de las sepsis, un 11% más que las sepsis producidas por gram positivos, que supusieron el 22,7%. La documentación microbiológica de las sepsis de los pacientes fallecidos, reveló que en un 35,7% fueron causadas por microorganismos gram negativos. Únicamente 11 casos fueron sepsis polimicrobianas.

FOCO INFECCIOSO Y DOCUMENTACIÓN MICROBIOLÓGICA	SUPERVIVIENTES (N=130)	FALLECIDOS (N=42)	TOTAL (N=172)	P
<b>Abdominal</b>	47 (36,2)	13 (31,0)	60 (34,9)	n.s
<b>Respiratorio</b>	36 (27,7)	21 (50,0)	57 (33,1)	<b>0,008</b>
<b>Urológico</b>	23 (17,7)	3 (7,1)	26 (15,1)	0,097
<b>Catéter/Bacteriemia primaria</b>	8 (12,0)	1 (2,4)	9 (5,2)	n.s
<b>Piel/Tejidos blandos</b>	6 (4,6)	0 (0,0)	6 (3,5)	n.s
<b>Prótesis/DIV</b>	2 (1,5)	2 (4,8)	4 (2,3)	n.s
<b>Otros/Desconocido</b>	8 (12,0)	2 (4,8)	10 (5,8)	n.s
<b>Gram negativo</b>	43 (33,1)	15 (35,7)	58 (33,7)	n.s
<b>Gram positivo</b>	31 (23,8)	8 (19,0)	39 (22,7)	n.s
<b>Polimicrobiana</b>	9 (6,9)	2 (4,8)	11 (6,4)	n.s

**Tabla 28:** Comparación de las características relacionadas con el foco infeccioso y la documentación microbiológica, clasificadas en función del desenlace en la UCI.

En la tabla 29 se muestran los resultados referentes a una nueva clasificación de los pacientes. En este caso, los pacientes fueron distribuidos en dos grupos en función de si padecieron SG o SS de origen comunitario u hospitalario, así como el tipo de foco infeccioso en ambos grupos. Las tablas muestran los datos globales y los datos correspondientes a ambos grupos por separado (SG o SS nosocomial y comunitario). Los resultados se muestran expresados en frecuencias (n,%) por tratarse de variables cualitativas. La significación estadística de las diferencias encontradas entre ambos grupos se expresa con el valor *p*.

De los 172 pacientes incluidos en el estudio, 106 presentaron SG o SS de origen comunitario (61,6%), y 66 presentaron SG o SS de origen nosocomial (38,4%). La comparación de los pacientes con sepsis comunitaria o nosocomial en función del foco infeccioso no mostró diferencias estadísticamente significativas. El foco más frecuente de los pacientes con sepsis comunitaria fue el abdominal, que afectó al 37,7% de los casos, y el respiratorio en el grupo de sepsis hospitalaria que afectó al 40,9% de los pacientes.

Los microorganismos gram negativos fueron los más frecuentemente aislados en ambos grupos. En los pacientes con sepsis nosocomial, los gram negativos representaron un 40,9% de los casos documentados microbiológicamente, que supusieron más del doble de la representación respecto de los gram positivos. En el caso de la sepsis comunitaria, la

prevalencia tanto de microorganismos gram negativos como gram positivos fue equiparable representando un 29,3% y 24,5% respectivamente.

FOCO Y TIPO DE PATOLOGÍA ASOCIADA	SEPSIS O SHOCK SÉPTICO NOSOCOMIAL (N=66)	SEPSIS O SHOCK SÉPTICO COMUNITARIO (N=106)	TOTAL (N= 172)	P
<b>Abdominal</b>	20 (30,3)	40 (37,7)	60 (34,9)	n.s
<b>Respiratorio</b>	27 (40,9)	30 (28,3)	57 (33,1)	n.s
<b>Urológico</b>	8 (12,1)	18 (16,9)	26 (15,1)	n.s
<b>Catéter/Bacteriemia primaria</b>	3 (4,5)	6 (5,7)	9 (5,2)	n.s
<b>Piel/Tejidos blandos</b>	1 (1,5)	5 (4,7)	6 (3,5)	n.s
<b>Prótesis/DIV</b>	1 (1,5)	3 (2,8)	4 (2,3)	n.s
<b>Otros/Desconocido</b>	6 (9,1)	4 (3,8)	10 (5,8)	n.s
<b>Gram negativo</b>	27 (40,9)	31 (29,2)	58 (33,7)	n.s
<b>Gram positivo</b>	13 (19,7)	26 (24,5)	39 (22,7)	n.s
<b>Polimicrobiana</b>	6 (9,1)	5 (4,7)	11 (6,4)	n.s

**Tabla 29:** Comparación del foco infeccioso en función del origen de la sepsis grave o shock séptico (nosocomial o comunitario).

Con respecto a los microorganismos implicados, la tabla 30 recoge los más frecuentemente aislados de las SG o SS que se documentaron microbiológicamente. El 59,6% de los aislamientos fueron microorganismos gram negativos, con una fuerte implicación de las enterobacterias que supusieron el 50% del total. *Escherichia coli* ocupó el primer lugar siendo el microorganismo más prevalente (29,8%). Los microorganismos gram positivos se aislaron en un 35,6%, y su principal representante fue *Staphylococcus aureus* con un 15,4%.

MICROORGANISMO	N (%)
<b>Enterobacterias</b>	<b>52 (50,0)</b>
<i>E. coli</i>	31 (29,8)
<i>K. pneumoniae</i>	6 (5,8)
<i>K. oxytoca</i>	5 (4,8)
<i>P. mirabilis</i>	4 (3,8)
Otras enterobacterias	6 (5,8)
<b>BGNMF*</b>	<b>10 (9,6)</b>
<i>P. aeruginosa</i>	5 (4,8)
<i>A. baumannii</i>	5 (4,8)
<b>Estafilococos</b>	<b>19 (18,3)</b>
<i>S. aureus</i>	16 (15,4)
<i>S. epidermidis</i>	3 (2,9)
<b>Estreptococos</b>	<b>11 (10,6)</b>
<i>S. pneumoniae</i>	6 (5,8)
Otros estreptococos	5 (4,8)
<b>Enterococos</b>	<b>7 (6,7)</b>
<i>E. faecalis</i>	3 (2,9)
<i>E. faecium</i>	4 (3,8)
<i>Enterococcus sp.</i>	2 (1,9)
<b>Otros microorganismos</b>	<b>5 (4,8)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>104 (100)</b>

**Tabla 30:** Documentación microbiológica de los pacientes con sepsis grave o shock séptico.

### **CURVAS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER: IMPACTO DE INMUNOGLOBULINAS PLASMÁTICAS**

Para el análisis de supervivencia se utilizó el estimador Kaplan-Meier. Para ello, se calcularon los deciles desde el percentil 10 al percentil 90 de cada uno de los isotipos y subclases de inmunoglobulinas, a excepción de la inmunoglobulina E que no se analizó debido a que los valores encontrados fueron extremadamente bajos con una mínima variabilidad entre pacientes y por tanto, la repercusión biológica era difícilmente evaluable.

Se crearon variables categóricas en función de los percentiles para evaluar la supervivencia en pacientes por encima y por debajo de dichos niveles. El decil que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aplicando el test log-Rank, se utilizó como punto de corte. El tiempo fue censurado a día 28 de seguimiento desde el momento del diagnóstico de SG o SS.

Las tablas que se presentan a continuación muestran los niveles plasmáticos de los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas asociados a cada decil, y la significación estadística expresada por el valor  $p$  al aplicar el test log Rank (Tablas 31, 32, 34-37 y 39).

Gráficamente, el impacto sobre la supervivencia se analizó mediante curvas Kaplan-Meier (Figuras 39-41) que muestran cómo cambia el tiempo medio de supervivencia, según el paciente tenga unos niveles de inmunoglobulinas plasmáticas en el momento del diagnóstico inferiores o iguales al punto de corte estadísticamente significativo previamente establecido para cada inmunoglobulina.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

#### **INMUNOGLOBULINA G TOTAL**

Los valores de IgG total se calcularon a partir de la suma de los valores absolutos de las cuatro subclases de inmunoglobulinas cuantificadas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La tabla 31 muestra los valores de inmunoglobulinas y el valor de significación estadística al aplicar el test log Rank.

PERCENTIL	N (IGG TOTAL MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	246	n.s
20	346	0,056
30	398	n.s
40	482	n.s
50	579	n.s
60	702	n.s
70	828	n.s
80	990	n.s
90	1254	n.s

**Tabla 31:** Percentiles para la inmunoglobulina G total.

Ningún percentil presentó diferencias estadísticamente significativas aunque el percentil 20 mostró cierta tendencia con un valor de  $p$  de 0,056. No se consideró ningún punto de corte asociado a los niveles de IgG total para el análisis de supervivencia.

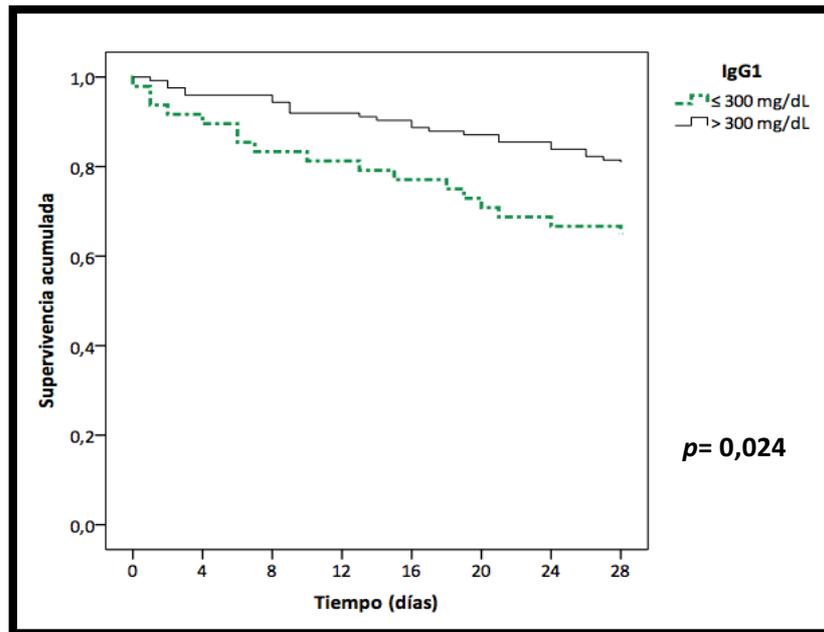
#### INMUNOGLOBULINA G<sub>1</sub>

Cuando se evaluaron los diferentes percentiles de los niveles de inmunoglobulinas de tipo IgG1, se obtuvo significación estadística para el percentil 30 ( $p= 0,024$ ) que equivalía a 300 mg/dl de inmunoglobulina G1 plasmática.

PERCENTIL	N (IGG <sub>1</sub> MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	174	n.s
20	256	n.s
<b>30</b>	<b>300</b>	<b>0,024</b>
40	376	n.s
50	432	n.s
60	515	n.s
70	632	n.s
80	756	n.s
90	978	n.s

**Tabla 32:** Percentiles para la inmunoglobulina G<sub>1</sub>.

La figura 39 muestra como aquellos pacientes diagnosticados de SG o SS en el momento del ingreso en UCI con niveles de inmunoglobulina IgG1 por debajo de 300 mg/dl, fallecían más rápidamente ( $p= 0,024$ ):



**Figura 39:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para valores de  $IgG_1$  estableciendo el punto de corte en el percentil 30 (300 mg /dl).

La tabla 33 muestra la relación de pacientes que sobreviven durante el periodo de seguimiento, con niveles por encima y por debajo del punto de corte. De ella podemos extraer que de los 17 pacientes que fallecen con niveles por debajo de 300 mg/dl de  $IgG_1$  a lo largo del periodo de seguimiento del estudio, nueve de ellos fallecen en los primeros diez días, lo que supone una mortalidad del 50%. En cambio, la mortalidad a los diez días de seguimiento en el grupo de pacientes con niveles por encima del punto de corte fue del 28%.

TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	≤ 300 MG/DL $IgG_1$ (N=48)	> 300 MG/DL $IgG_1$ (N=124)
0	48	124
4	43	119
8	40	117
12	39	114
16	37	110
20	32	108
24	34	104
28	31	100

**Tabla 33:** Número de pacientes con niveles de  $IgG_1$  por encima y por debajo del punto de corte que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento.

**INMUNOGLOBULINA G<sub>2</sub>**

Ningún percentil mostró diferencias estadísticamente significativas y por tanto, no se consideró ningún punto de corte asociado a los niveles de IgG<sub>2</sub> para el análisis de supervivencia.

PERCENTIL	N (IGG <sub>2</sub> MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	6	n.s
20	10	n.s
30	14	n.s
40	17	n.s
50	20	n.s
60	27	n.s
70	34	n.s
80	41	n.s
90	53	n.s

**Tabla 34:** Percentiles para la inmunoglobulina G<sub>2</sub>.

**INMUNOGLOBULINA G<sub>3</sub>**

Ningún percentil mostró diferencias estadísticamente significativas y por tanto, no se consideró ningún punto de corte asociado a los niveles de IgG<sub>3</sub> para el análisis de supervivencia.

PERCENTIL	N (IGG <sub>3</sub> MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	17	n.s
20	33	n.s
30	39	n.s
40	46	n.s
50	62	n.s
60	80	n.s
70	97	n.s
80	133	n.s
90	189	n.s

**Tabla 35:** Percentiles para la inmunoglobulina G<sub>3</sub>.

INMUNOGLOBULINA G<sub>4</sub>

Ningún percentil presentó diferencias estadísticamente significativas, aunque el percentil 20 mostró cierta tendencia con un valor de  $p$  de 0,069. No se consideró ningún punto de corte asociado a los niveles de IgG<sub>4</sub> para el análisis de supervivencia.

PERCENTIL	N (IGG <sub>4</sub> MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	3	n.s
20	6	0,069
30	11	n.s
40	15	n.s
50	25	n.s
60	35	n.s
70	48	n.s
80	73	n.s
90	115	n.s

**Tabla 36:** Percentiles para la inmunoglobulina G<sub>4</sub>.

## INMUNOGLOBULINA M

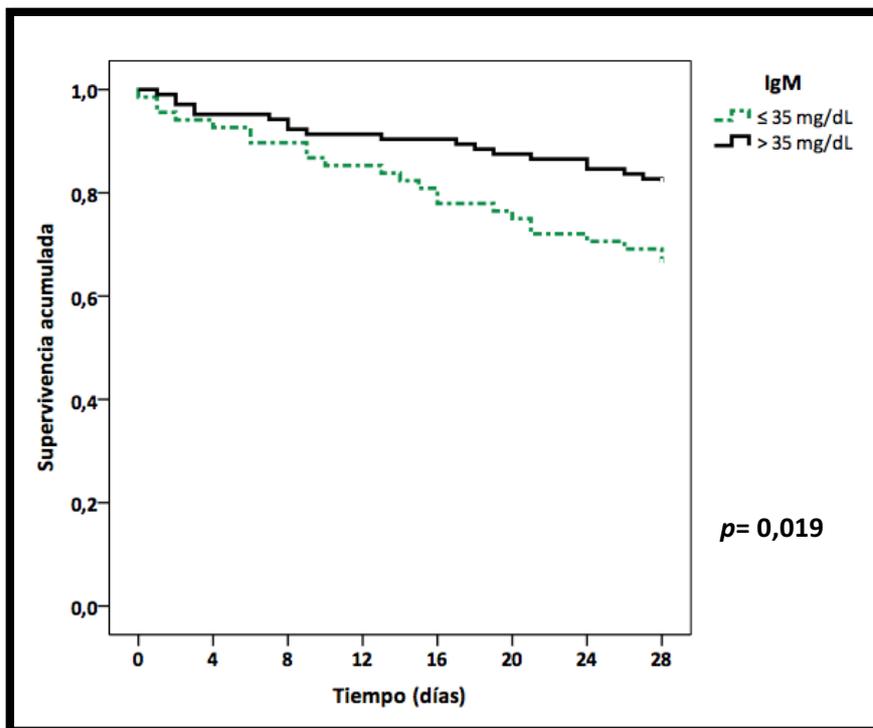
La evaluación de los diferentes percentiles de los niveles de inmunoglobulinas de tipo IgM, mostró significación estadística para el percentil 40 ( $p= 0,019$ ) que equivalía a 35 mg/dl de inmunoglobulina M plasmática.

PERCENTIL	N (IGM MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	13	n.s
20	20	0,068
30	27	n.s
<b>40</b>	<b>35</b>	<b>0,019</b>
50	42	0,087
60	48	n.s
70	54	0,070
80	74	n.s
90	110	n.s

**Tabla 37:** Percentiles para la inmunoglobulina M.

La figura 40 muestra como aquellos pacientes con niveles de IgM por debajo de 35 mg/dl fallecían más rápidamente que aquellos con niveles por encima de ese punto de corte.

Durante el estudio fallecieron un total de 42 pacientes de los cuales 23 tenían niveles de IgM por debajo de 35 mg/dl (54,8%). El 30% de los pacientes que tenían niveles bajos de IgM fallecieron a lo largo de la primera semana de seguimiento, y la mortalidad en este grupo alcanzó el 65,3% al cumplir la segunda semana, un 12,7% más que en el grupo de pacientes con niveles por encima del punto de corte (Tabla 38).



**Figura 40:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para valores de IgM estableciendo el punto de corte en el percentil 40 (35 mg /dl).

TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	≤ 35 MG/DL IGM (N=68)	> 35 MG/DL IGM (N=104)
0	67	104
4	63	99
8	61	96
12	58	95
16	53	94
20	51	91
24	48	88
28	45	85

**Tabla 38:** Número de pacientes con niveles de IgM por encima y por debajo del punto de corte que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento.

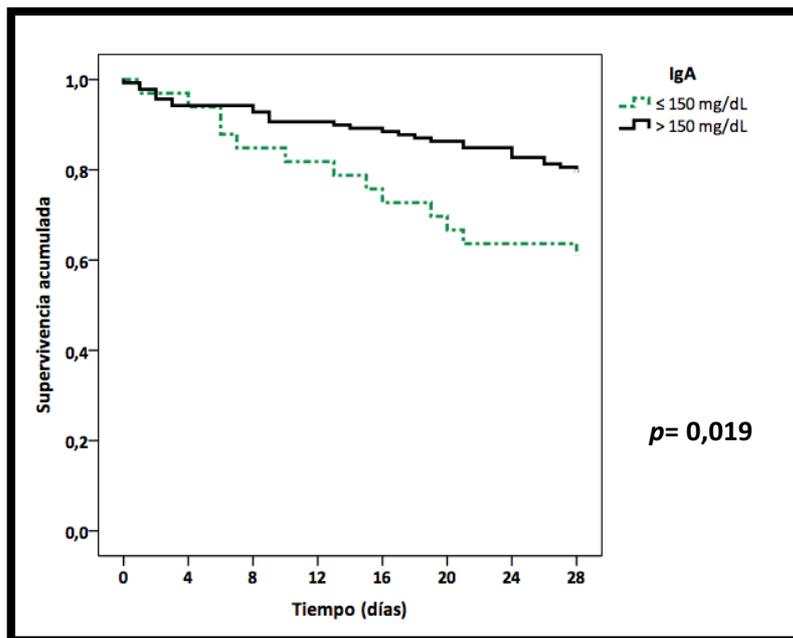
#### INMUNOGLOBULINA A

Para la IgA se encontró que los percentiles 10 y 20, que equivalían a 94 mg/dl y 150 mg/dl respectivamente, inducían cambios en el tiempo de supervivencia estadísticamente significativos. Finalmente, se estableció el punto de corte en 150 mg/dl (percentil 20) por considerarse un punto de corte con mayor utilidad clínica.

PERCENTIL	N (IgA MG/DL)	TEST LOG RANK (P)
10	94	0,011
20	150	<b>0,019</b>
30	196	n.s
40	259	n.s
50	298	n.s
60	378	n.s
70	467	n.s
80	596	n.s
90	1156	n.s

**Tabla 39:** Percentiles para la inmunoglobulina A.

La curva de supervivencia para los pacientes con niveles por encima y por debajo del punto de corte mostró lo siguiente (Figura 41):



**Figura 41:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para valores de IgA estableciendo el punto de corte en el percentil 20 (150 mg/dl).

De la misma manera que para la IgG1 y para la IgM, los pacientes con niveles por debajo del punto de corte establecido para la IgA fallecían antes. En relación a la mortalidad en este grupo, 13 pacientes con niveles por debajo de 150 mg/dl fallecieron a lo largo del estudio. En la primera semana fallecieron cinco pacientes, lo que supuso una mortalidad del 38,5%, valor cuatro puntos superior respecto de la mortalidad observada en el grupo de pacientes con niveles por encima de 150 mg/dl (34,5%).

TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	≤ 150 MG/DL IGA (N=33)	> 150 MG/DL IGA (N=139)
0	33	138
4	31	131
8	28	129
12	27	126
16	24	123
20	22	120
24	21	116
28	19	110

**Tabla 40:** Número de pacientes con niveles de IgA por encima y por debajo del punto de corte que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento.

En resumen, para la IgG total, el único punto de corte que se aproximó a la significación estadística fue el percentil 20, que equivalía a 346 mg/dl ( $p=0,056$ ). El test de log Rank no mostró significación estadística para ninguno de los percentiles obtenidos para la IgG2, IgG3 e IgG4, a pesar de que el percentil 20 (6 mg/dl) de la IgG4 estuvo próximo a la significación estadística ( $p=0,069$ ). En el caso de IgM, se obtuvo significación estadística en el percentil 40 (35 mg/dl) y para IgA se obtuvo significación en los percentiles 10 y 20, seleccionándose finalmente el percentil 20 por ser un punto de corte más alto con mayor utilidad clínica.

Finalmente, los puntos de corte con impacto en la supervivencia de los pacientes con niveles bajos de inmunoglobulinas fueron los siguientes:

IgG<sub>1</sub> (percentil 30): 300 mg/dl

IgM (percentil 40): 35 mg/dl

IgA (percentil 20): 150 mg/dl

Estos valores son compatibles con hipogammaglobulinemia tanto para IgG1 como para IgM de acuerdo con los rangos de referencia establecidos en nuestro laboratorio: IgG1 (344–966 mg/dl), IgM (60-220 mg/dl) e IgA (117-420 mg/dl).

**CURVAS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER: IMPACTO DE INMUNOSCORES**

**GENERACIÓN DE INMUNOSCORES:**

Los Inmunoscores (IS) se crearon para clasificar a los pacientes en función de si tenían dos o más niveles de inmunoglobulinas bajas. Para ello, se utilizaron los puntos de corte anteriormente establecidos generando cuatro nuevas variables categóricas correspondiendo cada una de ellas a un IS.

La clasificación de los pacientes se realizó de la siguiente manera: aquellos pacientes que presentaban niveles por debajo de los puntos de corte establecidos para las inmunoglobulinas que forman el Inmunoscore se les asignó el valor 0, y al resto de pacientes que no cumplían dichas características se les asignó el valor 1 (Tabla 41).

INMUNOSCORE	VALOR ASIGNADO	
	0	1
IS IgG1 IgM IgA	Pacientes con: IgG1 ≤ 300 mg/dl + IgM ≤ 35 mg/dl + IgA ≤ 150 mg/dl	Resto de combinaciones
IS IgG1 IgM	Pacientes con: IgG1 ≤ 300 mg/dl + IgM ≤ 35 mg/dl	
IS IgG1 IgA	Pacientes con: IgG1 ≤ 300 mg/dl + IgA ≤ 150 mg/dl	
IS IgM IgA	Pacientes con: IgM ≤ 35 mg/dl + IgA ≤ 150 mg/dl	

**Tabla 41:** Descripción de Inmunoscores.

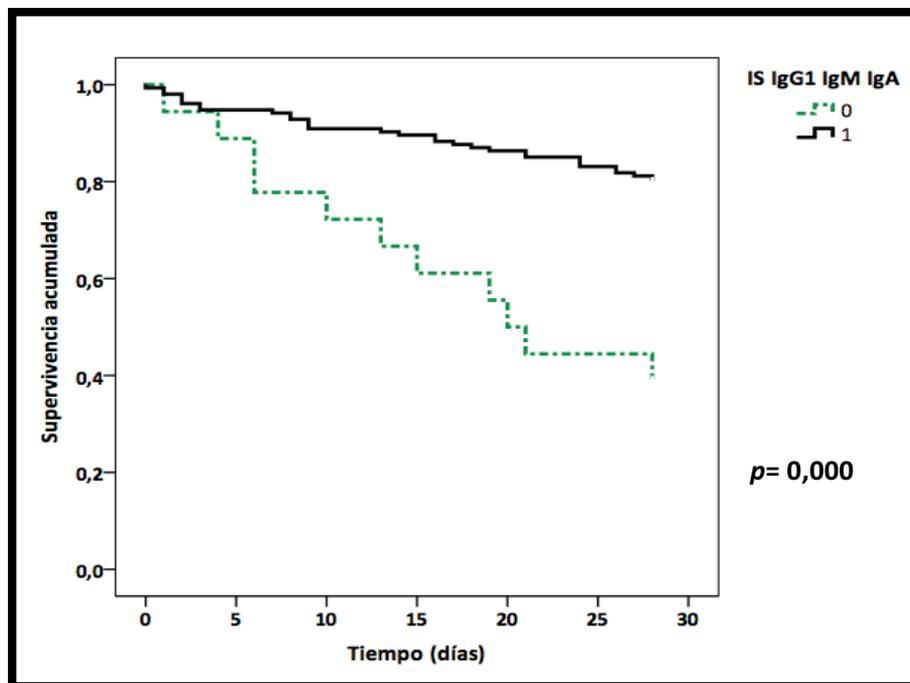
Las inmunoglobulinas IgG2, IgG3, IgG4 y el total de IgG no se incluyeron en los IS por no haberse encontrado puntos de corte estadísticamente significativos.

**IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA**

Los IS se incluyeron como variable categórica para el análisis de supervivencia mediante el estimador Kaplan-Meier obteniendo los siguientes resultados:

### INMUNOSCORE IGG1 IGM IGA

En la figura 42 se muestra de forma gráfica como varía la supervivencia a lo largo de los 28 días de seguimiento objetivándose que aquellos pacientes con niveles bajos para las inmunoglobulinas G1, M y A, fallecían más rápido ( $p < 0,001$ ).



**Figura 42:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG1 IgM IgA.

De los 172 pacientes que formaron la cohorte de estudio, 18 presentaron valores bajos de forma simultánea para las tres inmunoglobulinas. Durante el periodo de estudio fallecieron 11, es decir un 61%. En el otro grupo la mortalidad alcanzó el 15,6% (Tabla 42).

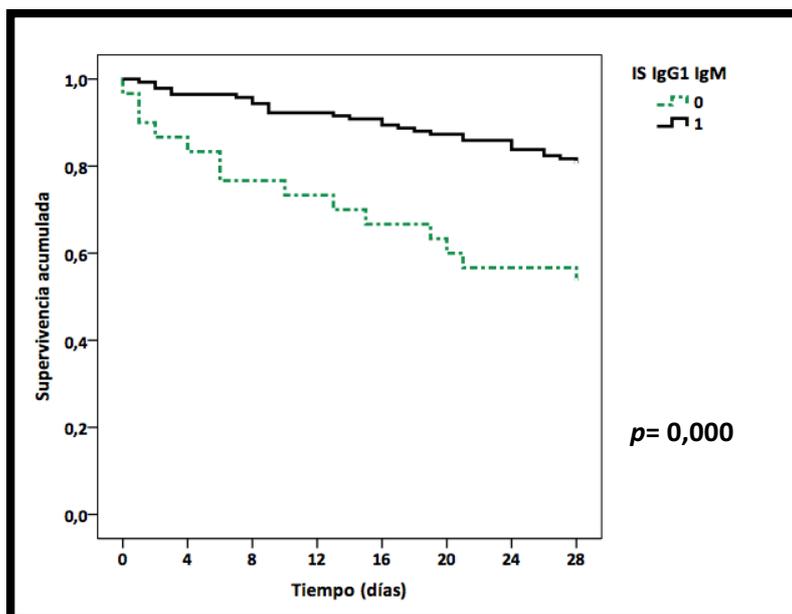
TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	IS (IgG1 IgM IgA) = 0 (N=18)	IS (IgG1 IgM IgA) = 1 (N=154)
0	18	153
4	16	146
8	14	143
12	13	140
16	11	136
20	9	133
24	8	128
28	7	123

**Tabla 42:** Número de pacientes que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento para el IS IgG1 IgM IgA.

**INMUNOSCORE IgG1 IgM**

Cuando se evaluó el impacto de niveles bajos para IgG1 e IgM, las curvas de supervivencia mostraron cómo cambió el tiempo medio de supervivencia en función de si los pacientes tenían niveles por debajo de los puntos de corte para IgG1 e IgM de forma simultánea o el resto de combinaciones. La gráfica muestra que pacientes con niveles bajos tuvieron un peor pronóstico ( $p < 0,001$ ) (Figura 43).

El número de pacientes con niveles bajos fue de 30, y durante la primera semana fallecieron siete, un 23,3% (Tabla 43).



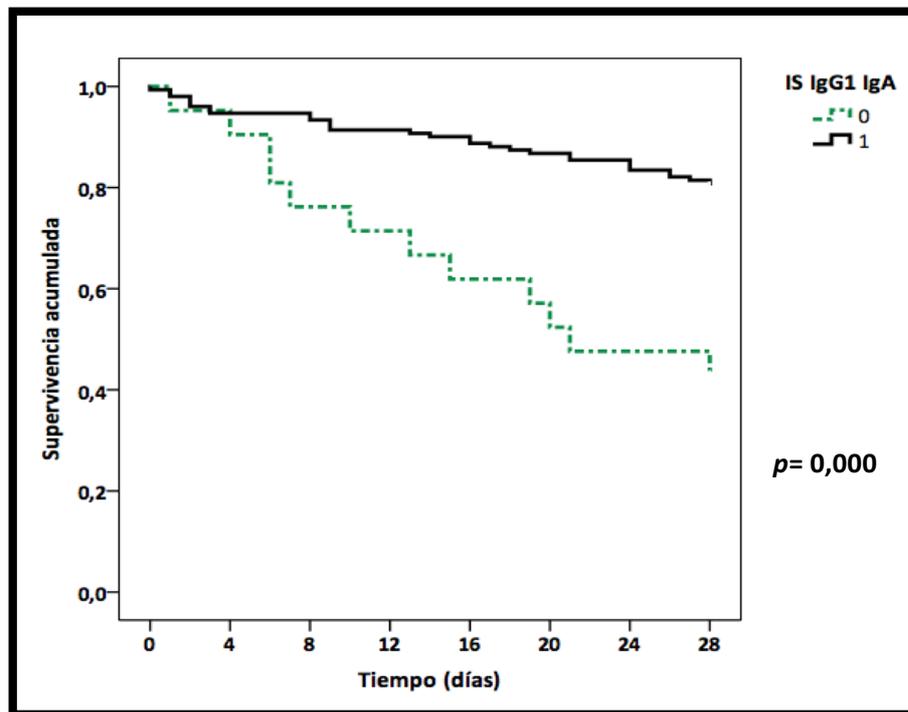
**Figura 43:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG1 IgM.

TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	IS (IgG1 IgM) = 0 (N=30)	IS (IgG1 IgM) = 1 (N=142)
0	29	142
4	25	137
8	23	134
12	22	131
16	20	127
20	18	124
24	17	119
28	16	114

**Tabla 43:** Número de pacientes que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento para el IS IgG1 IgM.

### INMUNOSCORE IGG1 IGA

En cuanto al IS formado por la IgG1 e IgA, el test log Rank aplicado para este análisis de Kaplan-Meier mostró una significación menor de 0,001 observándose la misma tendencia que en casos anteriores. De forma gráfica, la figura 44 muestra una caída brusca en la curva que representa los pacientes con niveles bajos de las inmunoglobulinas que componen el IS (IgG1 e IgA).



**Figura 44:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG1 IgA.

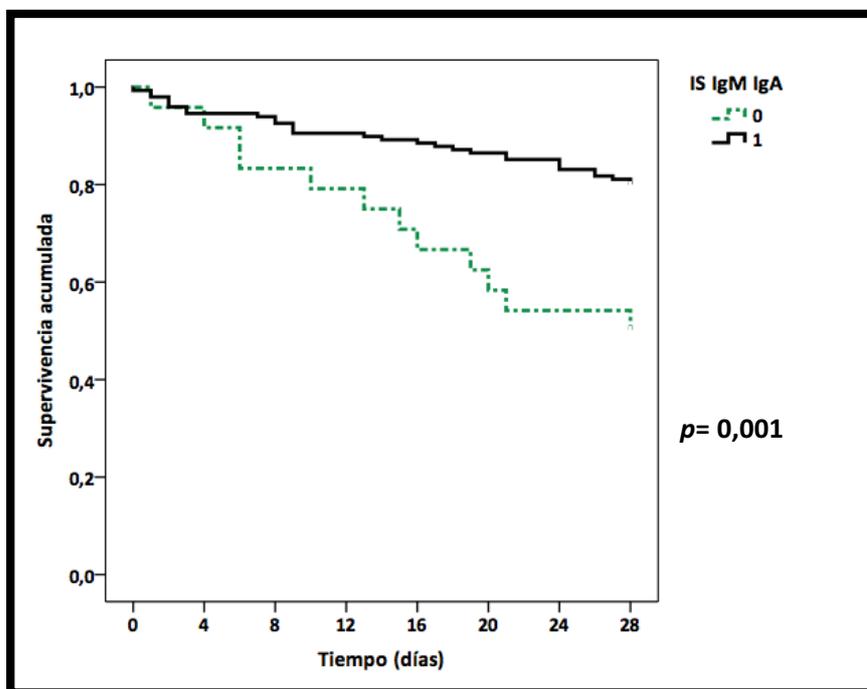
Del total de pacientes, 21 presentaron niveles bajos de forma simultánea para las inmunoglobulinas G1 y A. Durante la primera semana de seguimiento, la mortalidad en el grupo de pacientes con niveles bajos fue del 23,8%, muy superior a la observada en el grupo que no cumplían dicha condición cuya mortalidad fue del 6,6%.

TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	IS (IgG1 IgA) = 0 (N=21)	IS (IgG1 IgA) = 1 (N=151)
0	21	150
4	19	143
8	16	141
12	15	138
16	13	134
20	11	131
24	10	126
28	9	121

**Tabla 44:** Número de pacientes que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento para el IS IgG1 IgA.

**INMUNOSCORE IGM IGA**

Para el IS formado por la IgM e IgA se observó un nivel de significación igual que para el resto de IS evaluados ( $p= 0,001$ ). La curva de supervivencia muestra un cambio importante en el tiempo de supervivencia observándose que aquellos pacientes con niveles bajos para ambas inmunoglobulinas, fallecían más rápido (Figura 45).



**Figura 45:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgM IgA.

TIEMPO (DÍAS)	N PACIENTES SUPERVIVIENTES	
	IS (IgM IgA) = 0 (N=24)	IS (IgM IgA) = 1 (N=148)
0	24	147
4	22	140
8	20	137
12	19	134
16	16	131
20	14	128
24	13	123
28	12	118

**Tabla 45:** Número de pacientes que sobrevivieron a lo largo del periodo de seguimiento para el IS IgM IgA.

Los resultados demuestran que pacientes diagnosticados de SG o SS en el momento del ingreso en UCI con niveles bajos de una o varias inmunoglobulinas en cualquiera de sus combinaciones, fallecen antes. En los IS que contenían IgG1 se observó una caída más abrupta en la curva de supervivencia que en aquellos que no contenían dicha inmunoglobulina. La mortalidad en la primera semana de seguimiento para todos los grupos con niveles bajos de una o varias inmunoglobulinas, fue superior que en el grupo con niveles por encima de los puntos de corte definidos.

**ESTUDIO COMPARATIVO E IMPACTO DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS PLASMÁTICAS E INMUNOSCORES**

**COMPARACIÓN NIVELES INMUNOGLOBULINAS E INMUNOSCORES**

Se compararon los niveles de las inmunoglobulinas de forma individual y conjunta (en forma de Inmunoscores) entre los grupos de supervivientes y fallecidos. Todas las comparaciones fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,005$ ), con un mayor nivel de significación cuando se compararon los IS que evaluaban el impacto de niveles bajos de varias inmunoglobulinas.

La mortalidad global fue del 27,9%, 39,2% y 19,2% para IgG1, IgM e IgA respectivamente (Tabla 46).

DATOS ANALÍTICOS	SUPERVIVIENTES (N=130)	FALLECIDOS (N=42)	TOTAL (N=172)	P
IgG1 (decil 3) ( $\leq 300$ mg/dl)	31 (23,8)	17 (40,5)	48 (27,9)	<b>0,037</b>
IgM (decil 4) ( $\leq 35$ mg/dl)	45 (34,6)	23 (54,8)	68 (39,2)	<b>0,020</b>
IgA (decil 2) ( $\leq 150$ mg/dl)	20 (15,4)	13 (30,9)	33 (19,2)	<b>0,026</b>
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	7 (5,4)	11 (26,2)	18 (10,5)	<b>0,000</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	16 (12,3)	14 (33,3)	30 (17,4)	<b>0,002</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	9 (6,9)	12 (28,6)	21 (12,2)	<b>0,000</b>
IS (IgM IgA) = 0	12 (9,2)	12 (28,6)	24 (13,9)	<b>0,002</b>

**Tabla 46:** Comparación inmunoglobulinas plasmáticas e IS entre pacientes supervivientes y fallecidos.

Para comprobar que aquellos pacientes previamente inmunosuprimidos, no estaban actuando como sesgo en los resultados del impacto de niveles bajos de inmunoglobulinas, se compararon los Inmunoscores en función del estado previo de inmunosupresión entre los pacientes fallecidos y no se observaron diferencias significativas, minimizando de esta forma la influencia de la inmunosupresión sobre los resultados obtenidos (Tabla 47).

IS	INMUNOSUPRESIÓN (N=16)	P
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	6 (37,5)	0,191
IS (IgG1 IgM) = 0	7 (43,8)	0,261
IS (IgG1 IgA) = 0	6 (37,5)	0,315
IS (IgM IgA) = 0	7 (43,8)	0,088

**Tabla 47:** Comparación de IS de pacientes fallecidos en función del estado previo de inmunosupresión.

### NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS Y TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA

La siguiente tabla presenta la distribución de los pacientes fallecidos en función de si sus niveles de inmunoglobulinas estaban por encima o por debajo de los puntos de corte, así como el tiempo medio de supervivencia para cada inmunoglobulina estudiada de forma individual o formando parte de los IS.

El tiempo medio de supervivencia fue significativamente menor en el grupo de pacientes que tenían niveles bajos para cada una de las inmunoglobulinas, tanto de forma aislada como conjunta (IS). Estos resultados resaltan la mayor influencia en el pronóstico de la IgG1 ya que el tiempo medio de supervivencia para los pacientes con niveles por debajo de 300 mg/dl fue de 21 días en comparación a los 22 y 23 días de media para la IgA e IgM.

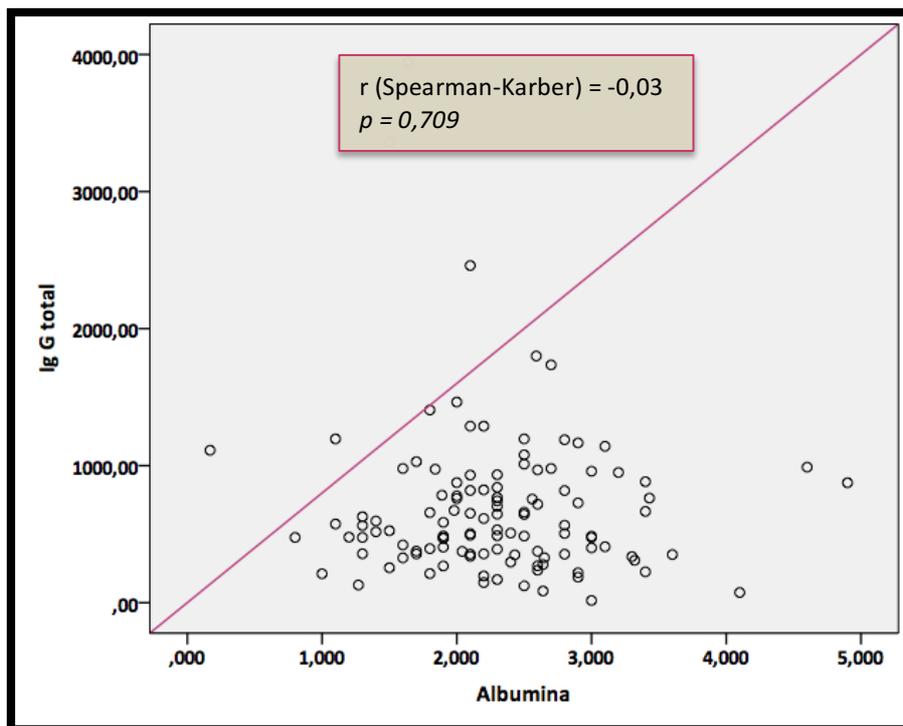
Cuando se evaluaron los tiempos medios de supervivencia para los IS se observó un impacto mayor en el tiempo de supervivencia ( $p < 0,001$ ), ya que aquellos pacientes con niveles bajos para dos o más inmunoglobulinas, fallecían hasta cuatro días antes respecto de aquellos pacientes con niveles bajos para un solo isotipo o subclase de inmunoglobulina, y hasta seis días en comparación con pacientes con niveles por encima del punto de corte (Tabla 48).

VARIABLE	< PUNTO DE CORTE				> PUNTO DE CORTE				$\Delta$	p
	N	Días	IC 95%		N	Días	IC 95%			
			INFERIOR	SUPERIOR			INFERIOR	SUPERIOR		
IgG1 ( $\leq 300$ mg/dl)	17	22,1	19,3	24,9	25	25,3	24,1	26,5	3,2	<b>0,024</b>
IgM ( $\leq 35$ mg/dl)	23	23,0	20,9	25,1	19	25,3	24,0	26,7	2,3	<b>0,019</b>
IgA ( $\leq 150$ mg/dl)	13	22,0	18,8	25,1	29	25,0	23,8	26,2	3,0	<b>0,019</b>
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	11	18,8	14,1	23,5	31	25,1	23,9	26,2	6,3	<b>0,000</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	14	19,8	15,8	23,7	28	25,4	24,3	26,5	5,6	<b>0,000</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	12	19,1	14,8	23,4	30	25,2	24,0	26,3	6,1	<b>0,000</b>
IS (IgM IgA) = 0	12	20,6	23,9	26,2	30	25,0	16,7	24,4	4,4	<b>0,001</b>

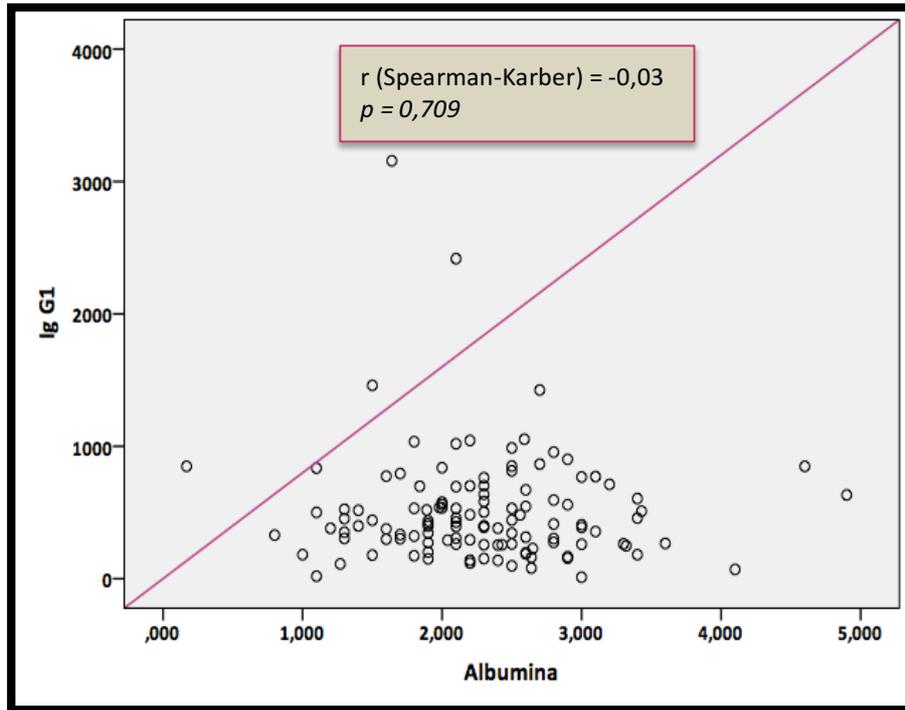
**Tabla 48:** *Tiempos medios de supervivencia y fallecimiento a partir de los puntos de corte de las inmunoglobulinas: n: número de pacientes;  $\Delta$  (días): representa [(tiempo medio de supervivencia en pacientes con valores de inmunoglobulinas por encima del punto de corte)] - [(tiempo medio de supervivencia en pacientes con valores de inmunoglobulinas por debajo del punto de corte)].*

**CORRELACIÓN NIVELES ALBÚMINA E INMUNOGLOBULINAS PLASMÁTICAS**

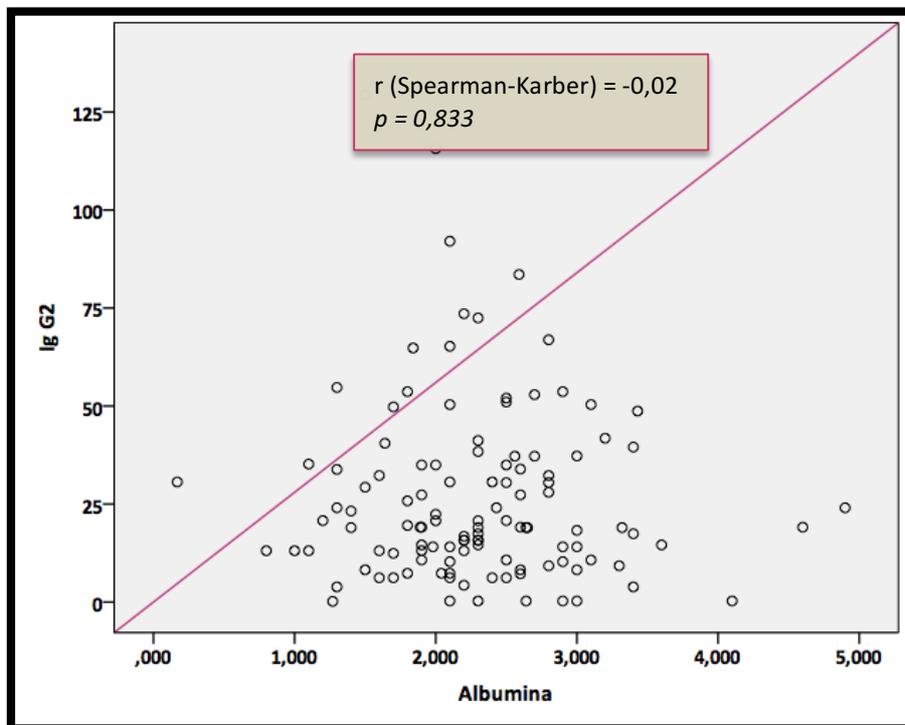
A continuación, se representa de forma gráfica la ausencia de colinealidad entre los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas, así como el Coeficiente de correlación de Spearman (rho) obtenido al analizar los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas con la albumina plasmática (Figuras 46 a 52).



**Figura 46:** Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgG total.



**Figura 47:** Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgG1.



**Figura 48:** Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgG2.

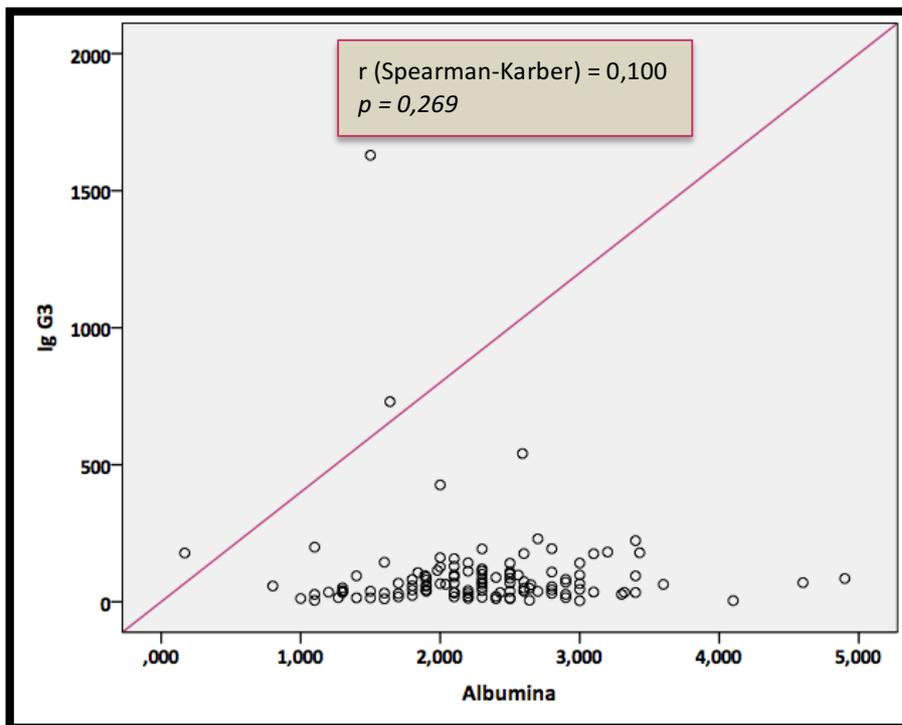


Figura 49: Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgG3

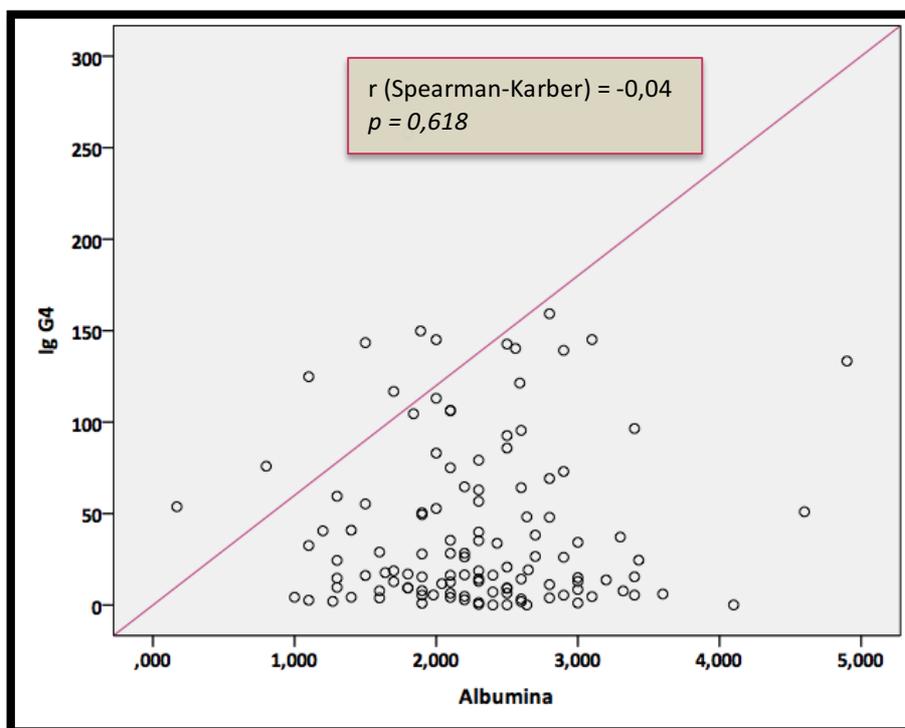
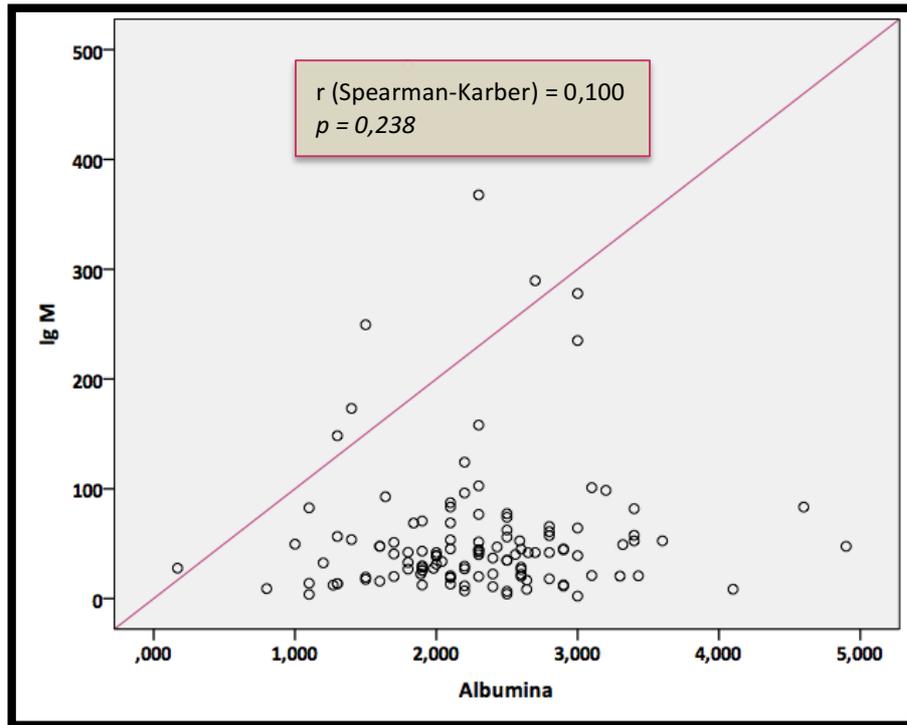
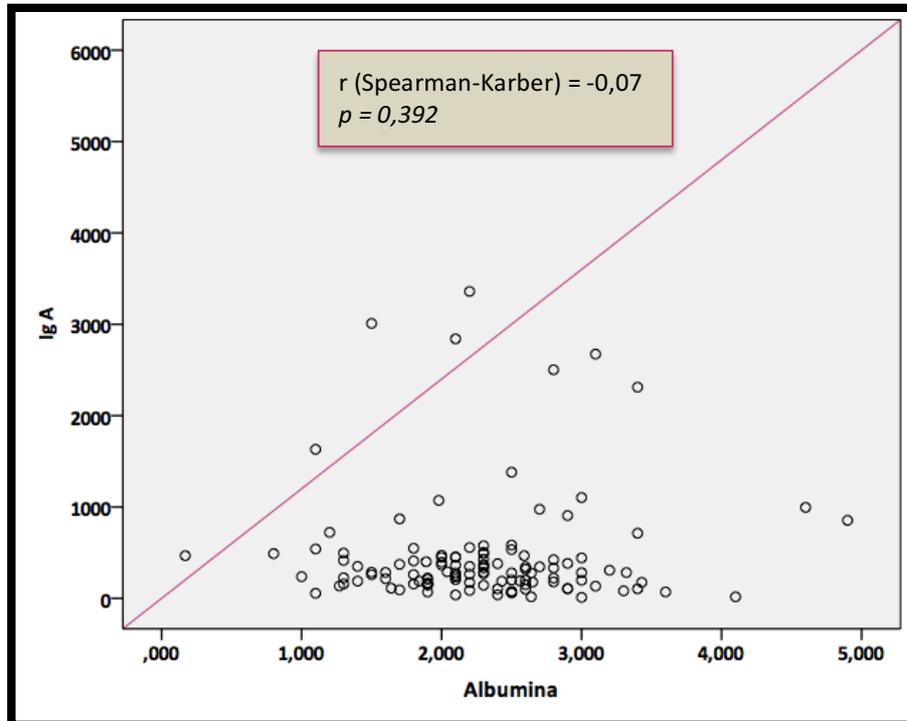


Figura 50: Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgG4



**Figura 51:** Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgM



**Figura 52:** Coeficiente de correlación de Spearman entre albúmina e IgA

La falta de significación estadística indica la ausencia de colinealidad entre la albumina y las inmunoglobulinas minimizando el potencial impacto de la hemodilución de la muestra en nuestros resultados.

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE COMORBILIDADES**

Para establecer los modelos predictivos de mortalidad mediante análisis multivariante, primero seleccionamos mediante RLB aquellas variables incluidas en los antecedentes personales que se asociaron con riesgo de mortalidad a nivel  $p < 0,1$  (Tabla 49). Se eligieron las características demográficas (edad y sexo) y el estado de gravedad en el momento del ingreso (“score” APACHE-II) como variables clínicas de interés a incluir directamente en el modelo.

ANTECEDENTES PERSONALES	P
Inmunosupresión	0,002
Enfermedad Cardiovascular crónica	n.s
Enfermedad Respiratoria crónica	0,066
Enfermedad Renal crónica	n.s
Enfermedad Hepática crónica	n.s
Diabetes	n.s
Cáncer metastásico	n.s
Alcoholismo	n.s

**Tabla 49:** Análisis univariante para los antecedentes personales mediante RLB.

Las variables que mostraron significación estadística fueron el estado previo de inmunosupresión y la enfermedad respiratoria crónica.

## MODELOS PREDICTIVOS DE MORTALIDAD

### ANÁLISIS MEDIANTE RLB:

#### *Análisis univariante:*

El análisis univariante mostró una clara asociación entre niveles bajos de inmunoglobulinas tipo IgG1 e IgM, y riesgo de muerte en la UCI ( $p < 0,005$ ). No se encontró asociación directa en los niveles de IgA.

En relación a los IS, todos fueron estadísticamente significativos haciendo clara la evidencia de que niveles bajos de varias inmunoglobulinas estaban asociadas con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes con SG o SS en el momento del ingreso en UCI.

Es de interés recalcar que en los IS que contenían IgG1, los OR y por tanto el riesgo de muerte en UCI fueron superiores. Aquellos pacientes con niveles bajos para las tres inmunoglobulinas presentaban un riesgo de muerte 4,58 veces superior ( $p = 0,003$ ) (Tabla 50).

MODELO	OR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IgG1 ( $\leq 300$ mg/dl)	2,07	0,23	0,99	<b>0,050</b>
IgM ( $\leq 35$ mg/dl)	2,15	1,07	4,32	<b>0,032</b>
IgA ( $\leq 150$ mg/dl)	1,99	0,88	4,49	0,097
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	4,58	1,68	12,54	<b>0,003</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	3,41	1,49	7,78	<b>0,004</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	4,09	1,60	10,48	<b>0,003</b>
IS (IgM IgA) = 0	3,07	1,26	7,49	<b>0,014</b>

**Tabla 50:** Análisis univariante mediante RLB. OR: Odds Ratio.

*Análisis multivariante:*

El objetivo del análisis multivariante fue evaluar si la asociación entre niveles de inmunoglobulinas y mortalidad era independiente de potenciales variables de confusión. Las variables de ajuste fueron: edad, sexo, "score" APACHE-II, estado previo de inmunosupresión y enfermedad respiratoria crónica.

El análisis multivariante evidenció que solamente la IgG1 se asociaba de forma independiente con la mortalidad, marcando claras diferencias con el resto de inmunoglobulinas ( $p=0,042$ ). Los pacientes con niveles de IgG1 por debajo de 300 mg/dl tenían 2,5 veces más de riesgo de muerte en UCI independientemente de la edad del individuo, el sexo, el estado de gravedad en el momento del ingreso ("score" APACHE-II) o de si tenía comorbilidades como la inmunosupresión o enfermedad respiratoria crónica.

Todos los IS que contenían IgG1 fueron estadísticamente significativos aumentando el riesgo de muerte hasta 5,27 veces en el caso del IS que contenía las tres inmunoglobulinas (Tabla 51).

MODELO	OR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IgG1 ( $\leq 300$ mg/dl)	2,50	1,04	6,03	<b>0,042</b>
IgM ( $\leq 35$ mg/dl)	1,42	0,60	3,33	0,425
IgA ( $\leq 150$ mg/dl)	1,57	0,58	4,23	0,370
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	5,27	1,41	19,69	<b>0,013</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	3,10	1,13	8,49	<b>0,028</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	4,10	1,28	13,12	<b>0,018</b>
IS (IgM IgA) = 0	2,60	0,82	8,27	0,106

**Tabla 51:** Análisis multivariante mediante RLB. OR: Odds Ratio.

**ANÁLISIS MEDIANTE REGRESIÓN DE COX:***Análisis univariante:*

Para complementar los resultados obtenidos mediante regresión logística binaria, se realizó un análisis univariante y multivariante mediante regresión de Cox (que tiene en cuenta el tiempo de supervivencia) para evaluar la asociación de los niveles de inmunoglobulinas con la mortalidad en UCI.

El análisis univariante confirmó los resultados anteriormente descritos. Todas las inmunoglobulinas, solas o en forma de IS, mostraron diferencias significativas siendo estas diferencias más marcadas en la asociación de niveles bajos de varias inmunoglobulinas (IS) ( $p < 0,001$ ).

MODELO	HR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IgG1 ( $\leq 300$ mg/dl)	2,00	1,08	3,71	<b>0,027</b>
IgM ( $\leq 35$ mg/dl)	2,03	1,11	3,73	<b>0,022</b>
IgA ( $\leq 150$ mg/dl)	2,14	1,11	4,13	<b>0,022</b>
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	4,04	2,02	8,06	<b>0,000</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	3,01	1,58	5,73	<b>0,001</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	3,77	1,93	7,39	<b>0,000</b>
IS (IgM IgA) = 0	2,99	1,53	5,86	<b>0,001</b>

**Tabla 52:** Análisis univariante mediante regresión de Cox. HR: Hazard Ratio.

*Análisis multivariante:*

El análisis multivariante mediante regresión de Cox se realizó incluyendo las mismas variables de ajuste que en el modelo de regresión logística binaria.

Los resultados que se obtuvieron fueron reproducibles: la IgG1 fue la única inmunoglobulina que de forma aislada presentó asociación con el riesgo de muerte en UCI en pacientes diagnosticados de SG o SS en el ingreso. Los IS que contenían IgG1 mostraron una fuerte asociación con la mortalidad y de manera más marcada en aquel que contenía las tres inmunoglobulinas (Tabla 53).

MODELO	HR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IgG1 ( $\leq 300$ mg/dl)	1,93	1,02	1,09	<b>0,042</b>
IgM ( $\leq 35$ mg/dl)	1,13	0,57	2,25	0,731
IgA ( $\leq 150$ mg/dl)	1,30	0,65	2,61	0,466
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	2,22	1,04	4,71	<b>0,038</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	2,14	1,08	4,22	<b>0,028</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	2,05	1,02	4,18	<b>0,049</b>
IS (IgM IgA) = 0	1,55	0,73	3,28	0,252

**Tabla 53:** Análisis multivariante de regresión de Cox. HR: Hazard Ratio.

## ANÁLISIS DE IS MEDIANTE CORTE TRASVERSAL POR PERCENTILES DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (EVALUACIÓN CON IgG1):

El impacto e influencia de los niveles de inmunoglobulinas ha quedado reflejado en los resultados expuestos anteriormente. Para validar el efecto sinérgico de niveles bajos de varias inmunoglobulinas se reanalizaron los datos mediante una nueva estrategia analítica. Se crearon IS a partir de cortes transversales por percentiles: p10, p20, p30 y p40, y se evaluó su impacto en la mortalidad mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier y modelos predictivos de mortalidad mediante RLB.

### KAPLAN-MEIER PARA IS POR PERCENTILES:

El análisis de supervivencia mediante el test log Rank mostró que todos los IS fueron estadísticamente significativos para el p30 (Tabla 54).

IS	TEST LOG RANK (P)			
	PERCENTIL 10	PERCENTIL 20	PERCENTIL 30	PERCENTIL 40
IS (IgG1 IgM IgA)	n.s	0,009	<b>0,001</b>	0,052
IS (IgG1 IgM)	n.s	n.s	<b>0,009</b>	0,023
IS (IgG1 IgA)	0,098	0,001	<b>0,030</b>	n.s
IS (IgM IgA)	0,091	0,001	<b>0,011</b>	0,059

**Tabla 54:** Test log Rank para IS que contienen IgG1 creados a partir de corte trasversal de niveles de inmunoglobulinas por percentiles.

El percentil 30 equivalía a niveles de:

$$\text{IgG1} \leq 306 \text{ mg/dl, IgM} \leq 27 \text{ mg/dl, e IgA} \leq 196 \text{ mg/dl}$$

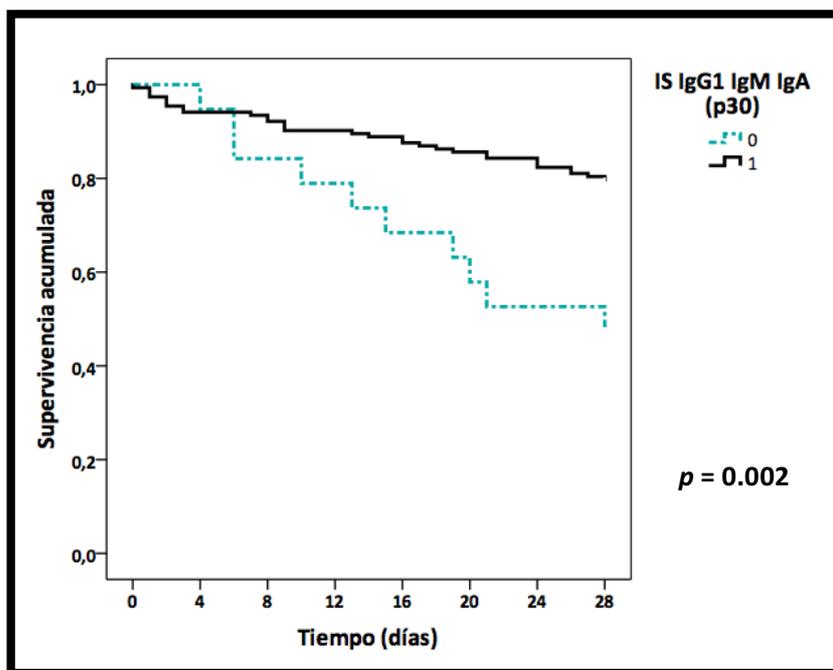
A continuación, se describen los IS para el percentil que presentó significación estadística (p30) que posteriormente se incluyeron en el modelo predictivo de mortalidad:

INMUNOSCORE	VALOR ASIGNADO	
	0	1
IS IgG1 IgM IgA	Pacientes con: IgG1 $\leq$ 306 mg/dl + IgM $\leq$ 27 mg/dl + IgA $\leq$ 196 mg/dl	Resto de combinaciones
IS IgG1 IgM	Pacientes con: IgG1 $\leq$ 306 mg/dl + IgM $\leq$ 27 mg/dl	
IS IgG1 IgA	Pacientes con: IgG1 $\leq$ 306 mg/dl + IgA $\leq$ 196 mg/dl	
IS IgM IgA	Pacientes con: IgM $\leq$ 27 mg/dl + IgA $\leq$ 196 mg/dl	

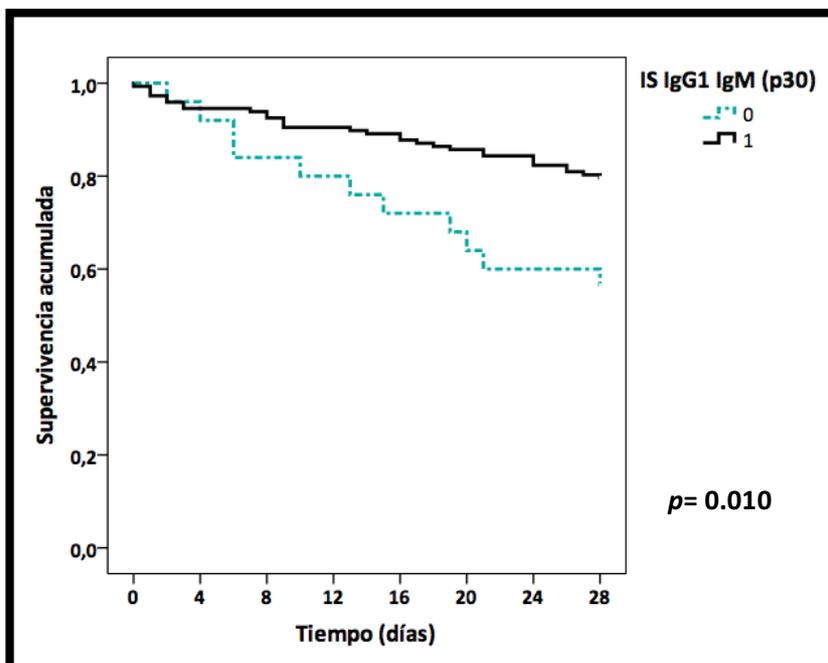
**Tabla 55:** Descripción de IS para el percentil 30 de niveles de inmunoglobulinas.

**CURVAS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER PARA IS CON IG1:**

El análisis de supervivencia mostró que aquellos pacientes con niveles por debajo del punto de corte establecido para cada inmunoglobulina que forma parte del IS, fallecían más rápidamente. De nuevo se observó que el cambio más acentuado se objetivó en la curva que evaluaba el IS que contenía las tres inmunoglobulinas (Figuras 53-56).



**Figura 53:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG1 IgM IgA.



**Figura 54:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG1 IgM.

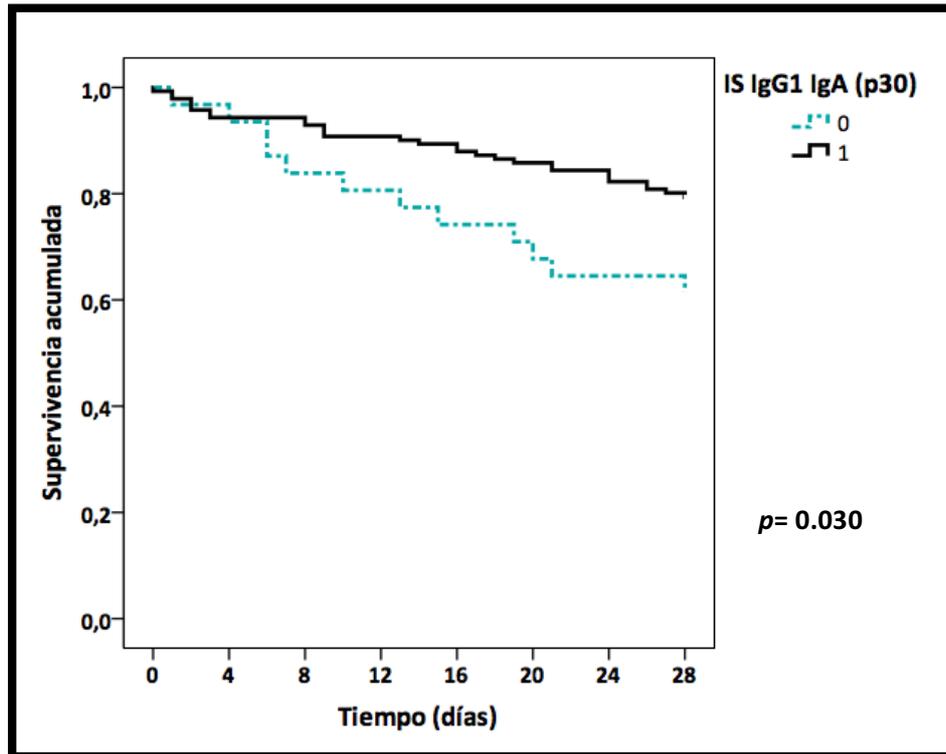


Figura 55: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG1 IgA.

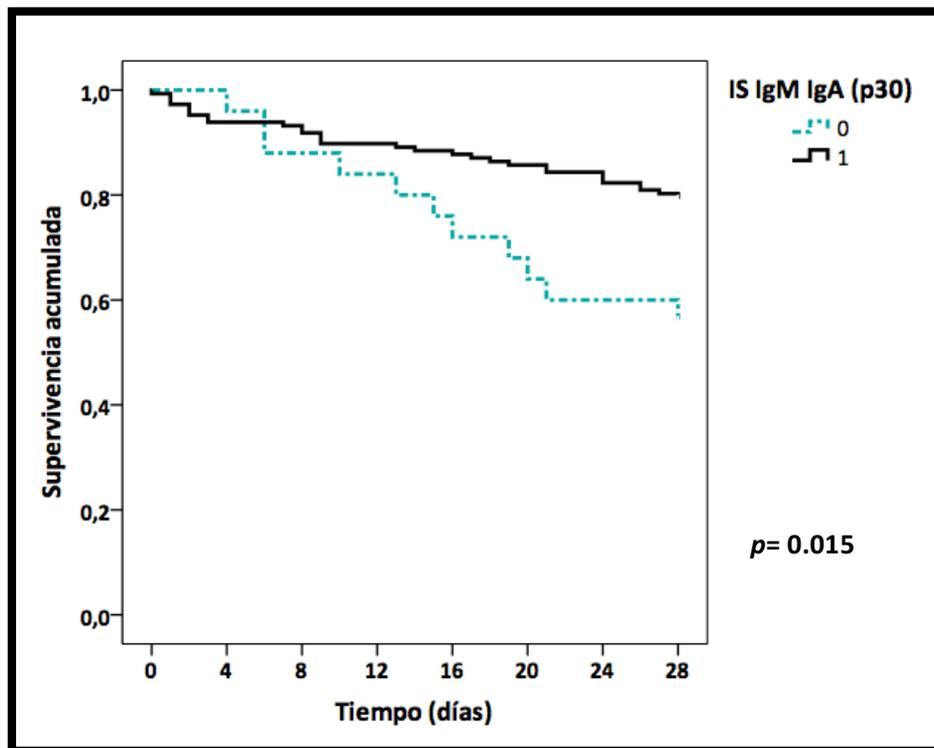


Figura 56: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgM IgA.

**MODELO DE PREDICCIÓN DE MORTALIDAD MEDIANTE RLB PARA IS QUE CONTIENEN IGG1:**

*Análisis univariante:*

En el análisis univariante se observó que la presencia concomitante de niveles bajos de dos o más inmunoglobulinas, aumentaba el riesgo de mortalidad en UCI hasta más de cuatro veces en el caso del IS que incluía a pacientes con niveles bajos para las tres inmunoglobulinas.

MODELO	OR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	4,04	1,51	10,76	<b>0,005</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	2,82	1,17	6,82	<b>0,021</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	2,67	1,18	6,06	<b>0,019</b>
IS (IgM IgA) = 0	2,82	1,17	6,82	<b>0,021</b>

**Tabla 56:** Análisis univariante mediante RLB. OR: Odds Ratio.

*Análisis multivariante:*

El análisis multivariante mostró una clara asociación de niveles bajos de inmunoglobulinas, sobre todo en aquellos pacientes con niveles bajos para IgG1, IgM e IgA. A pesar de la pérdida de significación para los IS IgG1 IgM e IS IgM IgA, es evidente el efecto sinérgico de niveles bajo de inmunoglobulinas y la mortalidad en pacientes con SG y SS.

Las variables de ajuste fueron las mismas que para los análisis multivariantes anteriores: edad, sexo, "score" APACHE-II, estado previo de inmunosupresión y enfermedad respiratoria crónica.

MODELO	OR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	4,62	1,33	15,99	<b>0,016</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	2,75	0,95	7,96	0,063
IS (IgG1 IgA) = 0	3,83	1,35	10,91	<b>0,012</b>
IS (IgM IgA) = 0	2,36	0,80	6,90	0,118

**Tabla 57:** Análisis multivariante mediante RLB. OR: Odds Ratio.

## ANÁLISIS DE IS MEDIANTE CORTE TRASVERSAL POR PERCENTILES DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (EVALUACIÓN CON IGG TOTAL)

La cuantificación de IgG total en el laboratorio se realiza de forma rutinaria y supone una ventaja de coste analítico respecto de la determinación de todos los isotipos y subclases de IgG. Por esta razón, se quiso evaluar la influencia del efecto sinérgico de niveles bajos de inmunoglobulinas en forma de IS conteniendo IgG total en vez de IgG1.

Para su evaluación, se realizaron cortes transversales de los niveles de inmunoglobulinas y se crearon IS para los percentiles p10, p20, p30 y p40.

### KAPLAN-MEIER PARA IS POR PERCENTILES:

El análisis de supervivencia mediante el test log Rank mostró que todos los IS fueron estadísticamente significativos para el p20 (Tabla 58).

IS	TEST LOG RANK (P)			
	PERCENTIL 10	PERCENTIL 20	PERCENTIL 30	PERCENTIL 40
IS (IgG total IgM IgA)	n.s	<b>0,002</b>	0,010	0,083
IS (IgG total IgM)	0,041	<b>0,042</b>	n.s	0,049
IS (IgG total IgA)	0,026	<b>0,000</b>	n.s	n.s
IS (IgM IgA)	0,091	<b>0,001</b>	0,011	0,059

**Tabla 58:** Test log Rank para IS que contienen IgG1 creados a partir de corte transversal de niveles de inmunoglobulinas por percentiles.

El percentil 20 equivalía a niveles de:

$$\text{IgG total} \leq 346 \text{ mg/dl, IgM} \leq 20 \text{ mg/dl, e IgA} \leq 150 \text{ mg/dl}$$

A continuación, se describen los IS para el percentil que presentó significación estadística (p20) que posteriormente se incluyeron en el modelo predictivo de mortalidad:

INMUNOSCORE	VALOR ASIGNADO	
	0	1
IS IgG total IgM IgA	Pacientes con: IgG total ≤ 346 mg/dl + IgM ≤ 20 mg/dl + IgA ≤ 150 mg/dl	Resto de combinaciones
IS IgG total IgM	Pacientes con: IgG total ≤ 346 mg/dl + IgM ≤ 20 mg/dl	
IS IgG total IgA	Pacientes con: IgG total ≤ 346 mg/dl + IgA ≤ 150 mg/dl	
IS IgM IgA	Pacientes con: IgM ≤ 20 mg/dl + IgA ≤ 150 mg/dl	

Tabla 59: Descripción de IS para el percentil 20 de niveles de inmunoglobulinas.

**CURVAS DE SUPERVIVENCIA KAPLAN-MEIER PARA IS CON IG TOTAL**

Los resultados de las curvas de supervivencia mediante el estimador Kaplan-Meier mostraron la misma tendencia observada anteriormente. La presencia concomitante de niveles bajos de inmunoglobulinas se relacionaba directamente con un acortamiento del tiempo de supervivencia (Figuras 57-60).

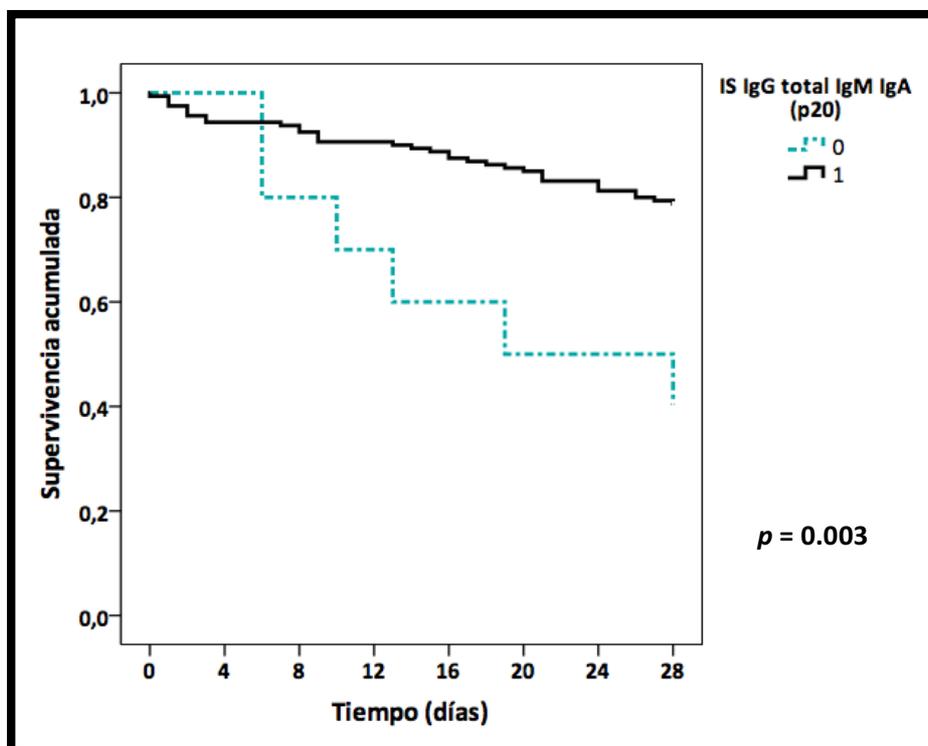


Figura 57: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG total IgM IgA.

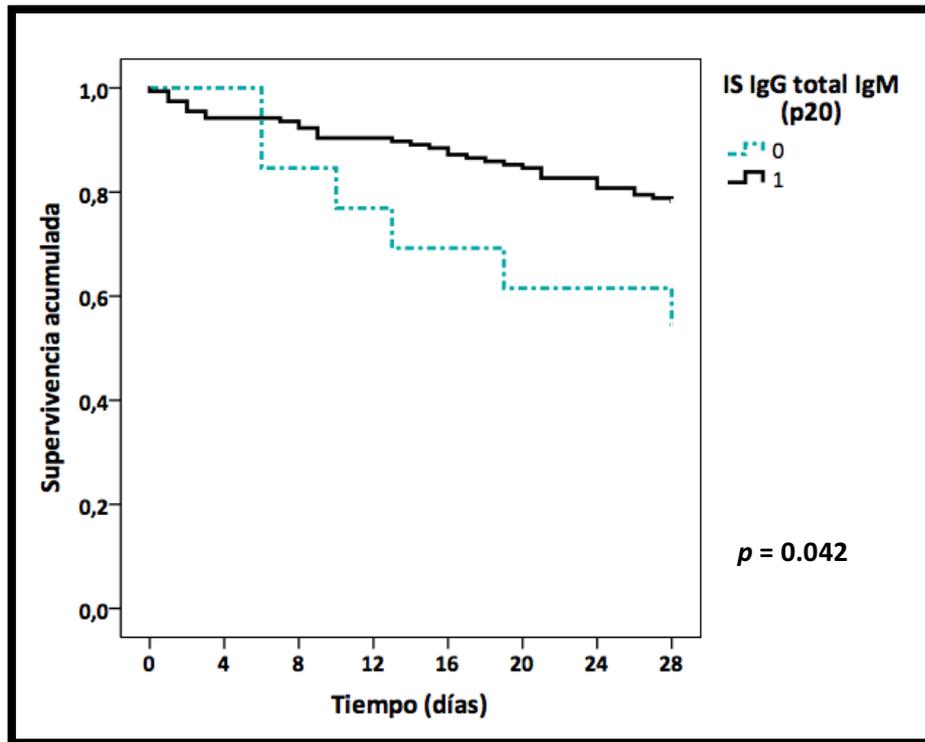


Figura 58: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG total IgM.

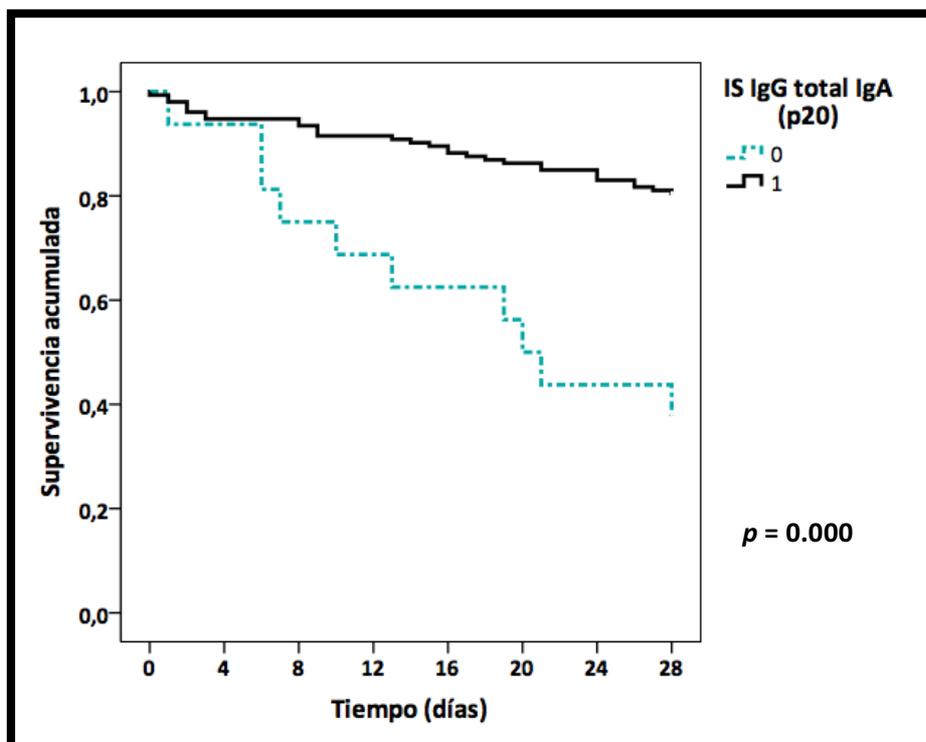
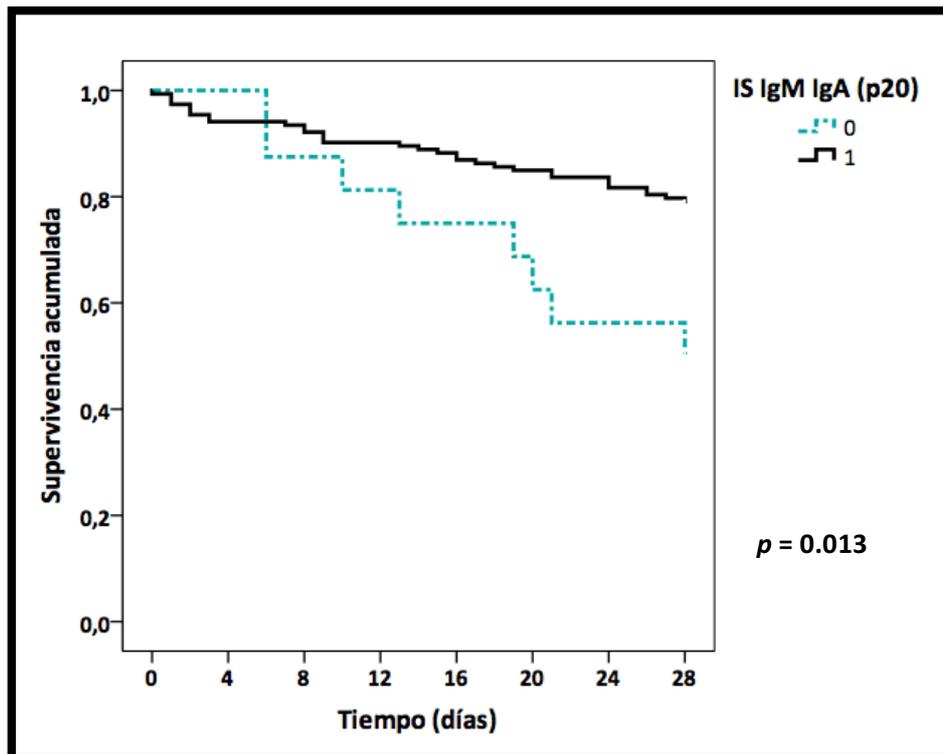


Figura 59: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgG total IgA.



**Figura 60:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el IS IgM IgA.

Los resultados ponen de manifiesto la utilidad de incluir IgG total como parte del score pronóstico en pacientes con SG y SS.

**MODELO DE PREDICCIÓN DE MORTALIDAD MEDIANTE RLB PARA IS QUE CONTIENEN IGG TOTAL:***Análisis univariante:*

En el análisis univariante, se observó una asociación directa entre niveles bajos de inmunoglobulinas y el riesgo de mortalidad en todos los IS, salvo en el formado por IgG total e IgM. Sin embargo, se observó una clara tendencia a la significación estadística ( $p= 0.074$ ). Probablemente, esta falta de significación estuvo asociada a que la mayor influencia está ejercida por IgG1 que forma el 66% de la IgG total, por lo que los valores del resto de subclases de inmunoglobulina G distorsionan los resultados de la IgG total.

El riesgo de mortalidad en pacientes con SG y SS en el momento del ingreso en UCI es hasta cinco veces superior en los pacientes con niveles bajos de dos o más isotipos de inmunoglobulinas.

MODELO	OR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IS (IgG total IgM IgA) = 0	5,17	1,38	19,31	<b>0,015</b>
IS (IgG total IgM) = 0	2,83	0,90	9,04	0,074
IS (IgG total IgA) = 0	4,68	1,62	13,49	<b>0,004</b>
IS (IgM IgA) = 0	4,68	1,52	14,40	<b>0,007</b>

**Tabla 60:** Análisis univariante mediante RLB. OR: Odds Ratio.

*Análisis multivariante:*

Para el análisis multivariante se incluyeron las variables de ajuste utilizadas para el resto de análisis: edad, sexo, “score” APACHE-II, estado previo de inmunosupresión y enfermedad respiratoria crónica.

Los resultados expresan la asociación sinérgica de niveles bajos de inmunoglobulinas y el riesgo de mortalidad en UCI, con un OR de hasta siete veces superior en los IS: IS (IgG total IgM IgA) e IS (IgG total IgA).

MODELO	OR	IC 95%		P
		INFERIOR	SUPERIOR	
IS (IgG total IgM IgA) = 0	6,72	1,24	36,40	<b>0,027</b>
IS (IgG total IgM) = 0	3,05	0,71	13,14	0,134
IS (IgG total IgA) = 0	7,00	1,67	29,32	<b>0,008</b>
IS (IgM IgA) = 0	4,06	0,98	16,96	0,054

**Tabla 61:** Análisis multivariante mediante RLB. OR: Odds Ratio.





## **VIII- *Discusión***

---



## DISCUSIÓN

---

La infección grave es una de las áreas que despierta mayor interés sobre todo en la medicina de cuidados críticos y de urgencias. La necesidad de una rápida respuesta, de un equipo multidisciplinar coordinado y de un laboratorio accesible las 24 horas sitúan a la infección grave como uno de los principales problemas tanto a nivel comunitario como hospitalario. A pesar del rápido avance de la medicina moderna en nuevos métodos diagnósticos y en tratamientos pioneros e innovadores, aún existe mucha frustración y enormes limitaciones en el manejo de la patología infecciosa grave que ostenta cifras de morbilidad y mortalidad elevadas.

Esta tesis doctoral ha querido hacer hincapié en las necesidades actuales de disponer de nuevas herramientas que permitan un mejor manejo del paciente con infección grave. Este trabajo corrobora lo ya conocido acerca de la gravedad y la elevada mortalidad de patologías como la neumonía asociada a ventilación o la sepsis grave y el shock séptico. Por ello, se ha querido profundizar en la investigación de nuevos parámetros que mejoren el diagnóstico, pronóstico y en definitiva, el manejo de la complejidad asociada a estos pacientes. Los datos revelan parámetros prometedores, fáciles de medir y relativamente económicos como pueden ser el seguimiento de la concentración de eosinófilos en la NAV, o la determinación inmunoenzimática de los niveles de inmunoglobulinas plasmáticas en pacientes sépticos.

Existe poca información sobre el estado de inmunocompromiso real de estos pacientes, y la valoración de nuevos parámetros inmunológicos supone un desafío para futuros métodos diagnósticos. Los principales hallazgos descritos en esta tesis doctoral aportan conocimiento de relevancia clínica como el papel protector de los eosinófilos y la influencia de las inmunoglobulinas en el riesgo de mortalidad en pacientes con infección grave.

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN GRAVE****CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS**

Los datos relativos a las características demográficas para ambas cohortes analizadas son comparables a otros estudios publicados. La infección grave afecta a pacientes mayores con múltiples comorbilidades. En nuestras cohortes, la mediana de edad superaba los 60 años, siendo aún más añosos los pacientes que fallecían, con una mediana de 74 años en los pacientes con SG o SS. En relación al sexo, ambos estudios estuvieron formados mayoritariamente por hombres. La mayoría de los trabajos publicados recalcan la importancia de los cambios sociodemográficos que está sufriendo la población actual. Una esperanza de vida aumentada que lleva consigo pacientes más complejos difíciles de manejar (167).

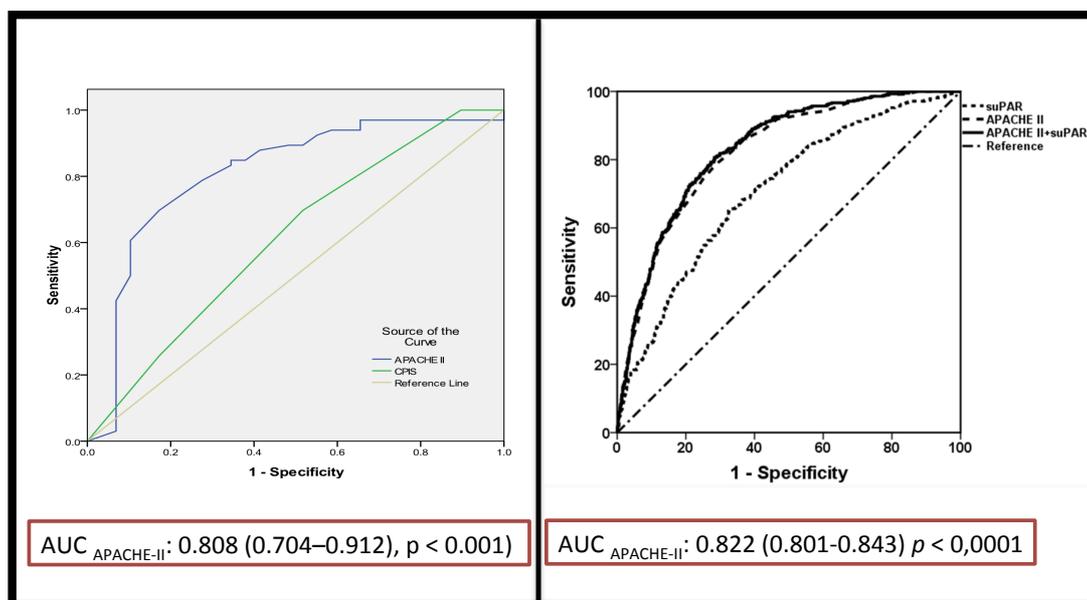
**FACTORES DE RIESGO Y MORTALIDAD**

La afectación de pacientes ancianos en la infección grave va a acompañada de múltiples comorbilidades, muchas de las cuales aumentan el riesgo de mortalidad en estos pacientes y de las que es necesario conocer su impacto.

La mortalidad global en los pacientes con NAV fue del 40,9%, cifra muy elevada pero compatible con las publicaciones actuales donde la mortalidad se sitúa en torno a un 50% (103)(168). En cambio, en la cohorte de pacientes sépticos la mortalidad fue del 24,4%, una cifra prometedora e impensable hace unos años donde las cifras de mortalidad en sepsis alcanzaban el 70%. Estas cifras ponen de manifiesto la importancia e impacto de la infección grave en la mortalidad pero también subraya el papel de las buenas prácticas médicas desarrolladas, la evolución en el conocimiento sobre el diagnóstico, tratamiento y control, y el impacto de las campañas para sobrevivir a la sepsis sobre las comunidades científicas y clínico-asistenciales.

El “score” APACHE-II resume de forma estática la gravedad en el momento de ingreso mediante una escala de puntos, y está suficientemente validado en la literatura con una clara asociación con la mortalidad de pacientes con infección grave. En ambas cohortes estudiadas, los datos del “score” APACHE-II mostraron valores elevados asociados a la gravedad del cuadro clínico de los pacientes incluidos en ambos estudios. Los pacientes que desarrollaron NAV tuvieron una mediana de “score” APACHE-II de 17,5, parecida a la mediana de los pacientes con SG o SS ( $\bar{X} = 21$ ). Los resultados de los estudios que conforman esta tesis doctoral mostraron para ambas cohortes valores de “score” APACHE-II para el grupo de fallecidos

superiores a los 22 puntos, lo que representa un factor de riesgo de mortalidad para ambas patologías como se describe en los trabajos de Zhou X. *et al* (169) y Giamarellos-Bourboulis *et al* (170), entre otros (171)(172). El “score” APACHE-II no solo representa una variable asociada a mortalidad sino que es un buen test predictor de supervivencia para pacientes graves con NAV o SS (Figura 61).



**Figura 61:** Curvas AUROC para “score” APACHE-II en NAV y SS. Adaptado de (169) y (170) respectivamente.

La variable “score” APACHE-II se incluyó en los análisis multivariantes de ambos estudios, siendo la única seleccionada como factor de riesgo asociado a mortalidad en los pacientes con NAV.

Otras comorbilidades de interés fueron la hipertensión y la presencia de metástasis en algún momento previo al ingreso en los pacientes con NAV. Por otra parte, en la cohorte de pacientes sépticos, destacaron la enfermedad respiratoria crónica y el estado de inmunosupresión previa. Existen numerosas series que avalan la presencia de estas y otras comorbilidades en pacientes con infección grave (167)(170)(172).

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS**

La incidencia de coinfección bacteriana en neumonías se ha estudiado pero aún no está clara, y las diferentes series clínicas incluyen un amplio rango de prevalencia, desde un 4% en algunos estudios hasta alcanzar valores en torno al 50% en otros (173)(174). La neumonía asociada a ventilación mecánica se clasifica en *temprana* y *tardía* en función del tiempo de instauración ( $\leq$  cinco días, o  $>$  de cinco días, respectivamente). Una de las principales causas de la NAV temprana es la aspiración de secreciones orofaríngeas. La mayoría de nuestros pacientes fueron diagnosticados de NAV temprana y los principales microorganismos coinfectantes fueron *K. pneumoniae* y *H. Influenzae*, los cuales pueden formar parte de la flora normal de la cavidad orofaríngea (175)(176). Ambos resultados podrían explicar la presencia de un porcentaje considerable de coinfecciones a nivel respiratorio (36%).

En los años 90, los datos de confirmación microbiológica de pacientes con sepsis no alcanzaban el 50% (177)(178). Actualmente, y a pesar de los múltiples factores que afectan al aislamiento del agente causal, los datos han mejorado, alcanzándose en algunas series la confirmación en el 70% de los casos (167). En nuestra serie de pacientes con SG y SS, la presencia de microorganismos fue confirmada en el 56,4% de los casos, con una presencia mayoritaria de gram negativos, siendo los focos abdominal, respiratorio y urológico, los orígenes más frecuentes. Nuestros resultados son comparables a los datos publicados en las series más recientes (167)(179)(180).

Desde el punto de vista inmunológico, es importante destacar la liberación de forma persistente de mediadores inflamatorios en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas. Désirée-Boehme J. *et al* analizaron recientemente las características inflamatorias de muestras pulmonares procedentes de pacientes con patología respiratoria crónica, y su peor capacidad para responder a un modelo *in vitro* de infección por *S. pneumoniae* (181). En pacientes con EPOC, Almansa R. *et al* describieron la presencia de un perfil citoquínico específico y diferencial entre pacientes con infección viral y pacientes sin infección, y a su vez distinto respecto de un tercer grupo de controles sanos (182). Esto puede ser una de las posibles respuestas a la significativa influencia del foco respiratorio y la patología respiratoria crónica, como algunas de las características más frecuentes en la cohorte de pacientes con sepsis. Sin embargo, es importante recordar que en los pacientes con NAV, ninguno de los pacientes fallecidos presentaba patología respiratoria crónica como enfermedad de base.

## PAPEL DE LOS EOSINÓFILOS EN LA PATOLOGÍA INFECCIOSA GRAVE

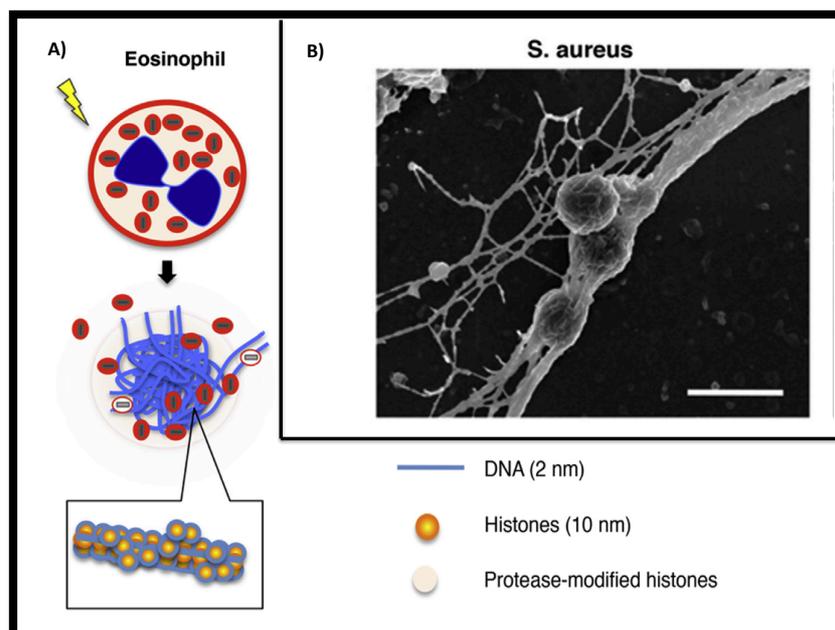
Los estudios de regresión y el análisis de curvas AUROC respaldan el papel de protección que desempeñan los eosinófilos en la neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*. Los eosinófilos son granulocitos que se desarrollan en la médula ósea a partir de progenitores pluripotenciales. La cantidad de eosinófilos circulantes en sangre periférica, tanto en estado basal como en estado patológico, es muy baja. Los valores normales se sitúan entre un 1% y un 3% del total de leucocitos, con valores normales en torno a los 350 células/mm<sup>3</sup>. Son liberados a sangre periférica y son capaces de ser activados y reclutados por los tejidos en respuesta a diferentes estímulos. La producción de esta subpoblación leucocitaria está cuidadosamente regulada por citoquinas, siendo la IL-5 la que desempeña un papel fundamental en el desarrollo, activación, diferenciación y supervivencia de los eosinófilos. Igualmente, otras citoquinas como la IL-3, el GM-CSF (26), y la CCL1 (*Chemoquine ligand 1*) o eotaxina participan y cooperan, junto con la IL-5, en los mecanismos de regulación de los eosinófilos sin las cuales la supervivencia de este subtipo celular es inferior a 48 horas (183)(184). Hasta el momento, se conocía el papel fisiopatológico que desempeñan los eosinófilos en diferentes entidades clínicas como por ejemplo, el asma. Numerosas publicaciones respaldan la implicación de los eosinófilos en esta patología como parte de la respuesta inflamatoria. Los eosinófilos son reclutados y activados a nivel pulmonar participando activamente en el daño tisular y aumentando la producción de moco, con graves consecuencias si persiste el contacto con el alérgeno desencadenante (185). Otras patologías también se caracterizan por la presencia de un elevado número de eosinófilos, entre ellas las enfermedades gastrointestinales como la esofagitis y gastroenteritis eosinofílica, donde se cree que los factores ambientales y genéticos tienen una importante implicación (26).

### ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS EOSINÓFILOS

La acción antimicrobiana de los eosinófilos se ha descrito históricamente sobre todo en infecciones parasitarias. El efecto tóxico se debe a las enzimas contenidas en sus gránulos, fundamentalmente de tipo ECP y MBP. El análisis genético de las secuencias que codifican estas proteínas han puesto de manifiesto la presencia y asociación de ciertos polimorfismos con una mejor o peor evolución en modelos animales de infección parasitaria. Aún así, existe controversia sobre el efecto protector de los eosinófilos en infecciones por parásitos, y se necesitan más estudios para aclarar el papel que desempeñan (186). Los virus como la gripe, el VRS, coronavirus, y otros virus respiratorios humanos, son la principal causa de las exacerbaciones de procesos asmáticos, y se ha demostrado su creciente influencia en procesos

respiratorios graves (neumonía comunitaria y hospitalaria). El papel del eosinófilo en el tejido pulmonar es controvertido. Históricamente, se ha relacionado la presencia de eosinófilos en pulmón como un signo fisiopatológico negativo de la enfermedad (daño tisular, broncoconstricción o disfunción respiratoria), pero varios grupos de investigación están cuestionando esta concepción. Soukup JM. *et al* describieron un papel protector del eosinófilo en la defensa antiviral mediante un modelo celular donde se analizaba la capacidad neutralizante de eosinófilos y monocitos tras su incubación con células epiteliales pulmonares infectadas con VRS (187). Posteriormente, Rosenberg H. *et al* analizaron el aclaramiento viral en un modelo celular en presencia de un cultivo enriquecido de eosinófilos, y postulaban la existencia de mecanismos de defensa inmune frente al virus y no sólo su participación como célula de respuesta inflamatoria (188). A principios de 2015, el grupo de Chang Su Y. *et al* publicaron la existencia de un mecanismo dual de actuación de los eosinófilos, aumentando la inflamación y el daño en el tejido pulmonar a la vez que favorecía el aclaramiento viral (189).

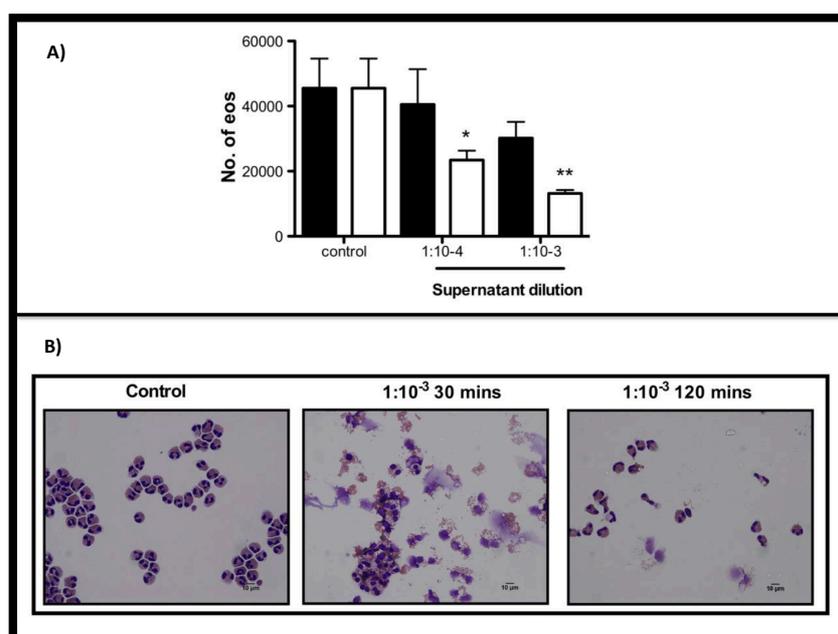
Recientes estudios han confirmado nuevas funciones para este subtipo celular como la de poseer cierta actividad antimicrobiana a través de proteínas presentes en los eosinófilos. Concretamente, la ECP parece tener gran afinidad por el LPS y PG bacteriano (184). Existen estudios que han demostrado la presencia de unas estructuras en forma de catapultas en los eosinófilos que se asemejan a las NETs ("*Neutrophil extracellular traps*") de los neutrófilos. En el caso de los eosinófilos, la acción es parecida. Se trata de estructuras formadas por ADN mitocondrial y proteínas de los gránulos presentes en los eosinófilos, que son liberados al medio extracelular y son capaces de unirse a las bacterias y ejercer una acción bactericida (190). Estas estructuras se conocen con el nombre de "*Eosinophil extracellular traps*" (EETs) y recientemente, Ueki S. *et al* han publicado un estudio donde compararon las NETs y EETs por microscopía a partir de secreciones de pacientes con rinosinusitis, y a su vez realizaron un estudio *in vitro* de infección bacteriana con una cepa de *S. aureus* donde se observó la potente capacidad lítica de estas trampas de ADN, lo que podría explicar el efecto beneficioso del aumento de eosinófilos en relación a la mortalidad de nuestra cohorte de pacientes con NAV por *S. aureus* (Figura 62).



**Figura 62:** EETs: a) Estructura; b) Modelo in vitro de EET atrapando bacterias de *S. aureus*. Adaptado de (191).

Nuestros resultados podrían sostener la existencia de actividad antimicrobiana por parte de los eosinófilos en infecciones graves causadas por *Staphylococcus aureus*.

Prince LR ha demostrado que la  $\alpha$ -hemolisina de *S. aureus* induce la muerte celular de los eosinófilos (192), lo que podría representar un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Figura 63).



**Figura 63:** Muerte celular de eosinófilos inducida por cepa de *S. aureus* productora de  $\alpha$ -hemolisina. Adaptado de (192).

En la cohorte de pacientes evaluada, el hecho de no expandir la población de eosinófilos desde el ingreso en UCI hasta el diagnóstico de NAV, se traducían en un peor desenlace.

#### **PAPEL DE LOS EOSINÓFILOS COMO BIOMARCADOR EN INFECCIONES GRAVES**

La eosinopenia ya se ha relacionado desde hace años con procesos infecciosos. Simon B.E en 1922 describe la eosinopenia y neutrofilia, como marcadores de respuesta a infecciones microbianas a los que él denomina *factores sépticos*. Es más, él sugiere y propone la idea de que el aumento en sangre periférica del número de eosinófilos es signo de recuperación (193). En 1929, Schiling V. reafirma los bajos niveles de eosinófilos en infecciones bacterianas (194), y esta idea no se vuelve a retomar hasta que Morgan JE *et al* en 1971, y posteriormente, Bass DA. en 1975, publicaron sus experimentos en modelos animales sobre la eosinopenia inducida por la infección bacteriana aguda (reducción del 80% de eosinófilos circulantes en las primeras horas post infección y recuperación en las 12 horas siguientes tras la administración de un correcto tratamiento antibiótico), recalcando el papel del eosinófilo durante la inflamación y la respuesta frente a la infección grave (195)(196).

Es importante destacar que los pacientes incluidos en nuestra cohorte de estudio presentaban cifras de eosinófilos muy bajas, tanto en el momento del ingreso como en el diagnóstico de NAV, a pesar del significativo aumento en los pacientes que sobrevivieron.

Existe cada vez más evidencia que confirma el papel protector de los eosinófilos en pacientes con infección grave.

Gill *et al.* en un estudio multicéntrico prospectivo estudiaron 138 pacientes de los cuales 83 tuvieron infección bacteriana. Estos autores encontraron que la combinación de leucocitosis ( $\geq 10.000/\text{mm}^3$ ) y una concentración de eosinófilos por debajo de 40 células/ $\text{mm}^3$ , tenían un valor predictivo negativo para infección bacteriana del 100% (164).

López de Toro I. *et al* evaluaron la eosinopenia en combinación con el número de monocitos como marcador de infección precoz en 244 pacientes graves que ingresan en UCI (75% requirieron ventilación mecánica y el "score" APACHE-II medio se situó en 18 puntos). Este estudio pone de manifiesto la baja concentración de eosinófilos en los pacientes infectados (25 células/ $\mu\text{l}$ ) en el momento del ingreso, comparables a los datos obtenidos en nuestra cohorte, y compatibles con niveles de eosinófilos por debajo del punto de corte de referencia (40-500 células/ $\mu\text{l}$ ) (197)(198).

La eosinopenia se ha descrito por Holland M. *et al* como marcador de mortalidad y aumento de estancia hospitalaria en pacientes con exacerbaciones respiratorias por EPOC (199). Estos resultados han sido confirmados por Rahimi-Rad MH. *et al* en otra cohorte con 100 pacientes donde la mortalidad en pacientes eosinopénicos era significativamente mayor que en los pacientes con niveles normales (200).

Abidi K. *et al* demostraron a través de una curva ROC el valor de la eosinopenia como marcador de sepsis en el ingreso en UCI, permitiendo distinguir entre aquellos pacientes infectados y no infectados (AUROC 0.89 [IC 95%: 0.83–0.94]) (201). Recientemente, estos autores han descrito la eosinopenia como un marcador de aumento de mortalidad en 200 pacientes críticos donde los niveles de eosinófilos por debajo de 40 células/mm<sup>3</sup> era factor independiente asociado a mortalidad (HR [IC95%], *p*): 1,85 [1,01-3,42], 0,046 (202).

Ho K.M. *et al* compararon la PCR y la eosinopenia como predictores de infección sistémica en una cohorte pequeña de 22 pacientes, y encontraron que la eosinopenia representaba un buen marcador pronóstico (AUROC 0.85 [IC 95%: 0.73–0.96]). Sin embargo, no aguantó el análisis multivariante siendo la PCR la única variable que presentó significación estadística (203). Shaaban H. *et al* realizaron un estudio comparativo entre la eosinopenia, la PCR y la PCT como marcadores de sepsis al ingreso en UCI donde se encontró una sensibilidad comparable entre los mismos, y donde se sugiere la utilización de la concentración de eosinófilos como herramienta de ayuda en el diagnóstico de sepsis (204). Por su parte, Garnacho-Montero *et al*, en una cohorte de 160 pacientes críticos con SIRS, SG y SS, comparó la PCT, el número de eosinófilos y el ADN libre circulante, y aunque no encontró diferencias significativas en el número de eosinófilos que distinguiera infección de no infección, aquellos pacientes infectados presentaban cifras de eosinófilos inferiores (205).

Merino C. *et al* mostraron que pacientes sépticos que fallecían tenían una menor concentración de eosinófilos que aquellos que sobrevivían (206).

La eosinopenia ha mostrado utilidad no solo como indicador pronóstico y factor de riesgo en mortalidad de pacientes con infección grave. Yip C.B *et al* realizaron un estudio retrospectivo en 1446 pacientes que habían sobrevivido a un ingreso en UCI, y valoraron la eosinopenia como marcador de reingreso y mortalidad. El análisis multivariante ajustado por edad, sexo, SOFA, “score” APACHE-II y otras comorbilidades de interés mostró que la eosinopenia estaba directamente asociada con el reingreso (OR [IC95%], *p*): 2,50 [1,38-4,50], 0,002 y la mortalidad (HR [IC95%], *p*): 2,65 [1,77-3,98], 0,001 en UCI (207).

Shivani A. *et al* clasificaron en función del número de eosinófilos en el ingreso a 437 pacientes de una UCI quirúrgica, y observaron como el grupo con una concentración por debajo de 40 células/mm<sup>3</sup> presentó la mayor mortalidad (208).

Terradas R. *et al* han observado que una eosinopenia mantenida junto a un elevado ratio neutrófilo/linfocito eran marcadores independientes de mortalidad en pacientes con bacteriemia (209). Basándonos en estos resultados, en nuestro trabajo evaluamos el ratio neutrófilo/linfocito (ratio N/L) en supervivientes y fallecidos. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el ratio de ambos grupos pero parece que los no supervivientes presentaron una tendencia, ya que poseían un ratio N/L mayor (Tabla 22).

Las publicaciones científicas en pacientes con infección grave avalan por tanto, la importancia de la monitorización de los niveles de eosinófilos en diferentes momentos de la enfermedad, sobre todo al ingreso donde parecen desempeñar un importante papel pronóstico.

## ESTUDIO DE INMUNOGLOBULINAS EN SEPSIS GRAVE Y SHOCK SÉPTICO

La influencia de las inmunoglobulinas endógenas en la sepsis aún no está clara.

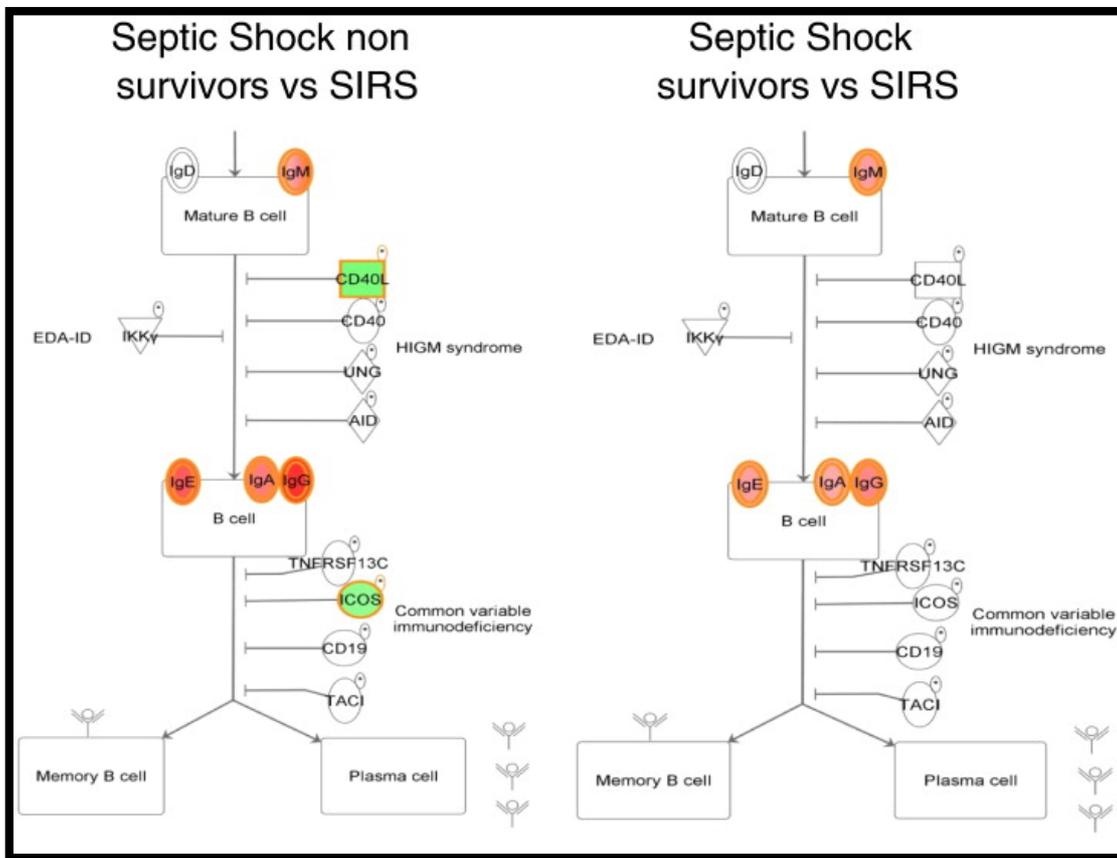
Existen numerosos mecanismos que podrían explicar el papel beneficioso de las inmunoglobulinas en sepsis. Las inmunoglobulinas, participan en el reconocimiento y aclaramiento microbiano, neutralización de toxinas, son inhibidoras de la transcripción de genes relacionados con el proceso inflamatorio, y ejercen funciones reguladoras y anti-apoptóticas sobre células inmunológicas (210).

Es importante tener en cuenta el papel que desempeña cada inmunoglobulina y cuantificar los niveles de cada una de ellas debido a su distinta participación e influencia en el proceso séptico. De esta forma, las IgG1, IgG2 e IgG3 son necesarias para la bacteriolisis mediada por el complemento y la opsonización bacteriana. La IgG3 es esencial en la neutralización vírica, y la IgG4 es necesaria para la inactivación de toxinas. La IgM es fundamental en la respuesta inmune primaria y la IgA en la defensa a nivel de mucosas.

Existen múltiples causas que podrían explicar niveles bajos de inmunoglobulinas en pacientes con SG o SS. Algunas de ellas son la posible hemodilución de la muestra por el reemplazo de líquidos que se realiza durante el manejo de un paciente con SG, un defecto en la producción de algún isotipo o subclase de inmunoglobulina (inmunodeficiencia primaria, genética, o secundaria a otras patologías), el secuestro de inmunoglobulinas en tejidos inflamados, el excesivo consumo generado para la neutralización de exotoxinas y endotoxinas para el aclaramiento bacteriano, la inmunosupresión generada por el estado crítico del paciente o por el propio proceso séptico, entre otros factores (113)(211)(212)(213)(214)(215).

Una de las posibles respuestas a los bajos niveles encontrados en los pacientes con SG o SS es el fallo en la producción de inmunoglobulinas. En este sentido apunta el trabajo de Almansa R. *et al*, donde detectan varios genes sobrexpresados implicados en la ruta de producción de las regiones tanto pesadas como variables de inmunoglobulinas en pacientes con SS que sobreviven y pacientes que fallecen. En cambio, encuentran dos genes (CD40L e ICOS) que se encuentran reprimidos solo en el grupo de pacientes que fallecen. Estos genes tienen una importante implicación en el cambio de isotipo (o “*switching*”), y en la activación de células B y T entre otros. Estos resultados complementan a los publicados por Mohr A. *et al*, el cual describe una disminución en la producción de anticuerpos en un modelo animal con SS (216).

De estos resultados puede deducirse la existencia de un intento del sistema inmune de producir inmunoglobulinas, pero también su incapacidad por el defecto de expresión de estos genes (Figura 64) (217).



**Figura 64:** IPA (“Ingenuity pathways analysis”): Vía de señalización para la producción de inmunoglobulinas (rojo, sobrepresado; verde, reprimido). Adaptado de (217).

Independientemente de la razón que explica la existencia de bajos niveles de inmunoglobulinas en algunos pacientes con sepsis, son necesarios más estudios clínicos que aclaren el papel de las inmunoglobulinas en esta enfermedad. Desafortunadamente, los estudios que han evaluado los niveles de inmunoglobulinas en sepsis están basados en pequeñas cohortes de pacientes (218)(219)(220). Esta tesis doctoral recoge los resultados del mayor estudio realizado hasta el momento (n= 172) donde se evalúe la asociación entre los niveles de los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas endógenas, y el pronóstico en pacientes con SG y SS.

## INMUNOGLOBULINAS Y MORTALIDAD EN SEPSIS

Nuestro estudio es el primero en demostrar un efecto sinérgico entre la presencia de niveles bajos de forma simultánea de varios isotipos de inmunoglobulinas con el pronóstico en pacientes diagnosticados de SG o SS. La creación y evaluación de los IS ha puesto de manifiesto la importancia de considerar los niveles de inmunoglobulinas en esta patología. Nuestros resultados revelan que IS bajos se traducían en un acortamiento del tiempo medio de supervivencia y un mayor riesgo de mortalidad. Los puntos de corte que se identificaron para cada inmunoglobulina podrían tener una gran utilidad en la práctica clínica diaria.

Nuestro trabajo describe por primera vez diferencias en los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas y su papel de protección en la sepsis. El análisis multivariante reveló que la inmunoglobulina más influyente en el pronóstico de pacientes con SG o SS fue la IgG1. Además, los IS que contenían IgG1 mostraron un mayor impacto en la mortalidad (mayor OR y HR). Esto puede ser de alguna manera esperado ya que la IgG1 es la que se encuentra en mayor concentración plasmática (66%), seguida de la IgG2 (24%), IgG3 (7%), y por último, de la IgG4 representando únicamente un 3% (211)(221). En consecuencia, la disminución de niveles de IgG1 normalmente resulta en valores compatibles con hipogammaglobulinemia (222).

Nuestros resultados se asemejan a otros publicados en dos estudios previos de nuestro grupo. En el primero de ellos, Andaluz-Ojeda D. *et al* observaron niveles inferiores de IgG en el ingreso en UCI en pacientes que fallecían con SG y SS (223). En el segundo, Tamayo E. *et al* encontraron un papel protector de la IgG1, IgM e IgA en la mortalidad de una pequeña cohorte de pacientes con SS post quirúrgico (n= 42) (220).

Otros autores también han evaluado niveles de inmunoglobulinas en sepsis. Taccone FS. *et al* observaron que pacientes con SS y niveles bajos de IgG, requerían de un mayor tratamiento con vasopresores, eran más susceptibles de desarrollar SDRA y tenían más mortalidad (219). Por el contrario, Venet F. *et al* publicaron datos sobre una notable reducción de los niveles plasmáticos de IgG en 62 pacientes con SS pero sin asociación significativa con mortalidad. No obstante, estos autores no realizaron análisis de regresión para evaluar la influencia de los niveles de inmunoglobulinas en el pronóstico (218), al igual que Myrianthefts P. *et al* que evidenciaron la presencia de niveles bajos de IgG en pacientes que fallecían con SS, pero sin asociación significativa con mortalidad (224). Prucha M. *et al* evaluaron en un estudio retrospectivo la presencia de hipogammaglobulinemia IgG en 708 pacientes con SIRS, SG y SS. Los resultados mostraron que la mortalidad de pacientes que presentaban hipogammaglobulinemia IgG era significativamente superior a la evidenciada en pacientes con

niveles normales (41,2% vs 32,8%,  $p=0,001$ ), (OR [IC95%],  $p$ ): 2,0 [1,3-3,2], 0,002 (225). Giamarellos-Bourboulis *et al* han descrito recientemente niveles bajos de IgM en pacientes con SIRS y SG. Este grupo observó que la distribución de niveles de IgM a lo largo del tiempo de seguimiento era mayor en los pacientes que sobrevivían (226). Por último, un reciente meta-análisis sobre los niveles endógenos de IgG publicado por Shankar-Hari M. *et al* concluye remarcando la necesidad de establecer puntos de corte y una ventana terapéutica que definan claramente la asociación de los niveles de inmunoglobulinas con la mortalidad, así como el beneficio del tratamiento con terapias sustitutivas con inmunoglobulinas intravenosas (227).

En nuestra cohorte, reanalizamos los datos mediante una estrategia analítica diferente, creando IS a partir de cortes transversales en los niveles de inmunoglobulinas por percentiles. Nuestros resultados validan la influencia de niveles bajos de dos o más inmunoglobulinas en el riesgo de mortalidad de pacientes con SG y SS. Los datos mostraron como los IS formados tanto por IgG1 como por IgG total eran estadísticamente significativos. De hecho, en algunos casos el OR superaba los siete puntos, lo que supone un importante impacto en la mortalidad. Es importante dejar clara la influencia de niveles bajos de varias inmunoglobulinas independientemente de los valores de las inmunoglobulinas aisladas.

Ninguno de los estudios publicados en la literatura ha analizado el impacto de niveles bajos para varios isotipos de inmunoglobulinas simultáneamente como hicimos nosotros en nuestro trabajo.

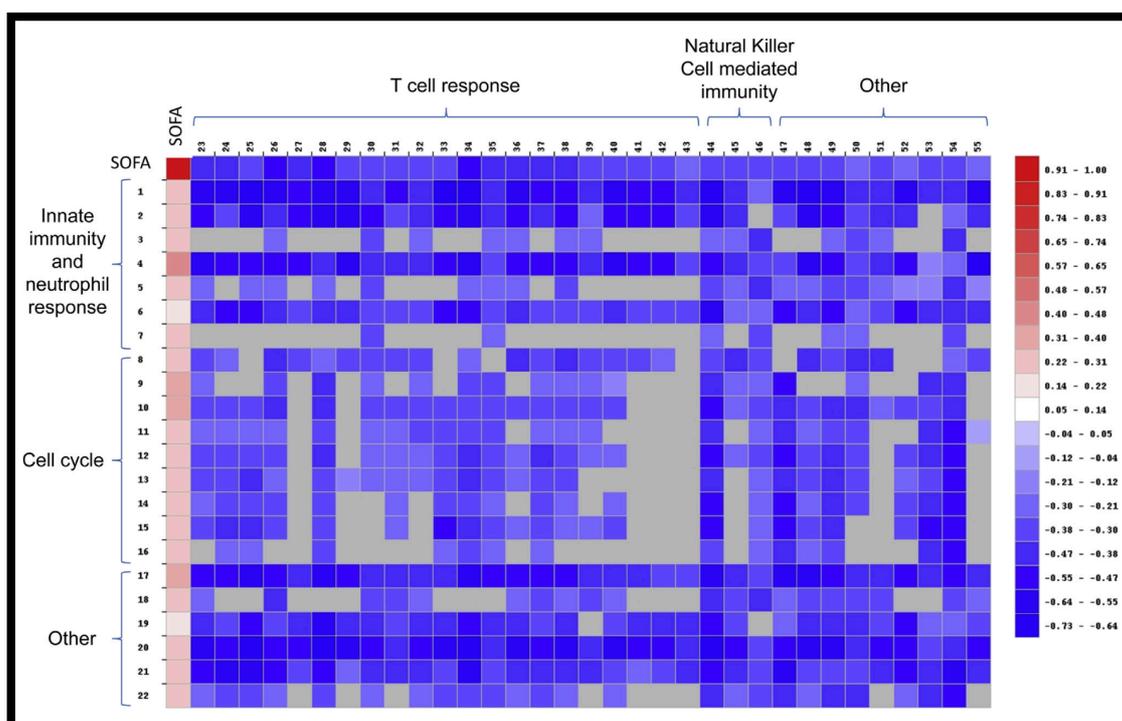
## **INMUNOSUPRESIÓN Y SEPSIS**

El concepto de inmunosupresión es definido de forma diferente en función del estudio consultado, lo que hace difícil su evaluación e impacto en sepsis. A pesar de la variabilidad del concepto, está claro que la presencia de un estado previo de inmunosupresión es un factor de riesgo para padecer SG (113)(179). El manejo general de la sepsis en pacientes inmunocomprometidos no dista mucho del realizado en pacientes inmunocompetentes. Aún así, existen aspectos importantes a tener en cuenta en estos pacientes, tales como la orientación inicial del tratamiento antibiótico, ya que ante un paciente inmunosuprimido existe un abanico mucho más amplio de microorganismos que pueden ser causantes de la sepsis. Esto se ha estudiado en los últimos años gracias a las nuevas técnicas diagnósticas y la protocolización de los algoritmos diagnósticos para este tipo de paciente tan delicado (228).

En nuestro estudio, la IgM y la IgA fueron las inmunoglobulinas más afectadas por la existencia de inmunosupresión previa. Sin embargo, es interesante el papel de protección que

se encuentra para la IgG1, ya que tanto los niveles de forma aislada como formando parte de los IS, mostraron una clara significación estadística independientemente de la inmunosupresión previa.

A parte de que los pacientes sépticos presentan frecuentemente inmunosupresión previa, es importante destacar que la sepsis se acompaña en sí misma de inmunosupresión. La sepsis está directamente relacionada con un fallo en la inmunidad tanto humoral como celular, lo que representa una ventaja para el patógeno, sirviendo como mecanismo de evasión inmunológica. Almansa R. *et al* detectaron una serie de genes relacionados con el ciclo celular, las proteasas del neutrófilo e interleuquinas (IL-1R and IL-18R) correlacionados directamente con el “score” SOFA y la mortalidad, y otros implicados en la respuesta de células T y NK correlacionados de forma inversa. La respuesta a la infección no se produce ni regula de forma homeostática, dando lugar a fallo multiorgánico y muerte del paciente (Figura 65) (229).



**Figura 65:** “Heat map” representando los coeficientes de correlaciones de Spearman entre genes relacionados con la inmunidad celular y humoral, y la gravedad expresada por el score SOFA. Rojo: Correlación positiva; azul: Correlación negativa ( $p < 0.05$ ). Gris: No significativo.

### TRATAMIENTO CON INMUNOGLOBULINAS EN SEPSIS

Las inmunoglobulinas polivalentes humanas para uso intravenoso (IGIV) son obtenidas y purificadas a partir de una reserva de plasma procedente de 3.000-10.000 donantes. Las IGIV están constituidas en más de un 95% por IgG enteras, con sus propiedades estructurales y funcionales conservadas, sin agregados, libres de agentes infecciosos y distribuidas en subclases de IgG. Los preparados disponibles difieren en el tipo de inmunoglobulina predominante y se clasifican básicamente en dos grandes grupos. Aquellos que contienen IgG (IGIV) y aquellos enriquecidos con IgM y/o IgA (IGMAIV). Estas formulaciones proporcionan un amplio espectro de anticuerpos opsonizantes y neutralizantes frente a numerosos agentes patógenos, en función del ambiente ecológico al que se haya expuesto cada donante.

La administración de IGIV proporciona efectos inmunomoduladores. Así, las inmunoglobulinas son capaces de bloquear de forma competitiva los receptores Fc activadores, inducir la expresión de los receptores Fc inhibidores de membrana, aumentar el catabolismo y neutralizar auto-anticuerpos, captar las proteínas del complemento, interactuar con la red citoquímica, activar o bloquear de forma funcional el receptor Fas, modular las propiedades de las células dendríticas o linfocitos T reguladores CD4+CD25+ y aumentar la sensibilidad a esteroides (230).

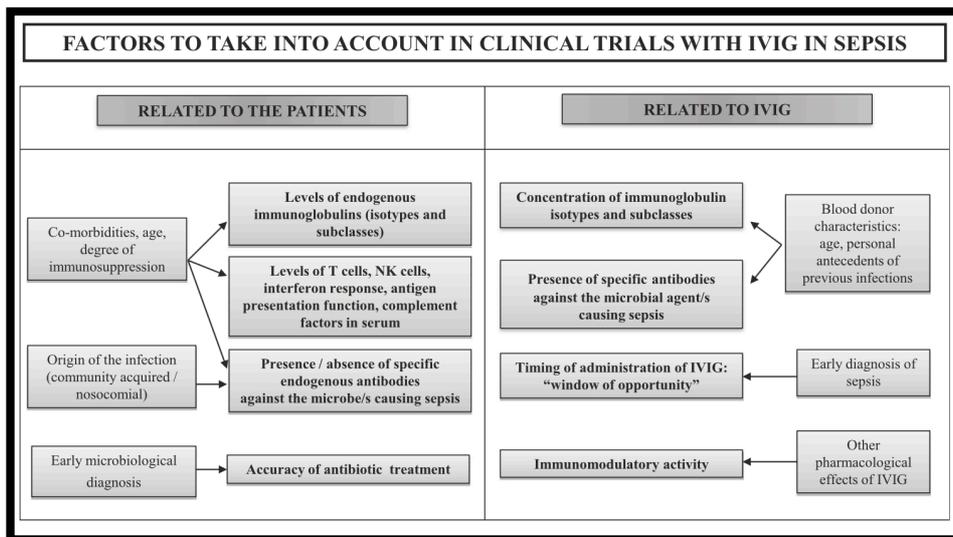
La persistencia de niveles plasmáticos bajos de inmunoglobulinas es un hecho bastante frecuente en SG y SS (223)(219)(218). En los últimos años, debido a la importancia que desempeñan las inmunoglobulinas en sepsis, se ha evaluado en numerosos ensayos clínicos la utilidad del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas como terapia sustitutiva, pero los resultados obtenidos han sido bastante controvertidos. Soares MO. *et al* realizaron un meta-análisis donde se indicó que no está claro el efecto beneficioso del tratamiento con IGIV en pacientes con SG o SS, debido en parte a la gran heterogeneidad tanto en diseño como en los resultados de los estudios publicados, recalando la necesidad de seguir estudiando el papel fisiopatológico que juegan las inmunoglobulinas en una patología tan compleja como la sepsis, para así poder realizar análisis de coste-efectividad del tratamiento con IGIV (231). Aunque los primeros estudios sugieren que el tratamiento con IGIV enriquecidas con IgM y/o IgA ofrece un beneficio superior al tratamiento con la formulación que contiene únicamente IgG (232)(233)(234), actualmente el número de ensayos es insuficiente e incluyen un número limitado de pacientes que impiden llegar a conclusiones robustas sobre el beneficio (235).

Otra limitación viene determinada por la variabilidad interindividual en los niveles de inmunoglobulinas plasmáticas. En un adulto sano, los niveles de inmunoglobulinas pueden variar de forma significativa, por lo que la interpretación de un solo punto de medición en una patología tan compleja como la sepsis puede ser un sesgo. Este hecho supone un reto y debe ser considerado para futuros estudios. La monitorización de los niveles de inmunoglobulinas a lo largo de la enfermedad podría ayudarnos a entender mejor la implicación fisiopatológica de las inmunoglobulinas en la sepsis (210).

La ausencia de la cuantificación previa de los niveles de inmunoglobulinas fue el factor común encontrado en todos los ensayos clínicos consultados. Aumentar nuestros conocimientos sobre el papel que desempeña cada inmunoglobulina de forma individual en el pronóstico de pacientes con SG o SS, podría ayudar a mejorar el diseño de ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con IGIV para esta enfermedad, ya que probablemente el futuro esté orientado hacia una medicina individualizada donde cada paciente reciba una preparación diferente: habrá pacientes que se beneficien de IgG exclusivamente, mientras que otros requieran de preparaciones enriquecidas con IgA y/o IgM (130)(232). Nuestros resultados muestran una influencia diferente de cada isotipo de inmunoglobulina en el pronóstico, y una importante variabilidad de niveles bajos en los pacientes: el 27,9% presento niveles bajos para IgG1, el 39,2% para IgM, el 19,2% para IgA, y el 10,5% presentaron niveles bajos para las tres. Estos resultados establecen la necesidad de estudiar el beneficio del tratamiento con IGIV en los pacientes en función de sus necesidades y no de forma global.

Existen muchos factores condicionantes para la evaluación de la administración de IGIV en sepsis que actualmente no se tienen en cuenta. Estos factores se pueden clasificar en dos grupos: factores relacionados con el paciente, y factores relacionados con la formulación del preparado que contiene las inmunoglobulinas. En relación al paciente, cabe destacar el desconocimiento acerca del verdadero estado inmunológico (inmunosupresión previa vs inmunosupresión inducida por sepsis), la ausencia de niveles previos de inmunoglobulinas, o los títulos de anticuerpos frente a los microorganismos más prevalentes en sepsis. Por otra parte, no se evalúa el efecto inmunomodulador de las IGIV ni la concentración de anticuerpos específicos frente a diferentes microorganismos. El desarrollo de preparados a partir de pacientes que sobreviven a la sepsis podría ser una ventaja terapéutica para el tratamiento que debe explorarse.

Todos estos factores se recogen en la figura 66 propuesta por nuestro grupo en una de sus últimas publicaciones (236).



**Figura 66:** Variables de confusión a tener en cuenta en el diseño de ensayos clínicos para la evaluación del tratamiento con inmunoglobulinas en sepsis. Adaptado de (236).

**MEDICINA PERSONALIZADA EN SEPSIS**

En los últimos 20 años, la investigación en sepsis ha sido extremadamente productiva con más de 20.000 artículos publicados en los últimos diez años. La sepsis es una enfermedad compleja que puede darse en cualquier ámbito sanitario, por un amplio espectro de microorganismos, y desencadena una red de múltiples procesos patológicos interrelacionados e influidos por las características intrínsecas de cada paciente, la genética y el ambiente. Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre la fisiopatología y epidemiología de la sepsis, el tratamiento es un campo importante que no acaba de abordarse con éxito a pesar de los esfuerzos en esta área, que están claramente demostrados por el enorme volumen de publicaciones acerca de nuevas dianas, moléculas y biomarcadores. La rapidez de los métodos de diagnóstico han mejorado la caracterización microbiológica de esta patología al permitir actualmente, identificar y conocer la sensibilidad antibiótica frente a un microorganismo determinado en unas horas, lo que permite la instauración temprana de un correcto tratamiento antibiótico, hecho impensable hace unos años. Además, la actual expansión de los métodos de secuenciación masiva junto con la biotecnología computacional, que permite la integración de información biológica de todas las escalas -ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.), constituyen las herramientas del futuro para un entendimiento y manejo global de esta enfermedad. Por todo esto, parece ser que el futuro de la sepsis es la medicina individualizada. Una medicina donde se estratifique la población en grupos más pequeños pero con una intervención más eficiente (237)(238)(239)(240).

La monitorización de los niveles de inmunoglobulinas y la caracterización del estado inmunológico puede abrir nuevas puertas a los tratamientos individualizados con IGIV.

#### **REINVENCIÓN DEL HEMOGRAMA E INCORPORACIÓN DE NUEVOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN EL SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN GRAVE**

La hipótesis de esta tesis doctoral apoyaba la monitorización de determinados parámetros inmunológicos para mejorar el pronóstico de pacientes con infección grave. Uno de los objetivos era evaluar la utilidad de la información aportada por el hemograma, en concreto el papel de las subpoblaciones leucocitarias en pacientes con NAV por *S. aureus*. Nuestros resultados demuestran un papel protector del eosinófilo en esta patología, siendo sus niveles en el momento del diagnóstico un factor de riesgo de mortalidad.

El uso histórico del hemograma ha servido para la aproximación diagnóstica en múltiples enfermedades infecciosas donde se ven alteradas las principales líneas celulares como los eritrocitos, leucocitos o plaquetas (241)(242).

El hemograma es una prueba de rutina ofertada por los laboratorios de todos los hospitales, realizada de forma sistemática y rápida en sistemas automatizados. Se trata de una prueba solicitada de forma rutinaria a todos los pacientes, a veces incluso más de una vez por día en los pacientes más graves, ya que nos ofrece una información muy valiosa para valorar la evolución clínica. El leucograma es una de las partes del hemograma donde se recoge la distribución de los leucocitos en forma de porcentajes. En este trabajo, se hace una lectura diferente ya que se calculan y valoran los niveles absolutos de las subpoblaciones leucocitarias. Deben destacarse las ventajas que proporciona esta cuantificación ya sea en términos económicos (coste *cero* por no necesitar la incorporación de nuevos equipos) o en términos de sencillez y rapidez, al ser una técnica ya conocida y extensamente implementada.

Debemos ser conscientes de que actualmente, a pesar de los numerosos ensayos clínicos donde se evalúan nuevos y novedosos biomarcadores, aún no se ha conseguido el parámetro perfecto que permita diagnosticar o pronosticar la infección grave. Por ello, la reinterpretación del hemograma en la NAV nos permite incorporar de forma sencilla un nuevo criterio de utilidad en el pronóstico de estos pacientes.

Otros autores ya han evaluado las subpoblaciones leucocitarias como marcador pronóstico en infección grave.

Nuestro grupo ha establecido, en dos cohortes de pacientes diferentes con SS, un punto de corte para el número de neutrófilos circulantes en el momento del diagnóstico, con utilidad clínica como factor pronóstico (165). Nierhaus A. *et al* observaron que la determinación en sangre periférica de formas granulocíticas inmaduras permite diferenciar pacientes con SIRS o sepsis (243). Andaluz-Ojeda D. *et al* observaron que niveles aumentados de células NK se asociaban con una mayor mortalidad en pacientes con SS (223). Wyllie DH. *et al* describieron el riesgo de bacteriemia en pacientes linfopénicos (244), y Belgin-Akilli N. *et al* calcularon el ratio N/L en pacientes críticos atendidos en urgencias observando que ratios elevados se relacionaban con una mayor mortalidad (245).

#### **INMUNOGLOBULINAS EN LA RUTINA ANALÍTICA**

Los niveles de inmunoglobulinas se realizan de forma rutinaria en los laboratorios para el diagnóstico de múltiples enfermedades inmunológicas. Nuestros resultados confirman la presencia de un elevado número de pacientes con SG o SS con niveles bajos para una o varias inmunoglobulinas. Por tanto, sería interesante la incorporación de la monitorización de los niveles de inmunoglobulinas en estos pacientes con objeto de complementar a evaluación del estado de gravedad y servir como futura herramienta terapéutica. En términos económicos, supondría un aumento de reactivos y personal a nivel de laboratorio por el aumento de la demanda. Sin embargo, si ayuda a mejorar el manejo clínico de cuadros tan graves como la sepsis, el impacto de ahorro económico sería altamente significativo. La metodología analítica para su cuantificación es variable. Aunque en esta tesis doctoral se ha utilizado la tecnología Luminex para su determinación, ya que nos ofrece la capacidad de determinar simultáneamente varios analitos con límites de detección muy bajos, lo que nos ha permitido estratificar de forma clara nuestra cohorte de pacientes, existen otras técnicas comerciales que proporcionan resultados superponibles, como la nefelometría cinética.

Nuevas tecnologías como la PCR digital, que ofrece una mayor precisión y reproducibilidad, parecen prometedoras en el campo diagnóstico y pronóstico de infección grave. Recientemente, nuestro grupo ha publicado el valor de la PCR digital en la cuantificación de transcritos de IgM consecuencia de la respuesta primaria a la infección en pacientes con sepsis, SIRS y controles sanos. Su uso parece prometedor como herramienta para la detección temprana de sepsis (246).

## MONITORIZACIÓN INMUNOLÓGICA EN LA INFECCIÓN GRAVE

Esta tesis doctoral ha pretendido generar y justificar la necesidad de incluir el sistema inmunitario como un órgano de vital relevancia en la respuesta ante procesos infecciosos graves, y su utilidad para el diagnóstico y pronóstico en estos pacientes.

Una de las limitaciones de nuestro estudio de NAV fue que solo se recogieron dos muestras de sangre periférica (en el momento de ingreso en UCI y en el momento del diagnóstico de NAV). En futuros estudios, sería interesante evaluar la concentración de eosinófilos en otros momentos a lo largo del curso de la enfermedad, así como su influencia en el curso clínico de NAVs por otros microorganismos de notable repercusión, como las enterobacterias o los no fermentadores. Igualmente, la limitación asociada a la naturaleza retrospectiva del análisis hace necesaria su validación en una cohorte prospectiva mejorando la calidad de la recogida de datos. La literatura deja clara la participación del eosinófilo en otras patologías graves como es la sepsis, aunque aún está por clarificar cuál es el verdadero papel que desempeña este subtipo celular, por lo que sería interesante monitorizar sus niveles en varios puntos de la enfermedad, incluso en momentos previos a la posible infección, y así evaluar su utilidad como biomarcador diagnóstico y/o pronóstico en diferentes grupos de pacientes con infección grave.

La mortalidad en sepsis hace unos años alcanzaba cifras del 70%, y actualmente se ha conseguido reducir hasta un 30%. Ahora es el momento de emplear nuestros esfuerzos en evitar que los pacientes se infecten y desarrollen sepsis para lo cual necesitamos conocer perfectamente los factores predisponentes a esta enfermedad, entre los que se encuentra el estado inmunológico. Uno de los grandes retos de nuestro equipo investigador es el análisis en profundidad del estado inmunológico en las fases previas a la sepsis, de tal manera que nos permita seleccionar los pacientes con más riesgo de infectarse. Para ello, no solo es necesario el conocimiento del sistema inmune cuando la sepsis ya está instaurada, sino que el conocimiento de la historia inmunológica previa de los pacientes podría servir como mecanismo de prevención de sepsis.

Ya existen algunas publicaciones que intentan prevenir la infección grave en pacientes con múltiples factores de riesgo, como el trabajo de Illerhaus G. *et al* que administra factores estimulantes de crecimiento granulocítico en pacientes neutropénicos (247), Parrino J. *et al* donde consideran que la administración de inhibidores de la apoptosis de linfocitos puede prevenir la destrucción masiva que se produce en cuadros de infección sistémica (248), o el

trabajo de Al-Gwaiz L. *et al* donde evalúan las diferencias morfológicas de los neutrófilos relacionadas con la infección bacteriana aguda (249).

Otros autores como Huang W. *et al* optan por la vía de inmunización frente a determinados patógenos altamente prevalentes en infección grave. En este modelo animal de sepsis y neumonía por *Acinetobacter baumannii*, la inmunización previa con proteínas de membrana de una cepa pan-resistente minimizaba significativamente las consecuencias clínicas del proceso (250).

En definitiva, nuestros resultados respaldan la reinterpretación del hemograma como herramienta pronóstica en la NAV por *S. aureus*. Además, proponemos la incorporación de nuevos parámetros inmunológicos como son la cuantificación de los niveles de inmunoglobulinas en sepsis para un mejor manejo del paciente con infección grave.





## ***IX- Conclusiones***

---



## CONCLUSIONES

---

1. La concentración de eosinófilos en sangre periférica y el incremento de eosinófilos se relacionan inversamente con la probabilidad de morir por neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.
2. Los pacientes con una concentración de eosinófilos por debajo de 30 células/mm<sup>3</sup>, fallecen antes en la neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.
3. Este trabajo revela por primera vez un papel protector de los eosinófilos, y apoya su uso clínico como biomarcador en el pronóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.
4. Los niveles de los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas presentan diferente influencia en el pronóstico de pacientes diagnosticados con sepsis grave o shock séptico en el ingreso en UCI.
5. Los pacientes diagnosticados de sepsis grave o shock séptico en el momento del ingreso en UCI, con niveles bajos de IgG1, IgM, o IgA, fallecen más rápidamente que aquellos con niveles por encima de los puntos de corte descritos en esta tesis doctoral.
6. Los niveles bajos de dos o más inmunoglobulinas ejercen un efecto sinérgico acortando el tiempo medio de supervivencia, y aumentan el riesgo de mortalidad en pacientes diagnosticados de sepsis grave o shock séptico en el momento del ingreso en UCI.
7. La IgG1 es la inmunoglobulina que más influye en la supervivencia de pacientes con sepsis grave o shock séptico en el momento del ingreso en UCI, estando asociada a mayor riesgo de mortalidad independientemente de la edad del individuo, el estado de gravedad en el momento del ingreso, o la presencia de antecedentes de inmunosupresión o enfermedad respiratoria crónica.
8. Los Inmunoscores creados en esta tesis doctoral ponen de manifiesto su utilidad para evaluar el pronóstico en pacientes con sepsis grave y shock séptico.

9. La diferente influencia de los distintos isotipos y subclases de inmunoglobulinas plasmáticas en el pronóstico de la sepsis grave y shock séptico, puede servir en la práctica clínica para orientar el tratamiento individualizado con inmunoglobulinas intravenosas, así como guiar el diseño de ensayos clínicos que evalúan su utilidad en estos pacientes.
  
10. La monitorización del sistema inmunológico en pacientes diagnosticados de infección grave es útil para predecir el pronóstico y evolución tanto de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica como de pacientes con sepsis grave o shock séptico.





***X- Rendimiento científico***

---



## RENDIMIENTO CIENTÍFICO

### Artículos internacionales

#### **EOSINOPHIL AS A PROTECTIVE CELL IN *S. AUREUS* VENTILATOR ASSOCIATED PNEUMONIA.**

Ana Rodriguez-Fernandez, David Andaluz-Ojeda, Raquel Almansa, Mar Justel, Jose María Eiros, Raúl Ortiz de Lejarazu.

- Revista: Mediators of Inflammation, 2013; 2013:152943. Epub: 2013 Sep 3
- Cuartil: 2
- Especialidad: Inmunología. Biología celular.
- Índice de Impacto (JRC 2012): 3,88.

#### **IGG1, IGM AND IGA: A SYNERGIC TEAM INFLUENCING SURVIVAL IN SEPSIS.**

Jesús F Bermejo-Martín\*, Ana Rodriguez-Fernandez\*, Rubén Herrán-Monge, David Andaluz-Ojeda, Arturo Muriel-Bombín, Pedro Merino, Marta María García-García, Rafael Citores, Francisco Gandía, Raquel Almansa, Jesús Blanco for the GRECIA group (Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos) †.

\*Misma contribución.

- Revista: Journal of Internal Medicine, 2014 May 11, doi: 10,1111.
- Cuartil: 1
- Especialidad: Medicina Interna.
- Índice de Impacto (JRC 2012): 6,45.

## Congresos nacionales

---

### **XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.**

**TÍTULO: RELACIÓN ENTRE EL BALANCE NEUTRÓFILO/MONOCITO Y LA INFECCIÓN POR SARM O SAMS ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA**

A. Rodriguez Fernandez, D. Andaluz Ojeda, I.C. Lopez Mestanza, L. Goncalves De Freitas, G.A. March Rosello, M. Justel Alvarez, A. Avila Alonso, E. Coletta Griborio, J.M. Eiros Bouza, R. Ortiz De Lejarazu Leonardo, J.F. Bermejo Martin.

Lugar y fechas: Zaragoza 29-31 de Mayo de 2013.

## Congresos internacionales

---

### **XXVI EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ECCMID)**

**TÍTULO: A NEW IMMUNOSCORE BASED ON IMMUNOGLOBULINS LEVELS INFLUENCING MORTALITY RISK IN SEPSIS**

A. Rodriguez-Fernandez, Jesús F. Bermejo-Martin, R. Herran-Monge, A. Muriel-Bombin, P. Merino, R. Ortiz De Lejarazu, J. Blanco.

Aceptado: Abstract Reference No: 2848.

Lugar y fecha: Ámsterdam, 9-12 de Abril de 2016.

## Premios

---

### **PREMIO LABCO 2013 OTORGADO POR LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA DE CASTILLA Y LEÓN.**

TÍTULO: Valor del hemograma en el seguimiento clínico del paciente con neumonía asociada a ventilación mecánica por *Staphylococcus aureus*.

Ana Rodriguez-Fernandez, David Andaluz-Ojeda, Raquel Almansa, Mar Justel, Jose María Eiros, Jesús F Bermejo-Martin, Raúl Ortiz de Lejarazu.

### **PREMIOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA 2014. HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID. PREMIO ACCÉSIT AL MEJOR ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN PUBLICADO POR UN FACULTATIVO EN PERIODO DE FORMACIÓN MIR/FIR DURANTE EL PERIODO 2012-2013.**

TÍTULO: Eosinophil as a protective cell in *S. aureus* ventilator associated pneumonia.

Ana Rodriguez-Fernandez, David Andaluz-Ojeda, Raquel Almansa, Mar Justel, Jose Maria Eiros, Raúl Ortiz de Lejarazu.





## Research Article

# Eosinophil as a Protective Cell in *S. aureus* Ventilator-Associated Pneumonia

Ana Rodríguez-Fernández,<sup>1</sup> David Andaluz-Ojeda,<sup>2</sup> Raquel Almansa,<sup>1,3</sup>  
 Mar Justel,<sup>1</sup> Jose Maria Elros,<sup>1</sup> and Raul Ortiz de Lejarazu<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Service, Clinical University Hospital-SACYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

<sup>2</sup> Critical Care Medicine Service, Clinical University Hospital-SACYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

<sup>3</sup> Biomedical Investigation Unit, Clinical University Hospital (ibC), SACYL & IECSCYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain

<sup>4</sup> National Centre of Influenza, Avda Ramón y Cajal 7, 47005 Valladolid, Spain

Correspondence should be addressed to Ana Rodríguez-Fernández; arodfer@hotmail.es

Received 30 July 2013; Accepted 30 July 2013

Academic Editor: Jesús E. Bermejo-Martin

Copyright © 2013 Ana Rodríguez-Fernández et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cell counts of leukocytes subpopulations are demonstrating to have an important value in predicting outcome in severe infections. We evaluated here the render of leukogram counts to predict outcome in patients with ventilator-associated pneumonia (VAP) caused by *Staphylococcus aureus*. Data from patients admitted to the ICU of Hospital Clínico Universitario de Valladolid from 2006 to 2011 with diagnosis of VAP caused by *S. aureus* were retrospectively collected for the study ( $n = 44$ ). Leukocyte counts were collected at ICU admission and also at VAP diagnosis. Our results showed that nonsurvivors had significant lower eosinophil counts at VAP diagnosis. Multivariate Cox regression analysis performed by the Wald test for forward selection showed that eosinophil increments from ICU admission to VAP diagnosis and total eosinophil counts at VAP diagnosis were protective factors against mortality in the first 28 days following diagnosis: (HR [CI 95%],  $P$ ): (0.996 [0.993–0.999], 0.010); (0.370 [0.180–0.750], 0.006). Patients with eosinophil counts  $<30$  cells/mm<sup>3</sup> at diagnosis died earlier. Eosinophil counts identified survivors: (AUROC [CI 95%],  $P$ ): (0.701 [0.519–0.882], 0.042). Eosinophil behaves as a protective cell in patients with VAP caused by *S. aureus*.

## 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* has persisted as an important public health problem, mostly due to the emergence of strains that were resistant to methicillin and oxacillin (MRSA) in the 1960s [1]. Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most frequent infection among patients hospitalized in intensive care units (ICU), with *S. aureus* infection being a leading cause of VAP [2]. VAP maintains high morbidity and mortality. Because of that, a number of inflammatory biomarkers are under evaluation to guide duration of antibiotic therapy and to predict disease outcome in VAP, with heterogeneous results [3–5]. Cell counts of leukocytes subpopulations are demonstrating to have an important value in predicting

outcome in severe infections [6–8]. Counting leukocytes is a routine and inexpensive test in ICU settings. We designed a retrospective study aimed to evaluate the influence of leukocyte subpopulations counts on the probability of death in patients with VAP caused by *S. aureus*.

## 2. Methods

**Study Design and Subjects.** Data from patients admitted to the ICU of Hospital Clínico Universitario de Valladolid from 2006 to 2011 with diagnosis of VAP caused by *S. aureus* were retrospectively collected for the study ( $n = 44$ ). Patients who were intubated and ventilated in the moment of ICU

hospitalization and developed VAP were eligible. Patients who had been treated with corticosteroids or immunosuppressive drugs and immunocompromised patients were not eligible and were excluded from the present study. VAP was defined as the pneumonia arising more than 72 h after endotracheal intubation characterized by the presence of new or progressive radiographic infiltrate associated with two or more of the following criteria: (a) temperature of greater than 38.5°C or less than 36.5°C, (b) leukocyte count of greater than 12,000/ $\mu$ L or less than 4,500/ $\mu$ L, (c) purulent endotracheal aspirate, and (d) positive ( $\geq 10^6$  cfu/mL) endotracheal aspirate. Microbiological diagnosis was performed by quantitative cultures of lower respiratory tract samples (endotracheal aspirate (BAS) or bronchoscopic alveolar lavage (BAL)), following the standard protocols for diagnosis of respiratory bacteria employed in our center. Patients with positive microbiological identification before 72 first hours following mechanical ventilation instauration were excluded because they did not satisfy VAP definition. A standard survey was employed to collect clinical data and leukogram counts from the patients. Patient identification remained anonymous and informed consent was waived due to the observational nature of the study. Approval of the study protocol in both the scientific and the ethical aspects was obtained from the Scientific Committee for Clinical Research of our hospital.

**Statistical Analysis.** For the demographic and clinical characteristics of the patients, differences between groups were assessed using the Chi-squared test for categorical variables and the Mann-Whitney *U* test for continuous variables when appropriate. We determined the hazard ratio (HR) and 95% confidence interval by Cox regression analysis, which was used to assess the impact of eosinophil increments and counts on mortality over time. Multivariate Cox regression analysis was performed by using the Wald test for forward selection. Statistical analysis was performed by using IBM-SPSS Statistics 20.0.

### 3. Results

The vast majority of our patients were elderly males, being hypertension, cardiovascular disease, and smoker habit the most frequent comorbidities. Both survivors and nonsurvivors spent four days under mechanical ventilation and presented an APACHE-II score of 18 on average. They were comparable in terms of age, sex, and accompanying comorbidities. We defined coinfection as those other bacteria infecting any localization of our patients with clinical significance. Bacterial coinfection was principally of the following foci: respiratory, urine, and blood. The principles and most frequent pathogens isolated were Gram negative rods from Enterobacteriaceae family (43.3%), *Acinetobacter baumannii* (26.7%), and coagulase negative staphylococci (23.3%).

The comparison of cell counts revealed significant lower eosinophil counts at VAP diagnosis in nonsurvivors (see Table I). When cell increments ([counts at VAP diagnosis]–[counts at ICU admission]) were evaluated in survivors and

nonsurvivors, nonsurvivors showed significant lower increments of eosinophil counts ( $P = 0.010$ ) (see Figure 1(a)). Potential confounding variables introduced in the multivariate Cox regression analysis were age, sex, APACHE-II score, VAP caused by *Staphylococcus aureus* methicillin resistance/*Staphylococcus aureus* methicillin susceptible (MRSA/MSSA), bacterial coinfection, and days in mechanical ventilation. For eosinophil increments, the Wald test selected the APACHE-II score and the eosinophil increments as the variables associated with mortality: (HR [CI 95%],  $P$ ): APACHE-II score: (1.073 [1.001–1.151], 0.050); (eosinophil increments): (0.996 [0.993–0.999], 0.010). For total eosinophil counts at VAP diagnosis (log values), the Wald test selected total eosinophil counts at VAP diagnosis (log values) as the only variable associated with prognosis: (HR [CI 95%],  $P$ ): (0.370 [0.180–0.750], 0.006). Therefore, multivariate Cox regression analysis showed that eosinophil increments as well as total eosinophil counts at VAP diagnosis (log values) were protective factors against mortality in the first 28 days following diagnosis of VAP. Kaplan Meier analysis showed that patients with eosinophil counts less than 30 cells/ $\text{mm}^3$  died earlier (see Figure 1(b)). Area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) analysis confirmed eosinophil counts at VAP diagnosis as a good test to diagnose survival (see Figure 1(c)): (area [CI 95%],  $P$ ): (0.701 [0.519–0.882], 0.042).

### 4. Discussion

Regression studies and AUROC analysis supported the protective role of eosinophils in VAP caused by *S. aureus*. Eosinophils are granulocytes that develop in the bone marrow from pluripotent progenitors. They are released into the peripheral blood in a phenotypically mature state, and they are capable of being activated and recruited into tissues in response to appropriate stimuli, most notably the cytokine interleukin-5 (IL-5) and the eotaxin chemokines [9]. Eosinophils are recruited to and activated in lung tissue as part of the pathophysiology of asthma, but recent findings confirm antimicrobial activities of eosinophils [9]. Catapult-like release of structures resembling neutrophil extracellular traps (NETs) from eosinophils has been documented [10]. Our results could in fact support the existence of an antibacterial activity of the eosinophil in the severe infection caused by *S. aureus*. In our patients, fail in expanding eosinophil counts was translated into a poorer outcome.

There is increasing evidence on eosinophils as a protective cell in critically ill patients. Abidi et al. described eosinopenia as a marker of sepsis on admission to ICU [11]. Recently, these authors have described eosinopenia as an early marker of increased mortality in critically ill medical patients [12]. Merino et al. have reported lower eosinophil counts in patients who died of sepsis than in those who survived [6]. Prince et al. have demonstrated that *S. aureus*  $\alpha$ -hemolysin induces cell death in eosinophils [13], which could represent a microbial mechanism of evasion from host immune response.

TABLE 1: Clinical characteristics of survivors and nonsurvivors.

	Survivors (n = 26)	Nonsurvivors (n = 18)	P
Age (years)	60.0 (35.0)	63.5 (26.0)	n.s
Sex (male)	23 (88.5)	7 (38.9)	n.s
APACHE-II score	17.0 (11.0)	22.0 (12.0)	n.s
Days under mechanical ventilation until VAP diagnosis	4.0 (4.0)	4.5 (4.0)	n.s
MRSA/MSSA	8 (30.8)	4 (22.2)	n.s
Bacterial coinfection (Y/N)	20 (76.9)	10 (55.6)	n.s
Diabetes (type I or II) (Y/N)	4 (15.4)	2 (11.1)	n.s
Cardiovascular disease (Y/N)	6 (23.1)	5 (27.8)	n.s
Chronic renal disease (Y/N)	2 (7.7)	1 (5.6)	n.s
Chronic respiratory disease (Y/N)	6 (23.1)	0 (0.0)	n.s
Cerebrovascular disease (Y/N)	6 (23.1)	0 (0.0)	n.s
Smoker (ever) (Y/N)	8 (30.8)	1 (5.6)	n.s
Neurological disease (Y/N)	4 (15.4)	0 (0.0)	n.s
Hypertension (Y/N)	12 (46.2)	8 (44.4)	0.084
Hematologic malignancy (ever) (Y/N)	1 (3.8)	0 (0.0)	n.s
Cirrhosis of the liver (Y/N)	2 (7.7)	0 (0.0)	n.s
Metastatic solid cancer (ever) (Y/N)	0 (0.0)	2 (11.1)	0.018
Gastrointestinal disease (Y/N)	9 (34.6)	1 (5.6)	n.s
Chemotherapy (ever) (Y/N)	1 (3.8)	2 (11.1)	n.s
Alcohol abuse (Y/N)	4 (15.4)	0 (0.0)	n.s
Intravenous drug abuse (Y/N)	2 (7.7)	0 (0.0)	n.s
Obesity (Y/N)	3 (11.5)	1 (5.6)	n.s
Dyslipidemia (Y/N)	4 (15.4)	2 (11.1)	n.s
Lymphocytes at admission to ICU (cells/mm <sup>3</sup> )	960.9 (1017.3)	812.3 (1336.9)	n.s
Monocytes at admission to ICU (cells/mm <sup>3</sup> )	480.3 (442.9)	465.8 (436.6)	n.s
Neutrophils at admission to ICU (cells/mm <sup>3</sup> )	7801.9 (7053.9)	9504.0 (9101.8)	n.s
Basophils at admission to ICU (cells/mm <sup>3</sup> )	11.5 (22.0)	10.5 (28.0)	n.s
Eosinophils at admission to ICU (cells/mm <sup>3</sup> )	14.9 (119.0)	20.3 (195.0)	n.s
Lymphocytes at diagnosis (cells/mm <sup>3</sup> )	983.0 (734.4)	919.6 (973.1)	n.s
Monocytes at diagnosis (cells/mm <sup>3</sup> )	501.3 (238.2)	7071 (473.8)	n.s
Neutrophils at diagnosis (cells/mm <sup>3</sup> )	8261.4 (5372.3)	12182.5 (15051.7)	n.s
Basophils at diagnosis (cells/mm <sup>3</sup> )	13.3 (32.3)	14.2 (16.5)	n.s
Eosinophils at diagnosis (cells/mm <sup>3</sup> )	112.2 (231.0)	51.5 (118.8)	0.043
Ratio N/L at admission to ICU	7.2 (9.2)	11.7 (20.1)	n.s
Ratio N/L at diagnosis	7.3 (7.6)	10.4 (13.5)	0.059

Survival time was censored at day 28. Continuous variables are expressed as median (interquartile rank). Categorical variables are expressed as n (% over column). N.s: not significant.

Terradas et al. observed that both sustained eosinopenia and a high neutrophil to lymphocyte count ratio were independent markers of mortality in patients with bacteremia [8]. Based upon these results, we evaluated the neutrophil to lymphocyte count ratio in survivors and nonsurvivors. No differences were found between groups for this ratio although there was a trend to exhibit a higher ratio in nonsurvivors (see Table 1).

A limitation of our study was that only two samples were collected (at admission and at VAP diagnosis). In further

studies, it will be interesting to assess eosinophil counts in other extra time points during the disease course.

### 5. Conclusion

We document here for the first time a protective effect of eosinophils in patients suffering from VAP caused by *S. aureus*. Eosinophil counting is an inexpensive biomarker easy to implement in clinical practice.

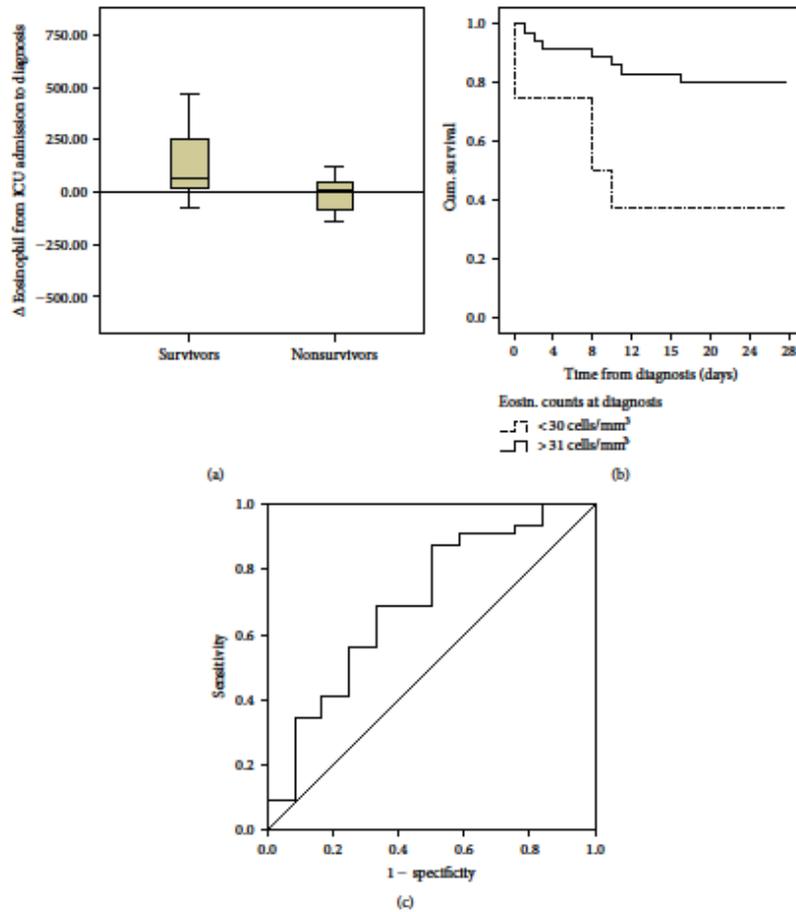


FIGURE 1: (a) Box plots showing increments of eosinophil counts: [counts at VAP diagnosis]–[counts at ICU admission] ( $P = 0.016$ ). (b) Kaplan Meier curves for survival: deciles from percentile 10 to percentile 90 of eosinophil counts were calculated and used to compare survival times in those patients with low or high counts. The first decile showing significant differences between groups based upon the log-rank test was used as the cutoff (percentile 20). Time was censored at 28 days following VAP diagnosis. Cum. survival: cumulative survival. (c) AUROC analysis: the accuracy and the predictive values of eosinophil counts for detecting survivors in the first 28 days following VAP diagnosis were assessed calculating the AUROC.

**Conflict of Interests**

The authors declare that they have no conflict of interests.

**Acknowledgments**

The authors want to thank the Medical and Nurse Team working at the ICU of their Hospital for their dedication to the care of the critical patients included in this study.

This work was possible thanks to the financial support of the National Centre of Influenza from Valladolid, Dirección General de Salud Pública, Junta de Castilla y León.

**References**

[1] R. M. Klevens, J. R. Edwards, E. C. Tenover, L. C. McDonald, T. Horan, and R. Gaynes, "Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care

- units in US hospitals, 1992–2003,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, no. 3, pp. 389–391, 2006.
- [2] J. D. Chan, T. H. Dellit, J. A. Choudhuri et al., “Active surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a tool to predict methicillin-resistant *S. aureus* ventilator-associated pneumonia,” *Critical Care Medicine*, vol. 40, no. 5, pp. 1437–1442, 2012.
  - [3] O. Rewa and J. Muscedere, “Ventilator-associated pneumonia: update on etiology, prevention, and management,” *Current Infectious Disease Reports*, vol. 13, no. 3, pp. 287–295, 2011.
  - [4] F. Bloos, J. C. Marshall, R. P. Dellinger et al., “Multinational, observational study of procalcitonin in ICU patients with pneumonia requiring mechanical ventilation: a multicenter observational study,” *Critical Care*, vol. 15, no. 2, article R88, 2011.
  - [5] G. Hillas, T. Vassilakopoulos, P. Plantza, A. Rasidakis, and P. Bakakos, “C-reactive protein and procalcitonin as predictors of survival and septic shock in ventilator-associated pneumonia,” *European Respiratory Journal*, vol. 35, no. 4, pp. 805–811, 2010.
  - [6] C. A. Merino, F. T. Martínez, F. Cardemil, and J. R. Rodríguez, “Absolute eosinophils count as a marker of mortality in patients with severe sepsis and septic shock in an intensive care unit,” *Journal of Critical Care*, vol. 27, pp. 394–399, 2012.
  - [7] L. H. Rosenberger, T. Hranjec, M. D. McLeod et al., “Improvements in pulmonary and general critical care reduces mortality following ventilator-associated pneumonia,” *Journal of Trauma-Injury, Infection, and Critical Care*, vol. 74, no. 2, pp. 568–574, 2013.
  - [8] R. Terradas, S. Grau, J. Blanch et al., “Eosinophil count and neutrophil-lymphocyte count ratio as prognostic markers in patients with bacteremia: a retrospective cohort study,” *PLoS One*, vol. 7, Article ID e42860, 2012.
  - [9] H. E. Rosenberg, K. D. Dyer, and P. S. Foster, “Eosinophils: changing perspectives in health and disease,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, pp. 9–22, 2012.
  - [10] S. Yousefi, J. A. Gold, N. Andina et al., “Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense,” *Nature Medicine*, vol. 14, no. 9, pp. 949–953, 2008.
  - [11] K. Abidi, I. Khoudri, J. Belayachi et al., “Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units,” *Critical Care*, vol. 12, no. 2, article R59, 2008.
  - [12] K. Abidi, J. Belayachi, Y. Derras et al., “Eosinopenia, an early marker of increased mortality in critically ill medical patients,” *Intensive Care Medicine*, vol. 37, no. 7, pp. 1136–1142, 2011.
  - [13] L. R. Prince, K. J. Graham, J. Connolly et al., “*Staphylococcus aureus* induces eosinophil cell death mediated by  $\alpha$ -Hemolysin,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, Article ID e31506, 2012.

## Immunoglobulins IgG1, IgM and IgA: a synergistic team influencing survival in sepsis

■ J. F. Bermejo-Martín<sup>1,\*</sup>, A. Rodríguez-Fernández<sup>2,\*</sup>, R. Herrán-Monge<sup>3</sup>, D. Andaluz-Ojeda<sup>1,4</sup>, A. Muriel-Bombín<sup>3</sup>, P. Merino<sup>3</sup>, M. M. García-García<sup>3</sup>, R. Citores<sup>4</sup>, F. Gandía<sup>4</sup>, R. Almansa<sup>1</sup>, J. Blanco<sup>3,5</sup> & for the GRECIA Group (Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos)<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>Unidad de Apoyo a la Investigación, Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), SACYL/IECSYL; <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL; <sup>3</sup>Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, SACYL; <sup>4</sup>Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL, Valladolid, Spain; and <sup>5</sup>Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

**Abstract.** Bermejo-Martín JF, Rodríguez-Fernández A, Herrán-Monge R, Andaluz-Ojeda D, Muriel-Bombín A, Merino P, García-García MM, Citores R, Gandía F, Almansa R, Blanco J, for the GRECIA Group (Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos) (Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), SACYL/IECSYL, Valladolid, Spain; Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL, Valladolid, Spain; Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, SACYL, Valladolid, Spain; Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL, Valladolid, Spain). Immunoglobulins IgG1, IgM and IgA: a synergistic team influencing survival in sepsis. *J Intern Med* 2014; doi: 10.1111/joim.12265.

**Objective.** The impact of endogenous immunoglobulin isotypes on the prognosis of patients with severe sepsis has not been sufficiently explored. The aim of this study was to evaluate the association between immunoglobulin levels in plasma and survival in patients with this condition.

**Design and patients.** A prospective multicentre cohort study was conducted. A total of 172 adult patients admitted to the intensive care unit (ICU) with severe sepsis or septic shock were recruited. Patients were classified based on deciles of immunoglobulin concentrations at diagnosis of sepsis. Categorical variables were created and tested for

their association with survival during hospitalization in the ICU.

**Results.** Overall, 42 patients died in the ICU during the study. Kaplan–Meier analysis showed that immunoglobulin concentrations below 300 mg dL<sup>-1</sup> for IgG1, 35 mg dL<sup>-1</sup> for IgM and 150 mg dL<sup>-1</sup> for IgA were associated with shorter survival times. Multivariate regression analysis showed that IgG1 < 300 mg dL<sup>-1</sup> was a risk factor for mortality [odds ratio (OR) 2.50, 95% confidence interval (CI) 1.04–6.03; *P* = 0.042]. The combined presence of IgG1, IgM and IgA levels below the described thresholds had a synergistic impact on mortality risk (OR 5.27, 95% CI 1.41–19.69; *P* = 0.013). A similar effect was observed for combined low levels of IgG1 and IgA (OR 4.10, 95% CI 1.28–13.12; *P* = 0.018) and also of IgG1 and IgM (OR 3.10, 95% CI 1.13–8.49; *P* = 0.028).

**Conclusions.** The combined presence of low levels of the endogenous immunoglobulins IgG1, IgM and IgA in plasma is associated with reduced survival in patients with severe sepsis or septic shock. Assessment of the concentrations of these immunoglobulins could improve the results of treatment with exogenous immunoglobulins in patients with sepsis.

**Keywords:** immunoglobulin, isotypes, mortality, sepsis, shock.

\*These authors contributed equally<sup>1</sup> Investigators of the GRECIA group:

Hospital General Yagüe (Burgos, Spain): M<sup>a</sup> Jesús López Pueyo, Jose Antonio Fernandez Ratero, Miguel Martinez Barrios, Fernando Callejo Torre, Sergio Ossa Echeverri

Complejo Hospitalario de León (Spain), Demetrio Carriedo Ule, Ana M<sup>a</sup> Domínguez Berrot, Fco Javier Díaz Domínguez

Hospital Río Carrión (Palencia, Spain): Susana Monadillo

Hospital del Bierzo (Ponferrada, Spain): Braulio Alvarez Martínez

Hospital Clínico Universitario de Salamanca (Spain): Noelia Albalá, Juan Carlos Ballesteros, Marta Paz Perez, Elena Perez Losada

Hospital General de Segovia (Spain): Santiago Macías, Rafael Pajares García, Noelia Recio García Cervigón

Complejo Hospitalario de Soria (Spain): M<sup>a</sup> Mar Gobernado Serrano, M<sup>a</sup> José Fernández Calavia, Daniel Moreno Torres

Hospital Virgen de la Concha (Spain): Concha Tamancón, Teresa Loreto, Priscila Carcelen

### Introduction

Sepsis is one of the top 10 causes of death, affects all ages, and occurs in the community, in long-term care facilities and amongst patients admitted to hospital under the care of any, and every, medical specialty [1, 2]. When accompanied by evidence of hypoperfusion or dysfunction of at least one organ system, severe sepsis is diagnosed. When severe sepsis is accompanied by hypotension or the need for vasopressors, despite adequate fluid resuscitation, the diagnosis is septic shock [2]. The incidence of sepsis is growing, due amongst other causes to population ageing, an exponential increase in chronic diseases and frequent use of drugs to induce immunosuppression [3]. Increasing disease severity correlates with increasing mortality, which is up to 40–70% for patients with septic shock [2]. The development of effective new therapies for this disease has proved to be difficult; the most recent examples have been activated protein C and CytoFab (a polyclonal antitumour necrosis factor antibody). However, both of these failed to show clinical benefit in the context of a clinical trial [1].

The presence of low levels of immunoglobulins is a frequent finding in patients with severe sepsis and septic shock [4–6], although it is not clear whether hypogammaglobulinaemia is a cause or a consequence of sepsis. Findings from the few clinical studies that have been reported have supported the existence of a direct association between levels of endogenous immunoglobulins in plasma and survival, but these results are based on small cohorts of patients [4–7]. In view of this, we designed a multicentre study to evaluate the potential associations between immunoglobulin levels and survival in patients with severe sepsis and septic shock. To our knowledge, this is the largest ever study addressing this issue. The present results could contribute to improving immunoglobulin-replacement therapies for the treatment of sepsis [8].

### Materials and methods

#### *Study design*

Data from the Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos (GRECIA) study were analysed for potential associations between immunoglobulin concentrations in plasma, mean survival time and mortality risk in patients with severe sepsis and septic shock. GRECIA was a multicentre

prospective cohort study involving nine different general intensive care units (ICUs) within the National Health System in Castilla y León (SACYL), Spain, from January 2012 to December 2012.

#### *Patient selection*

A total of 197 adult patients (>18 years old) admitted to the ICU with a diagnosis of severe sepsis or septic shock (according to the definition proposed by the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference) were initially recruited [9]. Of these, 25 were excluded from the analysis because the immunoglobulin quantification test failed to retrieve data for any (at least one) of the immunoglobulin isotypes or subclasses of interest. Therefore, 172 patients were included in the study. Patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection and those undergoing radiotherapy or receiving immunosuppressive drugs, including chemotherapy or systemic steroids, in the last 3 months prior to admission to the ICU were considered to be immunosuppressed. Exclusion criteria were ischaemic heart disease and arrhythmia or lack of informed consent.

The numbers of patients enrolled per participating centre were as follows: Hospital General Yagüe de Burgos,  $n = 19$ ; Hospital de León,  $n = 20$ ; Hospital Rio Carrion de Palencia,  $n = 14$ ; Hospital El Bierzo,  $n = 9$ ; Complejo Asistencial de Salamanca,  $n = 29$ ; Complejo Asistencial de Soria,  $n = 17$ ; Hospital Clínico Universitario de Valladolid,  $n = 28$ ; Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid,  $n = 18$ ; and Hospital Virgen de La Concha de Zamora,  $n = 18$ .

#### *Clinical data and treatment*

A specific standard survey was employed to collect the clinical data, including medical history, physical examination and haematological, biochemical, radiological and microbiological investigations, in all participating centres.

Treatment decisions were not standardized for all patients but were made by the treating physician.

#### *Immunoglobulin quantification*

A 5-mL sample of blood was collected in an EDTA tube from all patients at the time of diagnosis of severe sepsis or septic shock. The blood was

centrifuged, and plasma was obtained and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until required for immunoglobulin quantification. Plasma levels of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM and IgE were measured using a multiplex immunoglobulin isotyping kit (Biorad TM, Hercules, CA, USA) on a Luminex platform. All plasma samples were tested for immunoglobulin concentrations using the same equipment, to avoid potential bias due to multiplatform testing. The plasma albumin concentration was measured using a Cobas Integra Albumin Gen.2 system (Roche, Basel, Switzerland).

#### Ethics

Written informed consent was obtained directly from all patients, or their legal representative, before enrolment. Scientific and ethical approval of the study protocol was obtained from the scientific committees for clinical research of all participating hospitals.

#### Statistical analysis

Differences in demographic and clinical characteristics between patient groups were assessed using the chi-squared test for categorical variables and the Mann-Whitney *U* test for continuous variables. Deciles of immunoglobulin concentrations were used to categorize patients below or above each decile, creating the corresponding categorical variables. We determined the occurrence of death using Kaplan-Meier curves. Time was censored at day 28 following diagnosis of severe sepsis or septic shock for this analysis. The first decile showing significant differences between groups based on the log-rank test was considered as the immunoglobulin threshold. We established four immunoscores for identifying those patients with the combined presence of low levels of two or more immunoglobulins (below each respective threshold): immunoscore (IgG1 IgM IgA), immunoscore (IgG1 IgM), immunoscore (IgG1 IgA) and immunoscore (IgM IgA). An overall score of 0 was assigned to all patients with levels below the thresholds for all immunoglobulins forming each immunoscore and a score of 1 to the remaining patients. The dichotomous variables created for each immunoglobulin using the identified thresholds along with the immunoscores were further introduced into a multivariate logistic regression analysis to determine the association between immunoglobulin levels and mortality risk in the ICU. Adjustments were made for age, sex and Acute Physiology and

Chronic Health Evaluation II score (APACHE II) at diagnosis of sepsis or septic shock. In addition, immunosuppression and chronic respiratory disease ( $P < 0.1$  in the univariate analysis; Table 1) were also introduced as adjusting variables in the multivariate analysis. Correlations between immunoglobulins and albumin levels in plasma were assessed using the Spearman-Kärber test. All statistical tests were two sided, and  $P < 0.05$  was considered significant. Data analysis was performed using SPSS for WINDOWS version 20.0 software (IBM-SPSS, Chicago, IL, USA).

#### Results

##### Clinical characteristics

Clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Overall, 42 patients died during hospitalization in the ICU (24.4%). Nonsurvivors were older than survivors [median (interquartile rank)]: 74 (11.0) vs. 65.5 (21.0) years;  $P = 0.007$ ). A history of immunosuppression was more common amongst nonsurvivors: 16 of 42 (38.1%) vs. 19 of 130 (14.6%) survivors ( $P = 0.001$ ). The immunosuppressed group comprised patients with HIV infection ( $n = 1$ ) or undergoing solid organ transplantation ( $n = 4$ ), patients with cancer receiving chemotherapy and/or radiotherapy ( $n = 7$ ), patients with chronic respiratory disease receiving treatment with systemic steroids ( $n = 6$ ) and those receiving treatment with immunosuppressive drugs due to autoimmune or systemic inflammatory diseases ( $n = 17$ ). A history of chronic respiratory disease was also more common in nonsurvivors: 11 of 42 (26.2%) vs. 14 of 130 (10.8%) amongst survivors ( $P = 0.014$ ). Nonsurvivors presented with more severe disease, with a median (interquartile rank) APACHE II score at diagnosis of 27 (8.0) vs. 19 (8.0) amongst survivors ( $P = 0.001$ ), and more frequently needed invasive mechanical ventilation at admission to the ICU [39 of 42 (92.9%) nonsurvivors vs. 81 of 130 (62.3%) survivors;  $P = 0.001$ ]. Current respiratory infection was more common in nonsurvivors: 21 of 42 (50.0%) vs. 36 of 130 (27.7%) survivors ( $P = 0.008$ ).

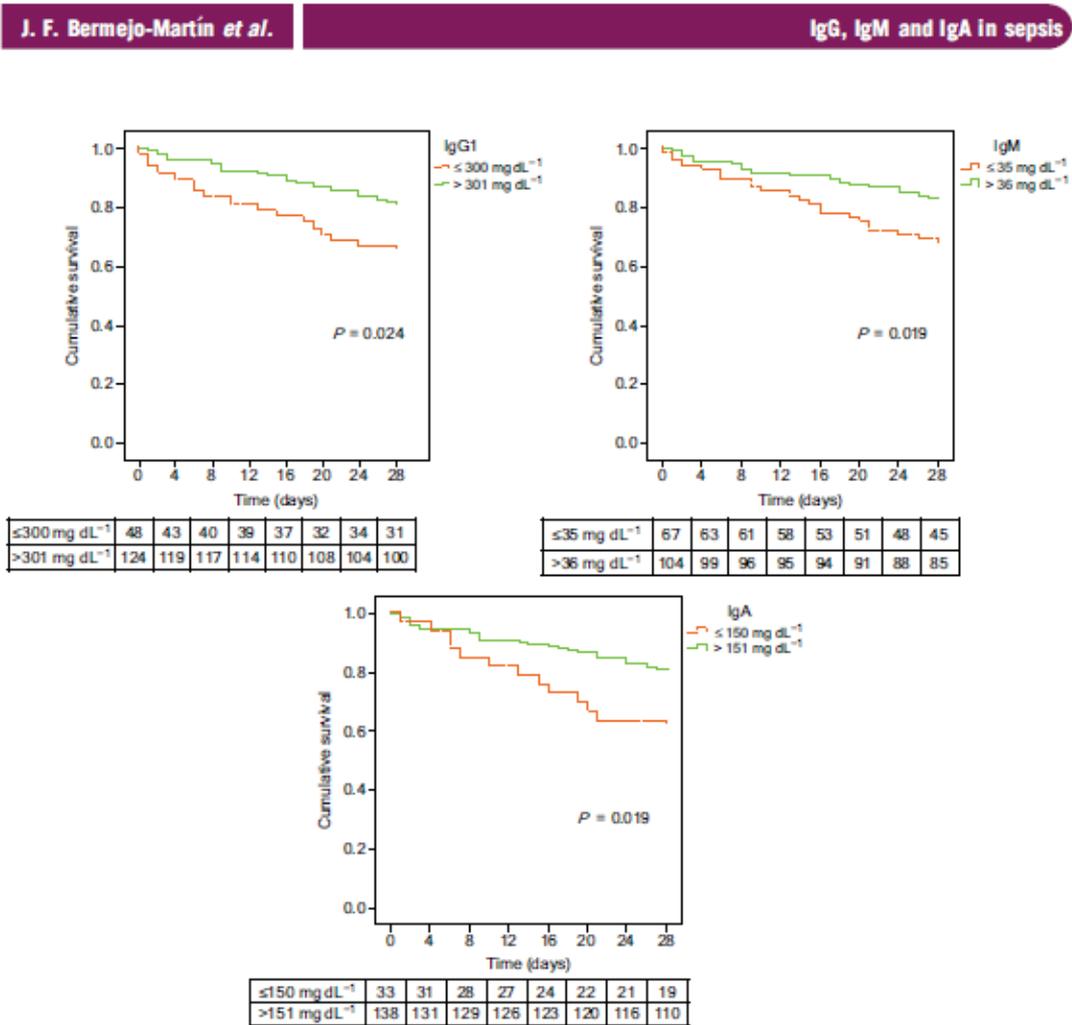
##### Kaplan-Meier survival time analysis

When categorical variables were created based upon deciles of immunoglobulin levels and these variables were tested by Kaplan-Meier analysis, the following immunoglobulin thresholds showed a significant association with survival: IgG1, 300 mg  $\text{dL}^{-1}$  (decile 3); IgM, 35 mg  $\text{dL}^{-1}$  (decile 4); and IgA,

**Table 1** Clinical characteristics of patients classified by outcome in the intensive care unit. Continuous variables are expressed as median (interquartile rank), and categorical variables are expressed as number (%)

		Survivors (n = 130)	Nonsurvivors (n = 42)	Total (n = 172)	P
Personal antecedents	Age (Yrs)	65.5 (21.0)	74 (11.0)	68.5 (19.0)	<b>0.007</b>
	Gender (Male)	85 (65.4)	30 (71.4)	115 (66.9)	n.s.
	Immunosuppression (Y/N)	19 (14.6)	16 (38.1)	35 (20.3)	<b>0.001</b>
	Chronic cardiovascular disease (Y/N)	5 (3.8)	4 (9.5)	9 (5.2)	n.s.
	Chronic respiratory disease (Y/N)	14 (10.8)	11 (26.2)	25 (14.5)	<b>0.014</b>
	Chronic renal failure (Y/N)	10 (7.7)	3 (7.1)	13 (7.6)	n.s.
	Chronic hepatic failure (Y/N)	3 (2.3)	1 (2.4)	4 (2.3)	n.s.
	Diabetes (Y/N)	17 (13.1)	4 (9.5)	21 (12.2)	n.s.
	Metastatic solid cancer (Y/N)	8 (6.2)	2 (4.8)	10 (5.8)	n.s.
	Alcohol abuse (Y/N)	10 (7.7)	3 (7.1)	13 (7.6)	n.s.
Clinical characteristics and outcome	Septic shock at admission to the ICU	100 (76.9)	34 (80.9)	134 (77.9)	n.s.
	APACHE II score	19 (8.0)	27 (8.0)	21 (10.0)	<b>0.001</b>
	Invasive mechanical ventilation (Y/N)	81 (62.3)	39 (92.9)	120 (69.8)	<b>0.001</b>
	Noninvasive mechanical ventilation (Y/N)	18 (13.8)	10 (23.8)	28 (16.3)	n.s.
	ICU stay (days)	8 (12.0)	10 (15.0)	8 (12.0)	n.s.
Presumed source of infection	Hospital stay (days)	27 (34.0)	21 (20.0)	25 (25.0)	<b>0.002</b>
	Abdominal	47 (36.2)	13 (31.0)	60 (34.9)	n.s.
	Respiratory	36 (27.7)	21 (50.0)	57 (33.1)	<b>0.008</b>
	Urologic	23 (17.7)	3 (7.1)	26 (15.1)	0.097
	Catheter/primary bacteriemia	8 (12.0)	1 (2.4)	9 (5.2)	n.s.
	Skin/soft tissue	6 (4.6)	0 (0.0)	6 (3.5)	n.s.
	Prosthesis/IVD	2 (1.5)	2 (4.8)	4 (2.3)	n.s.
Documented microbial agent	Other/unknown	8 (12.0)	2 (4.8)	10 (5.8)	n.s.
	Gram negative	43 (33.1)	15 (35.7)	58 (33.7)	n.s.
	Gram positive	31 (23.8)	8 (19.0)	39 (22.7)	n.s.
Data lab.	Polimicrobial	9 (6.9)	2 (4.8)	11 (6.4)	n.s.
	IgG1 (decil 3) ( $\leq 300$ mg dL <sup>-1</sup> )	31 (23.8)	17 (40.5)	48 (27.9)	<b>0.037</b>
	IgM (decil 4) ( $\leq 35$ mg dL <sup>-1</sup> )	45 (34.6)	23 (54.8)	68 (39.2)	<b>0.020</b>
	IgA (decil 2) ( $\leq 150$ mg dL <sup>-1</sup> )	20 (15.4)	13 (30.9)	33 (19.2)	<b>0.026</b>
	IS (IgG1 IgM IgA) = 0	7 (5.4)	11 (26.2)	18 (10.5)	<b>0.001</b>
	IS (IgG1 IgM) = 0	16 (12.3)	14 (33.3)	30 (17.4)	<b>0.002</b>
	IS (IgG1 IgA) = 0	9 (6.9)	12 (28.6)	21 (12.2)	<b>0.001</b>
IS (IgM IgA) = 0	12 (9.2)	12 (28.6)	24 (13.9)	<b>0.002</b>	

n.s., not significant; APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; ICU, intensive care unit; IVD, intravascular devices; IS, immunoscore. Significant differences are highlighted in bold.



**Fig. 1** Kaplan-Meier curves showing the impact of immunoglobulin levels on survival. Number of surviving (censored) patients over time is shown at the bottom of each graph.

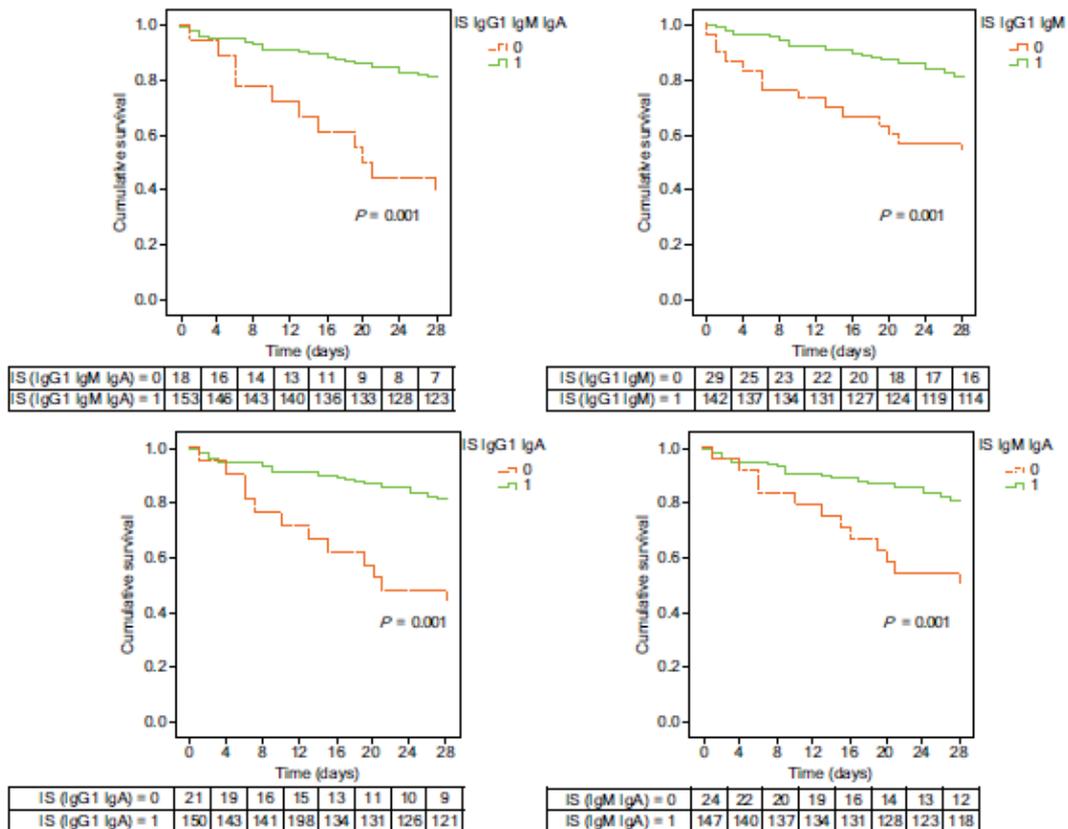
150 mg dL<sup>-1</sup> (decile 2) (Fig. 1). These values are compatible with the presence of IgG1 and IgM hypogammaglobulinaemia, according to the normal reference values in our laboratory: IgG1, 344–966 mg dL<sup>-1</sup>; IgM, 60–220 mg dL<sup>-1</sup>; and IgA, 117–420 mg dL<sup>-1</sup>. In nonsurvivors with immunoglobulin levels below the identified thresholds, time to death was shorter than amongst the other nonsurvivors (Table 2). Overall, 27.9%, 39.2% and 19.2% of patients had immunoglobulin concentrations below these thresholds for IgG1, IgM and IgA, respectively (Table 1). In the case of IgG2, IgG3 and IgG4, we failed to identify any threshold significantly associated with survival. With regard

to total IgG, decil 2 (346 mg dL<sup>-1</sup>) was the only threshold that showed an association with survival close to significance ( $P = 0.056$ ). Therefore, IgG2, IgG3 and IgG4 as well as total IgG were not included in the immunoscores. When the combined immunoscores were evaluated, those containing IgG1 plus other immunoglobulin isotype/s mostly influenced survival, even more so than individual immunoglobulins (Fig. 2 and Table 2). It is interesting that the rate of previous immunosuppression was not different in patients dying with immunoscores of 0 or with immunoscores of 1 ( $P > 0.05$ , data not shown). The Spearman-Kärber test provided evidence of the absence of significant

**Table 2** Mean survival times (days) in nonsurvivors based on immunoglobulin thresholds. Differences between groups were assessed using the log-rank test. Δ (days) represents [(mean survival time in patients with levels of immunoglobulin above the threshold) – (mean survival time in patients with levels of immunoglobulin below the threshold)]

	< threshold		> threshold		Δ (days)	P
	n	Days [CI 95%]	n	Days [CI 95%]		
IgG1 ( $\leq 300$ mg dL <sup>-1</sup> )	17	22.1 [19.3, 24.9], 31	25	25.3 [24.1, 26.5]	3.2	<b>0.024</b>
IgM ( $\leq 35$ mg dL <sup>-1</sup> )	23	23.0 [20.9, 25.1]	19	25.3 [24.0, 26.7]	2.3	<b>0.019</b>
IgA ( $\leq 150$ mg dL <sup>-1</sup> )	13	22.0 [18.8, 25.1]	29	25.0 [23.8, 26.2]	3.0	<b>0.019</b>
IS (IgG1 IgM IgA) = 0	11	18.8 [14.1, 23.5]	31	25.1 [23.9, 26.2]	6.3	<b>0.000</b>
IS (IgG1 IgM) = 0	14	19.8 [15.8, 23.7]	28	25.4 [24.3, 26.5]	5.6	<b>0.000</b>
IS (IgG1 IgA) = 0	12	19.1 [14.8, 23.4]	30	25.2 [24.0, 26.3]	6.1	<b>0.000</b>
IS (IgM IgA) = 0	12	20.6 [23.9, 26.2]	30	25.0 [16.7, 24.4]	4.4	<b>0.001</b>

IS, immunoscore; CI, confidence interval.  
Significant differences are highlighted in bold.



**Fig. 2** Kaplan-Meier curves showing the impact of the combined immunoglobulin scores on survival. Number of surviving (censored) patients over time is shown at the bottom of each graph. IS, immunoscore.

correlations between levels of immunoglobulins and albumin in plasma (correlation coefficient, *P*): IgG1 (-0.03, 0.709), IgG2 (-0.02, 0.833), IgG3 (0.10, 0.269), IgG4 (-0.04, 0.618), total IgG (-0.03, 0.709), IgM (0.10, 0.238) and IgA (-0.07, 0.392).

*Regression analysis for prediction of risk of mortality in the ICU*

Univariate analysis showed a significant association between increased risk of mortality in the ICU and low levels of IgG1 and IgM (but not IgA) and low immunoscores (Table 3). Of note, only IgG1 or the immunoscores including this immunoglobulin showed a significant association with mortality in the multivariate analysis; this association was particularly strong for the immunoscore (IgG1 IgM IgA) (Table 3).

**Discussion**

The influence of endogenous immunoglobulins on the outcome of patients with sepsis is not clear. In this study, we have identified a threshold value for concentrations of IgG1, IgM and IgA in plasma associated with survival in patients with severe sepsis or septic shock. It is interesting that immunoglobulin concentrations below the described thresholds were frequently observed in our cohort. The present results agree with those obtained in previous studies. Andaluz-Ojeda *et al.* [5] observed lower levels of IgG at ICU admission in those patients with severe sepsis or septic shock who died. Further, Tamayo *et al.* [7] identified a protective role of IgG1, IgM and IgA against mortality in a small cohort of postsurgical patients with

septic shock (*n* = 42). In another small study (*n* = 21), Taccone *et al.* [6] observed that patients with septic shock and low levels of IgG had greater vasopressor requirements, were more likely to develop acute lung injury/acute respiratory distress syndrome and had higher mortality rates. Venet *et al.* [4] reported a significant reduction in plasma IgG concentrations in 62 septic shock patients, with no apparent association with mortality. Nonetheless, these authors did not perform regression analysis to assess the potential influence of immunoglobulin levels on prognosis. Giannellos-Bourboulis *et al.* [10] have recently reported decreased levels of IgM in patients with septic shock compared to those with systemic inflammatory response syndrome or severe sepsis. Through serial measurements of IgM, they also observed that the distribution over time was significantly greater for survivors than for nonsurvivors.

There are several possible explanations for the lower levels of immunoglobulins found in some patients with severe sepsis or septic shock. First, the production of immunoglobulins may be decreased. Whilst this mechanism could affect the levels of IgM and IgA, it is unlikely to contribute to the low levels of IgG1 observed in nonsurvivors, given the long half-life of this immunoglobulin (several weeks). Secondly, haemodilution due to liquid replacement or capillary leak may provide an explanation. In our study, the absence of significant associations between immunoglobulins and albumin concentrations in plasma suggests that these mechanisms cannot explain the levels of immunoglobulins observed in these patients.

**Table 3** Logistic regression analysis for predicting mortality in the intensive care unit. Multivariate model was adjusted for age, sex, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score and history of immunosuppression, or of chronic respiratory disease

Logistic regression	Univariate		Multivariate	
	OR [CI 95%]	<i>P</i>	OR [CI 95%]	<i>P</i>
IgG1 ( $\leq 300$ mg dL <sup>-1</sup> )	<b>2.07 [1.01-4.30]</b>	<b>0.050</b>	<b>2.50 [1.04-6.03]</b>	<b>0.042</b>
IgM ( $\leq 35$ mg dL <sup>-1</sup> )	<b>2.15 [1.07-4.32]</b>	<b>0.032</b>	1.42 [0.60-3.33]	0.425
IgA ( $\leq 150$ mg dL <sup>-1</sup> )	1.99 [0.88-4.49]	0.097	1.57 [0.58-4.23]	0.370
Immunoscore (IgG1 IgM IgA) = 0	<b>4.58 [1.68-12.54]</b>	<b>0.003</b>	<b>5.27 [1.41-19.69]</b>	<b>0.013</b>
Immunoscore (IgG1 IgM) = 0	<b>3.41 [1.49-7.78]</b>	<b>0.004</b>	<b>3.10 [1.13-8.49]</b>	<b>0.028</b>
Immunoscore (IgG1 IgA) = 0	<b>4.09 [1.60-10.48]</b>	<b>0.003</b>	<b>4.10 [1.28-13.12]</b>	<b>0.018</b>
Immunoscore (IgM IgA) = 0	<b>3.07 [1.26-7.49]</b>	<b>0.014</b>	2.60 [0.82-8.27]	0.106

OR, odds ratio; CI, confidence interval; IS, immunoscore; n.s., not significant. Significant differences are highlighted in bold.

Thirdly, other factors potentially affecting immunoglobulin levels in sepsis include increased catabolism, redistribution/sequestration in inflamed tissues, previous immunodeficiency or immunodeficiency due to sepsis or the critical illness *per se* [1, 3, 11–14]. Finally, immunoglobulin levels could also be affected by consumption in the context of the antimicrobial response.

IgG1 was the only immunoglobulin independently associated with mortality. This finding is not unexpected as IgG1 constitutes most of the total IgG (66%), followed by IgG2 (24%), IgG3 (7%) and IgG4 (3%) [12, 15]. Consequently, a decrease in IgG1 normally results in hypogammaglobulinaemia [16]. To our knowledge, our study is the first to investigate potential synergy between different immunoglobulin isotypes with regard to mortality risk in sepsis. Results from Kaplan–Meier and multivariate regression analyses (Tables 2 and 3) showed that the concomitant presence of low levels of IgG1 plus low levels of other immunoglobulin isotype/s translates into both a synergistic decrease in survival time and a synergistic increase in mortality risk. Multivariate logistic regression analysis showed that the combined deficiency of IgG1, IgA and IgM has the greatest influence on survival, as evidenced by the respective odds ratio values (Table 3).

Our results support the notion that not all patients with severe sepsis or septic shock would benefit from replacement therapies with exogenous immunoglobulins, only those with plasma concentrations below the thresholds identified in this study. The design of clinical trials to test the use of intravenous immunoglobulins in sepsis should consider the measurement of concentrations of endogenous IgG1, IgA and IgM in plasma to identify those patients most likely to benefit from treatment with preparations containing IgG or enriched in IgM and IgA [17–20]. Our data support the fact that not doing so could translate into an important bias in patient selection which could greatly affect the final result of these trials.

Finally, the failure to find significant associations between total IgG concentrations and mortality risk in our study could be due to the sample size of our cohort. Further studies including larger numbers of patients could also help to clarify the influence of different microbes on the potential benefit of replacement therapies with immunoglobulins in sepsis.

### Conclusions

The simultaneous presence of low levels of the endogenous immunoglobulins IgG1, IgM and IgA in plasma is associated with reduced survival in patients with severe sepsis or septic shock. Assessment of the concentrations of these immunoglobulins could improve the results of treatment with exogenous immunoglobulins in patients with sepsis.

### Acknowledgement

The authors thank the medical and nursing teams at the participating ICUs for their kind collaboration during this study. The authors thank also Lucía Rico and Verónica Iglesias for their technical assistance in the lab.

### Funding

The GRECIA study was supported by Proyectos de Investigación en Biomedicina, Consejería de Sanidad, JCYL (BOCYL-D-26072010). This work was also supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Spain (grant number PI13/02110).

### Conflict of interest statement

None of the authors has any conflicts of interests to declare.

### References

- 1 Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; **369**: 840–51.
- 2 Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 2007; **335**: 879–83.
- 3 Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008; **14**: 64–78.
- 4 Venet F, Gebeile R, Bancel J *et al*. Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients. *Int Immunopharmacol* 2011; **11**: 2086–90.
- 5 Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F *et al*. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit Care* 2011; **15**: R243.
- 6 Taccone FS, Stordeur P, De Backer D, Creteur J, Vincent J-L. Gamma-globulin levels in patients with community-acquired septic shock. *Shock* 2009; **32**: 379–85.
- 7 Tamayo E, Fernández A, Almansa R *et al*. Beneficial role of endogenous immunoglobulin subclasses and isotypes in septic shock. *J Crit Care* 2012; **27**: 616–22.

- 8 Shankar-Hari M, Spencer J, Sewell WA, Rowan KM, Singer M. Bench-to-bedside review: immunoglobulin therapy for sepsis - biological plausibility from a critical care perspective. *Crit Care* 2012; **16**: 206.
- 9 Bone RC, Balk RA, Cerra FB *et al*. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. American college of chest physicians/society of critical care medicine. 1992. *Chest* 2009; **136**: e28.
- 10 Giamarellos-Bourboulis EJ, Apostolidou E, Lada M *et al*. Kinetics of circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. *Crit Care* 2013; **17**: R247.
- 11 Rose ME, Lang DM. Evaluating and managing hypogammaglobulinemia. *Cleve Clin J Med* 2006; **73**: 133-7, 140, 143-4.
- 12 Pan Q, Hammarström L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunol Rev* 2000; **178**: 99-110.
- 13 Monneret G, Venet F, Kullberg B-J, Netea MG. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol* 2011; **49**(Suppl. 1): S17-23.
- 14 Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F *et al*. Early levels in blood of immunoglobulin M and natural killer cells predict outcome in nonseptic critically ill patients. *J Crit Care* 2013; **28**: 1110.e7-e10.
- 15 Blaese RM. IgG subclass deficiency and specific antibody deficiency. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases Immune Deficiency Foundation. 51st-3rd ed. Towson MD; 2007.
- 16 Driessen G, van der Burg M. Educational paper. *Eur J Pediatr* 2011; **170**: 693-702.
- 17 Alejandria MM, Lansang MAD, Dans LF, Mantaring Iii JB. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; **9**: CD001090.
- 18 Neilson AR, Burchardi H, Schneider H. Cost-effectiveness of immunoglobulin M-enriched immunoglobulin (Pentaglobin) in the treatment of severe sepsis and septic shock. *J Crit Care* 2005; **20**: 239-49.
- 19 Norrby-Teglund A, Haque KN, Hammarström L. Intravenous polyclonal IgM-enriched immunoglobulin therapy in sepsis: a review of clinical efficacy in relation to microbiological aetiology and severity of sepsis. *J Intern Med* 2006; **260**: 509-16.
- 20 Kreymann KG, de Heer G, Nierhaus A, Kluge S. Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med* 2007; **35**: 2677-85.

Correspondence: Jesus F Bermejo-Martín, Unidad Apoyo a la Investigación. Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL/IECSYL, Spain. Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain.  
(fax: +34 983420040; e-mail: jfbermejo@saludcastillayleon.es) ■



El Presidente del Comité Organizador del XVII Congreso SEIMC, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

**HACE CONSTAR:**

Que la comunicación cuyo título y autores figuran al pie de este documento, fue presentada en el transcurso del XVII Congreso SEIMC, celebrado en Zaragoza durante los días 29-31 mayo 2013.

Zaragoza, 29/05/2013



Firmado: Dr. Francisco Javier Castillo García  
 Presidente del Comité Organizador  
 XVII Congreso SEIMC

Título	Relación entre el balance neutrófilo/monocito y la infección por SARM o SAMS asociada a ventilación mecánica
Autores	Ana Rodriguez Fernandez, David Andaluz Ojeda, Isabel Cristina Lopez Mestanza, Lisbeth Goncalves De Freitas, Gabriel A. March Rosello, Mar Justel Alvarez, Ana Avila Alonso, Eleda Coletta Griborio, Jose Maria Eiros Bouza, Raul Ortiz de Lejarazu Leonardo, Jesus F Bermejo Martin

26th **ECCMID**

Amsterdam, Netherlands  
9 – 12 April 2016

The congress of  ESCMID

This is to certify that the following abstract

“A new Immunoscore based on immunoglobulins levels influencing mortality risk in sepsis”

Ana Rodriguez Fernandez, Jesus F Bermejo-Martin, Ruben Herran-Monge,  
Arturo Muriel-Bombin, Pedro Merino, Raul Ortiz de Lejarazu, Jesus Blanco

has been accepted for presentation at the

## **27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**

in Amsterdam, Netherlands, 9 – 12 April 2016



Winfried V. Kern  
ECCMID Programme Director



Murat Akova  
ESCMID President



Mario Poljak  
ESCMID President-elect & Secretary General

ACADEMIA DE FARMACIA  
DE  
CASTILLA Y LEÓN



D<sup>a</sup> Paloma Cuanda Payá, Secretaria de la Academia de Farmacia de Castilla y León, **CERTIFICA** que D<sup>a</sup> Ana Rodríguez Fernández, D. David Andaluz Ojeda, D<sup>a</sup> Raquel Almansa, D<sup>a</sup> Mar Justel, D. José María Eiros, D. Jesús Feo Bermejo-Martín y D. Raúl Ortiz de Lejarazu, autores del trabajo "*Valor del hemograma en el seguimiento clínico del paciente con neumonía asociada a ventilación mecánica por Staphylococcus aureus*" han recibido el **Premio del Grupo LABCO** en la convocatoria 2013.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Salamanca a siete de febrero de dos mil catorce.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece leer "Paloma Cuanda Payá".

Fdo. D<sup>a</sup> Paloma Cuanda Payá  
SECRETARIA DE LA ACADEMIA DE  
FARMACIA DE CASTILLA Y LEÓN



## HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID

### PREMIOS DE INVESTIGACION BIOMEDICA

PREMIO ACCESIT AL MEJOR ARTICULO DE INVESTIGACION REALIZADO POR UN FACULTATIVO EN PERIODO DE FORMACION MIR Y PUBLICADO DURANTE EL AÑO 2012 Y 2013.

**Dña. Ana Rodríguez Fernández** "Eosinophil as a protective cell in *S. aureus* ventilador-associated pneumonia". Mediators Inflamm. 2013; 2013:152943.doi: 10.1155/2013/152943. Epub 2013 Sep3.

Valladolid a 30 de Junio de 2014

EL DIRECTOR GERENTE



Fdo.: José María Eiros Bouza









## ANEXOS

### ANEXO 1: FORMULARIO ESTANDARIZADO PARA CADA CENTRO HOSPITALARIO PARTICIPANTE.

#### DATOS DEL HOSPITAL (Una hoja por centro)

NOMBRE \_\_\_\_\_ Calle \_\_\_\_\_ CIUDAD \_\_\_\_\_ CP \_\_\_\_\_

HOSPITAL N° \_\_\_\_\_

TIPO DE HOSPITAL

Universitario	Nivel I
Asociado a la Universidad	II
Comunitario	III
Privado	

N° DE CAMAS

≤ 400      401-600      601-800      >800

N° DE UCI's (Unidades que atienden habitualmente pacientes críticos, independientemente de la composición de su personal médico y de la dependencia funcional).

	Dependencia*	N° de Camas
1	_____	_____
2	_____ _____	_____ _____
3	_____ _____ _____	_____ _____ _____
4	_____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____

\* Tipo de dependencia: Independiente, anestesia, cardiología, otros (especificar).

**ANEXO 2:** FORMULARIO ESTANDARIZADO PARA CADA UCI PARTICIPANTE.

**DATOS UCI (Una hoja por UCI)**

HOSPITAL \_\_\_\_\_ HOSPITAL N°

TIPO DE UCI (Señalar solamente uno)

Médica  Quirúrgica  Médico quirúrgica  Cirugía Cardíaca

Traumatológica  Neurológica-Neuroquirúrgica  Otro \_\_\_\_\_

N° DE CAMAS

¿INCLUYE LA UCI LA UNIDAD CORONARIA?

NO   
SI  → unidad separada? SI  → N° camas \_\_\_\_\_  
NO

**PERSONAL DE ENFERMERIA**

N° de Enfermeras (equivalentes de tiempo completo)

N° de Auxiliares de enfermería (equivalentes de tiempo completo)

**DOCENCIA**

Pregrado SI  NO

Postgrado SI  NO

Número de Residentes

Número de pacientes totales admitidos en 2010 \_\_\_\_\_

Número de pacientes totales admitidos en 2010 por cardiopatía isquémica, arritmia o bloqueo cardíaco \_\_\_\_\_

Número de pacientes totales admitidos durante el periodo de estudio \_\_\_\_\_

Número de paciente admitidos por cardiopatía isquémica, arritmia o bloqueo cardíaco durante el periodo de estudio \_\_\_\_\_

Número de pacientes totales admitidos durante el periodo de estudio < 18 años \_\_\_\_\_

**ANEXO 3:** FORMULARIO ESTANDARIZADO PARA LA RECOGIDA DE DATOS DE CADA PACIENTE INCLUIDO EN EL ESTUDIO.

**DATOS PACIENTE (una hoja por paciente)**

PACIENTE N°   INICIALES \_\_\_\_\_ N° Hª \_\_\_\_\_  
 HOSPITAL \_\_\_\_\_ HOSPITAL N°

**DATOS DEMOGRAFICOS**

Sexo M  F   
 Fecha de nacimiento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)  
 Fecha ingreso hospital \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)  
 Fecha de ingreso en UCI \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)  
 Fecha alta UCI \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)  
 Estado al alta UCI vivo  muerto   
 Fecha del alta hospitalaria \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)  
 Estado al alta hospitalaria vivo  muerto   
 Fecha de la muerte \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (dd/mm/aaaa)  
 Limitación terapéutica si  no   
 Especificar \_\_\_\_\_  
 Retirada tratamiento si  no   
 Especificar \_\_\_\_\_

**CARACTERISTICAS DEL PACIENTE**

**Categoría** (Señalar sólo una)

Médico  Cirugía urgente  Cirugía programada  Traumatológico

**Origen** (Señalar sólo uno)

Planta médica  Planta quirúrgica  Quirófano  Urgencias  Otra UCI   
 Otro

**Comorbilidades** (Señalar todas las que proceda)

SIDA  Inmunodepresión  Cáncer metastático

Insuficiencia cardiaca crónica  Insuficiencia renal crónica

Insuficiencia respiratoria crónica  Insuficiencia hepática crónica

Diabetes Mellitus Insulino Dependiente  Alcoholismo crónico

Síndrome de hipercoagulabilidad  Riesgo incrementado de sangrado

**Índice de MacCabe** (Señalar solamente uno)

0  1  2  3

**ANEXO 4:** FORMULARIO ESTANDARIZADO PARA LA RECOGIDA DE DATOS DE CADA EPISODIO DE SEPSIS GRAVE.

**DATOS DEL EPISODIO DE SEPSIS GRAVE (uno por episodio)**

PACIENTE N°   EPISODIO N°    
HOSPITAL \_\_\_\_\_ HOSPITAL N°

Fecha diagnostico sepsis severa \_\_/\_\_/\_\_(dd/mm/aaaa) Hora \_\_:\_\_(hh:mm)

**Tipo de infección (señalar solamente uno)**

- Sospechada
- Documentada clínicamente
- Clínica más prueba de imagen
- Clínica más cirugía
- Documentada microbiológicamente
- Bacilo Gram negativo  Especificar \_\_\_\_\_  
    Lugar aislamiento \_\_\_\_\_
- Cocos Gram positivos  Especificar \_\_\_\_\_  
    Lugar aislamiento \_\_\_\_\_
- Hongos  Especificar \_\_\_\_\_  
    Lugar aislamiento \_\_\_\_\_
- Otros  Especificar \_\_\_\_\_
- Tratamiento antibiótico inicial correcto si  no   
no procede  (si cultivos negativos)

**Modo de adquisición (señalar solamente uno)**

Comunitaria  Hospital  UCI

**Lugar de la infección (señalar solamente uno)**

- Pulmonar  Abdominal  Asociada a catéter
- Bacteriemia primaria  Herida quirúrgica  Sistema urinario
- Endovascular/cardiaca  Partes blandas  Hueso/articulación
- SNC  Lugares múltiples

**Diagnóstico Clínico del episodio (reseñar uno solamente)** \_\_\_\_\_

---

**Cumplimiento del Paquete de MEDIDAS DE RESUCITACIÓN** (a cumplir en las primeras 6h desde el diagnóstico de sepsis grave).

**1: Determinación de ácido láctico** Sí  No

**2: Hemocultivos previos a la administración de antibióticos** Sí  No

**3: Administración de antibióticos de amplio espectro** (en menos de 3 horas en pacientes procedentes de Urgencias y en menos de 1 hora en pacientes ingresados)

Sí  No

**4: En presencia de hipotensión:**

**a) Aporte de volumen** (20 ml/kg de cristaloides o equivalente en coloides)

Sí  No

**b) Drogas vasoactivas** (para mantener una TAM  $\geq$  65 mmHg)

Sí  No

**5: En presencia de hipotensión refractaria a volumen o lactacidemia  $>$  4 mmol/L (shock séptico):**

**a) Conseguir una Presión Venosa Central  $\geq$  8 mmHg**

Sí  No  No determinada

**b) Conseguir SvO<sub>2</sub>  $\geq$  70% (SvcO<sub>2</sub>  $\geq$  65%)**

Sí  No  No determinada

**Cumplimiento del Paquete de MEDIDAS DE TRATAMIENTO** (a cumplir en las primeras 24h desde el diagnóstico de sepsis grave).

**1: En presencia de shock séptico, hidrocortisona a dosis de 200-300 mg/d** (según protocolo de cada centro) Sí  No

**2: Considerar la administración de Drotrecogina alfa activada** (según protocolo de cada centro) Sí  No

Si se consideró su administración, ¿se realizó esta? Sí  No

**Causa de no utilización** \_\_\_\_\_

**3: Control glicémico  $<$  150 mg/dl** Sí  No

Valor de la mediana de la glucemia entre las 7 y las 24 primeras horas después de la "hora de inicio".

Excluya los valores obtenidos durante las primeras 6 horas después de la "hora de inicio". Ver herramienta de cálculo en página 30

**Mediana de la Glucemia:** \_\_\_\_\_ mg/dl o \_\_\_\_\_ mmol/L No medida

**4: Pplateau < 30 cm H<sub>2</sub>O (pacientes sometidos a ventilación mecánica) Sí  No**

Valor de la mediana de la presión plateau en las primeras 24 horas después de la "hora de inicio": *Ver herramienta de cálculo en página 30*

**Mediana de la presión plateau: \_\_\_\_\_ cm H<sub>2</sub>O**

No medida

No aplicable (paciente no sometido a ventilación mecánica)

**Procedimientos utilizados durante el episodio (señalar todos los que proceda)**

Catéter de Swan-Ganz

Ventilación mecánica no invasiva

Ventilación mecánica invasiva

Traqueotomía

Díálisis/Ultrafiltración

PICCO

PIC

Otros (especificar)

.....  
.....

Nº de concentrados de hematíes

Nº de unidades de plaquetas

Nº de unidades de plasma

**ANEXO 5: FORMULARIO ESTANDARIZADO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.****CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO****IP ESTUDIO MULTICENTRICO SOBRE EPIDEMIOLOGIA, MORTALIDAD Y FALLO ORGANICO ASOCIADO A SEPSIS GRAVE**

Estimado/a Señor/a:

Su médico le ha solicitado participar en este estudio. En cumplimiento de la Ley 41/2002 de 14 de Noviembre "Básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica" reiteramos la explicación dada verbalmente, ahora, por escrito con objeto de que nos autorice a incluirlo en el mismo. Es importante que usted conozca y entienda la finalidad y los procedimientos llevados a cabo en este estudio, lea atentamente esta información y no dude en preguntar todas aquellas cuestiones que no le queden claras. Su decisión en la participación no afectará de ninguna manera a la calidad de sus cuidados médicos futuros ni al tratamiento que pueda necesitar. Si desea participar, su médico le pedirá que confirme por escrito que ha leído y comprendido la información contenida en este documento, que todas sus dudas han quedado resueltas y que acepta que sus datos sean recogidos. Si lo desea se le entregará una copia de este documento por si quisiera volver a consultarlo. Su médico ha pensado que usted puede ser un buen candidato para participar en un estudio cuyo objetivo es profundizar en el conocimiento sobre los factores genéticos que determinan el desarrollo y gravedad de la sepsis y la lesión pulmonar aguda.

**OBJETIVO DEL ESTUDIO**

La sepsis y la lesión pulmonar aguda son complicaciones con origen fundamentalmente infeccioso que se asocian con procesos inflamatorios exacerbados en los pacientes críticamente enfermos.

El propósito del presente estudio es identificar factores de riesgo del desarrollo y gravedad de la sepsis y la lesión pulmonar aguda. Para ello estudiaremos aspectos clínicos y analíticos de gran relevancia en la enfermedad y analizaremos si guardan relación con el desarrollo y evolución de dichas complicaciones.

**RIESGOS DEL ESTUDIO**

Este NO es un estudio de investigación sobre intervención terapéutica, es decir, usted no recibirá ningún tratamiento experimental añadido al que ya se recomienda y está recibiendo según las normas internacionales. Asimismo, su participación en el estudio no modificará el resto de los cuidados y tratamientos que usted recibirá de acuerdo a su enfermedad. Así pues, la participación en este estudio no supone un riesgo añadido.

**PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

De su participación en el estudio no se derivará ningún trato diferente en lo que se refiere a la calidad de la atención que recibirá en caso de no participar en el estudio. Es usted libre de rechazar colaborar en este estudio sin que por ello se vea afectada su futura atención médica. Si decide no participar en el estudio no tendrá que ofrecer explicación alguna. En caso de aceptar ser incluido en el presente estudio, en cualquier momento podrá revocar el Consentimiento y pedir ser retirado del mismo, sin que por ello se vea afectada su futura atención médica.

#### EN QUÉ CONSISTIRÁ SU PARTICIPACIÓN

Sólo se le pedirá que autorice que se le extraiga una muestra de sangre en el momento que se le diagnostique de sepsis o lesión pulmonar aguda y en los días posteriores. El análisis de las muestras de sangre y los resultados se mantendrán en todo momento de forma anónima, dado que no influirá para nada en su tratamiento.

#### CONFIDENCIALIDAD

Sus datos serán objeto de un tratamiento confidencial, de modo que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o identificable, siendo tratados conforme a lo dispuesto por la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Todos sus datos serán estrictamente confidenciales y exclusivamente su médico conocerá su identidad. Ningún dato personal que permita su identificación será accesible a ninguna persona que no sea su médico, ni podrán ser divulgados por ningún medio, conservando en todo momento la confidencialidad médico-paciente.

#### INFORMACIÓN ADICIONAL

Antes de iniciar el estudio, todos los procedimientos y pruebas que se llevarán a cabo han sido supervisados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital. De esta forma se asegura que el estudio cumple con todos los requisitos legales, y que los objetivos y métodos empleados en el mismo son adecuados. Todos estos trámites serán llevados a cabo por los responsables del estudio.

No dude en recabar información adicional o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda, tanto al inicio del estudio como en cualquier momento a lo largo del mismo.

#### BENEFICIOS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

El análisis de las muestras de sangre para este estudio puede servir para entender mejor la evolución de las enfermedades como la sepsis y la lesión pulmonar aguda.

**El investigador principal le agradece su inestimable colaboración.**





## ***XII- Bibliografía***

---



---

**BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Trinchieri G. Cancer Immunity: Lessons From Infectious Diseases. *J Infect Dis.* 15 de julio de 2015;212(suppl 1):S67-73.
2. Mirabelli G, Cannarile F, Bruni C, Vagelli R, De Luca R, Carli L. One year in review 2015: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* junio de 2015;33(3):414-25.
3. Höftberger R. Neuroimmunology: an expanding frontier in autoimmunity. *Front Immunol.* 2015;6:206.
4. Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, Pagliuca G, et al. Goodpasture's syndrome: a clinical update. *Autoimmun Rev.* marzo de 2015;14(3):246-53.
5. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol.* 2014;5:162.
6. Crabtree GR, Gillis S, Smith KA, Munck A. Mechanisms of glucocorticoid-induced immunosuppression: inhibitory effects on expression of Fc receptors and production of T-cell growth factor. *J Steroid Biochem.* enero de 1980;12:445-9.
7. Avota E, Gassert E, Schneider-Schaulies S. Measles virus-induced immunosuppression: from effectors to mechanisms. *Med Microbiol Immunol (Berl).* agosto de 2010;199(3):227-37.
8. Sotrel A, Dal Canto MC. HIV-1 and its causal relationship to immunosuppression and nervous system disease in AIDS: a review. *Hum Pathol.* octubre de 2000;31(10):1274-98.
9. Chinen J, Shearer WT. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2010;125(2 Suppl 2):S195-203.
10. García Palomo JD, Agüero Balbín J, Parra Blanco JA, Santos Benito MF. Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado.* febrero de 2010;10(49):3251-64.
11. Centro Nacional de Epidemiología. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2012. 2014.
12. Tak W, Mak Bradley D, Jett, Mary E, Saunders. *Primer to the Immune Response.* Second. Elsevier; 2014. 702 p.
13. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.

14. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
15. Andrew O. Fontenot, Philip L. Simonian. Adaptive Immunity. En: Broaddus, V. Courtney, Mason, Robert J., editores. *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*. 5.<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 13, 206-24.
16. Lanier LL. Nk Cell Recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):225-74.
17. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* mayo de 2008;9(5):503-10.
18. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol.* 23 de abril de 2012;30(1):459-89.
19. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie.* febrero de 2008;90(2):227-42.
20. Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, Weiss J, Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2 de mayo de 2002;417(6884):91-4.
21. Soehnlein O, Lindbom L. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *J Leukoc Biol.* marzo de 2009;85(3):344-51.
22. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect Inst Pasteur.* noviembre de 2003;5(14):1299-306.
23. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 13 de mayo de 2008;112(4):935-45.
24. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 18 de septiembre de 2013;14(10):986-95.
25. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* enero de 2013;13(1):9-22.
26. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* mayo de 2008;38(5):709-50.
27. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature.* 5 de junio de 1986;321(6070):613-6.
28. Rosenberg HF. Suppression, surprise: galectin-10 and Treg cells. *Blood.* 1 de septiembre de 2007;110(5):1407-8.
29. Schwartz C, Eberle JU, Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur J Pharmacol* [Internet]. mayo de 2015 [citado 4 de agosto de 2015]; Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299915004112>

30. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. agosto de 2000;118(2):503-8.
31. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. abril de 2000;117(4):1162-72.
32. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 18 de marzo de 1993;362(6417):248-50.
33. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Innate Immunity. En: *Cellular and Molecular Immunology*. 8.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2015. p. 51-86.
34. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Innate Immunity. En: *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 4.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2014. p. 23-48.
35. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2010;125(2):S24-32.
36. Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol*. febrero de 2007;19(1):1-3.
37. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 6 de julio de 2000;343(1):37-49.
38. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2010;125(2):S33-40.
39. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet Lond Engl*. 2 de junio de 2001;357(9270):1777-89.
40. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Properties and Overview of Immune Responses. En: *Cellular and Molecular Immunology*. 8.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2015. p. 1-12.
41. Chaplin DD. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S430-5.
42. Charles A. Janeway, Travers P, Walport M, Shlomchik Mark J. *Inmunobiología. El Sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Barcelona: Masson; 2003. 731 p.
43. Regueiro JR, López Larrea C., Gonzalez Rodriguez S., Martinez Naves E. *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune*. 4.<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011.
44. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 13 de julio de 2000;343(2):108-17.
45. Goldberg MF, Saini NK, Porcelli SA. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr*. octubre de 2014;2(5).
46. Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today*. septiembre de 2000;21(9):447-55.

47. Guo H, Kumar P, Malarkannan S. Evasion of natural killer cells by influenza virus. *J Leukoc Biol.* febrero de 2011;89(2):189-94.
48. van de Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses.* septiembre de 2012;4(9):1438-76.
49. Windheim M, Hilgendorf A, Burgert HG. Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;273:29-85.
50. Kasper L, Seider K, Hube B. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Res.* agosto de 2015;15(5).
51. Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev.* octubre de 2004;201:191-205.
52. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de enero de 1991;146(1):108-13.
53. OMS. Estadísticas sanitarias mundiales 2014. OMS; 2014.
54. Jarvis WR. The United States approach to strategies in the battle against healthcare-associated infections, 2006: transitioning from benchmarking to zero tolerance and clinician accountability. *J Hosp Infect.* junio de 2007;65:3-9.
55. Ortiz Rodríguez M, Mauri Plana M, Capdevila Morell JA. Manejo general y extrahospitalario del paciente con comorbilidad y sospecha de enfermedad infecciosa. Valoración del paciente febril y comorbilidad. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado.* marzo de 2010;10(50):3373-80.
56. World Health Organisation. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 [Internet]. 2014 [citado 11 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
57. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* diciembre de 2013;13(12):1057-98.
58. Jim O'Neill. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations [Internet]. 2014. Recuperado a partir de: <http://amr-review.org>
59. ECDC-EARS-Net [Internet]. Recuperado a partir de: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/map\\_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx)
60. Kollef MH, Napolitano LM, Solomkin JS, Wunderink RG, Bae I-G, Fowler VG, et al. Health Care—Associated Infection (HAI): A Critical Appraisal of the Emerging Threat—Proceedings of the HAI Summit. *Clin Infect Dis.* 1 de octubre de 2008;47(Supplement 2):S55-99.

61. Laupland KB, Church DL. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2014;27(4):647-64.
62. Blanquer J, Solé-Violán J, Carvajal J, Lucena F. [Community infections that require admission to the ICU]. *Med Intensiva Soc Esp Med Intensiva Unidades Coronarias.* septiembre de 2010;34(6):388-96.
63. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene, European Centre for disease prevention and control. EPINE-ECCS: Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España. 2014.
64. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 19 de noviembre de 2002;137(10):791-7.
65. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de septiembre de 2005;41(6):848-54.
66. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de febrero de 2005;171(4):388-416.
67. Tice AD, Rehm SJ, Dalovisio JR, Bradley JS, Martinelli LP, Graham DR, et al. Practice guidelines for outpatient parenteral antimicrobial therapy. IDSA guidelines. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de junio de 2004;38(12):1651-72.
68. Liapikou A, Ferrer M, Polverino E, Balasso V, Esperatti M, Piñer R, et al. Severe community-acquired pneumonia: validation of the Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society guidelines to predict an intensive care unit admission. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de febrero de 2009;48(4):377-85.
69. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control.* junio de 1988;16(3):128-40.
70. Ott E, Saathoff S, Graf K, Schwab F, Chaberny IF. The prevalence of nosocomial and community acquired infections in a university hospital: an observational study. *Dtsch Ärztebl Int.* agosto de 2013;110(31-32):533-40.
71. SEMICYUC, Grupo de trabajo en enfermedades infecciosas y sepsis. ENVIN: Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva. 2014.
72. Ministerio de Sanidad y Consumo. Revisión Bibliográfica sobre Trabajos de Costes de la «No Seguridad del Paciente». 2008.
73. Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* octubre de 2014;20(10):973-80.

74. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. junio de 2008;36(5):309-32.
75. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de febrero de 2005;171(4):388-416.
76. Rewa O, Muscedere J. Ventilator-associated pneumonia: update on etiology, prevention, and management. *Curr Infect Dis Rep*. junio de 2011;13(3):287-95.
77. Moreira MR, Guimarães MP, Rodrigues AA de A, Gontijo Filho PP. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. *Rev Soc Bras Med Trop*. febrero de 2013;46(1):39-44.
78. Restrepo MI, Peterson J, Fernandez JF, Qin Z, Fisher AC, Nicholson SC. Comparison of the bacterial etiology of early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia in subjects enrolled in 2 large clinical studies. *Respir Care*. julio de 2013;58(7):1220-5.
79. Peter B. Ernst. Mucosal Immunity. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2015. p. 70-7.
80. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen F-E, Nilsen EM, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*. marzo de 1999;20(3):141-51.
81. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. abril de 2005;11(4 Suppl):S45-53.
82. Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol Pathol*. 1 de agosto de 2006;34(5):599-608.
83. Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. febrero de 2006;18(1):31-8.
84. Kabelitz D.  $\gamma\delta$  T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci CMLS*. julio de 2011;68(14):2331-3.
85. Holtmeier W, Kabelitz D. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy*. 2005;86:151-83.
86. Wunderink RG. Nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(5):440-4.
87. Leroy O, Soubrier S. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, clinical features, management, and antibiotic resistance. *Curr Opin Pulm Med*. mayo de 2004;10(3):171-5.
88. Flanders SA, Collard HR, Saint S. Nosocomial pneumonia: state of the science. *Am J Infect Control*. marzo de 2006;34(2):84-93.

89. Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG, Mehta Y, Apisarnthanarak A, Medeiros EA, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am J Infect Control*. junio de 2012;40(5):396-407.
90. Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RH, Bergmans DC, Camus C, Bauer TT, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis*. agosto de 2013;13(8):665-71.
91. Blot S, Koulenti D, Dimopoulos G, Martin C, Komnos A, Krueger WA, et al. Prevalence, Risk Factors, and Mortality for Ventilator-Associated Pneumonia in Middle-Aged, Old, and Very Old Critically Ill Patients\*: *Crit Care Med*. marzo de 2014;42(3):601-9.
92. Melsen WG, Rovers MM, Koeman M, Bonten MJM. Estimating the attributable mortality of ventilator-associated pneumonia from randomized prevention studies. *Crit Care Med*. diciembre de 2011;39(12):2736-42.
93. Yok-Ai Que, Philippe Moreillon. *Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome)*. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2015. p. 196, 2237-71.
94. Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis*. diciembre de 2007;13(12):1840-6.
95. Klein EY, Sun L, Smith DL, Laxminarayan R. The Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: A National Observational Study. *Am J Epidemiol*. 1 de abril de 2013;177(7):666-74.
96. Helen Boucher LGM. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 51(Suppl 2):S183-S197. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010;51 Suppl 2(2):S183-97.
97. Kanafani ZA, Fowler VGJ. [Staphylococcus aureus infections: new challenges from an old pathogen]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. marzo de 2006;24(3):182-93.
98. SEMICYUC. Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en servicios de medicina intensiva. 2012;
99. Khatib R, Johnson LB, Fakhri MG, Riederer K, Khosrovaneh A, Shamse Tabriz M, et al. Persistence in *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence, characteristics of patients and outcome. *Scand J Infect Dis*. 2006;38(1):7-14.
100. Hawkins C, Huang J, Jin N, Noskin GA, Zembower TR, Bolon M. Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia: an analysis of risk factors and outcomes. *Arch Intern Med*. 24 de septiembre de 2007;167(17):1861-7.

101. Cacho Calvo, J.B, Meseguer Peinado, M.A, Oliver Palomo, A, Puig de la Bellacasa, J. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior.* SEIMC; 2007.
102. Burillo A, Bouza E. Use of rapid diagnostic techniques in ICU patients with infections. *BMC Infect Dis.* 2014;14:593.
103. Guillamet CV, Kollef MH. Update on ventilator-associated pneumonia: *Curr Opin Crit Care.* octubre de 2015;21(5):430-8.
104. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* julio de 2014;20(7):O421-7.
105. Guillamet CV, Kollef MH. Ventilator associated pneumonia in the ICU: where has it gone? *Curr Opin Pulm Med.* mayo de 2015;21(3):226-31.
106. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word «sepsis». *Intensive Care Med.* diciembre de 2006;32(12):2077.
107. Majno G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis.* mayo de 1991;163(5):937-45.
108. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest.* noviembre de 2009;136(5 Suppl):e28.
109. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* abril de 2003;31(4):1250-6.
110. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* febrero de 2013;39(2):165-228.
111. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ.* 27 de octubre de 2007;335(7625):879-83.
112. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med Camb Mass.* febrero de 2008;14(1-2):64-78.
113. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 21 de noviembre de 2013;369(21):2063.

114. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med.* mayo de 2007;35(5):1284-9.
115. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief.* junio de 2011;(62):1-8.
116. Page DB, Donnelly JP, Wang HE. Community-, Healthcare-, and Hospital-Acquired Severe Sepsis Hospitalizations in the University HealthSystem Consortium: *Crit Care Med.* septiembre de 2015;43(9):1945-51.
117. Artero A, Zaragoza R, Camarena JJ, Sancho S, González R, Nogueira JM. Prognostic factors of mortality in patients with community-acquired bloodstream infection with severe sepsis and septic shock. *J Crit Care.* junio de 2010;25(2):276-81.
118. Quenot J-P, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou J-C, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care.* 2013;17(2):R65.
119. Henriksen DP, Pottegård A, Laursen CB, Jensen TG, Hallas J, Pedersen C, et al. Risk Factors for Hospitalization Due to Community-Acquired Sepsis – A Population-Based Case-Control Study. Salluh JI, editor. *PLOS ONE.* 21 de abril de 2015;10(4):e0124838.
120. Robert S. Munford, Anthony F. Suffredini. Sepsis, Severe sepsis and septic chock. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8.ª ed. Elsevier; 2015. p. 75, 914-34.
121. Heffner AC, Horton JM, Marchick MR, Jones AE. Etiology of Illness in Patients with Severe Sepsis Admitted to the Hospital from the Emergency Department. *Clin Infect Dis.* 15 de marzo de 2010;50(6):814-20.
122. Goodwin AJ, Rice DA, Simpson KN, Ford DW. Frequency, Cost, and Risk Factors of Readmissions Among Severe Sepsis Survivors\*: *Crit Care Med.* abril de 2015;43(4):738-46.
123. Zilberberg MD, Shorr AF, Micek ST, Kollef MH. Risk factors for 30-day readmission among patients with culture-positive severe sepsis and septic shock: A retrospective cohort study. *J Hosp Med.* octubre de 2015;10(10):678-85.
124. Rhodes A, Phillips G, Beale R, Cecconi M, Chiche JD, De Backer D, et al. The Surviving Sepsis Campaign bundles and outcome: results from the International Multicentre Prevalence Study on Sepsis (the IMPreSS study). *Intensive Care Med.* septiembre de 2015;41(9):1620-8.
125. Bone RC. The Pathogenesis of Sepsis. *Ann Intern Med.* 15 de septiembre de 1991;115(6):457-69.
126. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med.* 19 de diciembre de 2011;208(13):2581-90.
127. Adib-Conquy M, Cavillon J-M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* enero de 2009;101(1):36-47.

128. Ayala A, Biron B, Lomas-Neira J. Biomarkers for Sepsis: What Is and What Might Be? *Biomark Insights*. septiembre de 2015;7.
129. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, Carrasco E, Heredia M, Lajo C, et al. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur Cytokine Netw*. 1 de julio de 2011;22(2):82-7.
130. Almansa R, Wain J, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Martin-Loeches I, Ramirez P, et al. Immunological monitoring to prevent and treat sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2013;17(1):109.
131. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M, Adrie C. Altered Immune Status and Leukocytes Reprogramming. En: Cavaillon J-M, Adrie C, editores. *Sepsis and Non-Infectious Systemic Inflammation* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2008 [citado 2 de septiembre de 2015]. p. 347-71. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527626151.ch15>
132. Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to «immunoparalysis». *Chem Immunol*. 2000;74:162-77.
133. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2012;25(4):609-34.
134. Jensen JU, Heslet L, Jensen TH, Espersen K, Steffensen P, Tvede M. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med*. octubre de 2006;34(10):2596-602.
135. Ruiz Romero G, Vega García M. Biomarcadores para uso clínico. GENOMA ESPAÑA/FUAM. 2010.
136. Guidet B, Aegerter P. Índices de gravedad y aplicaciones en reanimación. *EMC - Anest-Reanim*. 2009;35(2):1-11.
137. Peres Bota D, Mélot C, Lopes Ferreira F, Vincent J-L. Infection Probability Score (IPS): A method to help assess the probability of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*. noviembre de 2003;31(11):2579-84.
138. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-Associated Pneumonia: The Clinical Pulmonary Infection Score as a Surrogate for Diagnostics and Outcome. *Clin Infect Dis*. 1 de agosto de 2010;51(Supplement 1):S131-5.
139. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. marzo de 2014;32(3):177-90.
140. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*. 30 de septiembre de 1930;52(4):561-71.

141. Sotillo-Díaz JC, Bermejo-López E, García-Olivares P, Peral-Gutiérrez JA, Sancho-González M, Guerrero-Sanz JE. Papel de la procalcitonina plasmática en el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica: revisión sistemática y metaanálisis. *Med Intensiva*. agosto de 2014;38(6):337-46.
142. Pugh R, Grant C, Cooke RP, Dempsey G. Short-course versus prolonged-course antibiotic therapy for hospital-acquired pneumonia in critically ill adults. En: The Cochrane Collaboration, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011 [citado 7 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD007577.pub2>
143. Tang H, Huang T, Jing J, Shen H, Cui W. Effect of Procalcitonin-Guided Treatment in Patients with Infections: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Infection*. diciembre de 2009;37(6):497-507.
144. Palazzo SJ, Simpson T, Schnapp L. Biomarkers for ventilator-associated pneumonia: Review of the literature. *Heart Lung J Acute Crit Care*. julio de 2011;40(4):293-8.
145. Piazza O, Wang X. A translational approach to ventilator associated pneumonia. *Clin Transl Med*. 2014;3(1):26.
146. Lin Q, Fu F, Shen L, Zhu B. Pentraxin 3 in the assessment of ventilator-associated pneumonia: an early marker of severity. *Heart Lung J Crit Care*. abril de 2013;42(2):139-45.
147. Conway Morris A, Kefala K, Wilkinson TS, Moncayo-Nieto OL, Dhaliwal K, Farrell L, et al. Diagnostic importance of pulmonary interleukin-1 and interleukin-8 in ventilator-associated pneumonia. *Thorax*. 1 de marzo de 2010;65(3):201-7.
148. Martín-Loeches I, Papiol E, Almansa R, López-Campos G, Bermejo-Martin JF, Rello J. Intubated patients developing tracheobronchitis or pneumonia have distinctive complement system gene expression signatures in the pre-infection period: A pilot study. *Med Intensiva*. mayo de 2012;36(4):257-63.
149. Xu X, Yuan B, Shi Z, Liang Q, Huang H, Yin X, et al. Identification of crucial genes in ventilator associated pneumonia through protein-protein interaction network. *Exp Lung Res*. agosto de 2015;41(6):316-23.
150. <http://lumibyte.eu/medical/sepsis-diagnosis/>.
151. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 de abril de 1993;192(2):553-60.
152. Bełtowski J, Jamroz A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol*. febrero de 2004;56(1):5-27.
153. Andaluz-Ojeda D, Cicuéndez R, Calvo D, Largo E, Nogales L, Muñoz MF, et al. Sustained value of proadrenomedullin as mortality predictor in severe sepsis. *J Infect*. julio de 2015;71(1):136-9.

154. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care Lond Engl.* 2005;9(6):R816-24.
155. Kang F, Wang R, Yu K, Wei Q. [The study on pro-adrenomedullin as a new biomarker in sepsis prognosis and risk stratification]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue Chin Crit Care Med Zhongguo Weizhongbing Jijiuyixue.* agosto de 2008;20(8):452-5.
156. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(1):R15.
157. Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandía F, et al. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine.* marzo de 2012;57(3):332-6.
158. Arabestani MR, Rastiany S, Kazemi S, Mousavi SM. Conventional, molecular methods and biomarkers molecules in detection of septicemia. *Adv Biomed Res.* 2015;4:120.
159. Ríos E. [Hemogram in infections (2)]. *Rev Chil Pediatría.* junio de 1986;57(3):287-91.
160. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol.* junio de 2014;36(3):279-88.
161. de Jager CPC, van Wijk PTL, Mathoera RB, de Jongh-Leuvenink J, van der Poll T, Wever PC. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(5):R192.
162. de Jager CPC, Wever PC, Gemen EFA, Kusters R, van Gageldonk-Lafeber AB, van der Poll T, et al. The neutrophil-lymphocyte count ratio in patients with community-acquired pneumonia. *PLoS One.* 2012;7(10):e46561.
163. Wibrow BA, Ho KM, Flexman JP, Keil AD, Kohrs DL. Eosinopenia as a diagnostic marker of bloodstream infection in hospitalised paediatric and adult patients: a case-control study. *Anaesth Intensive Care.* marzo de 2011;39(2):224-30.
164. Gil H, Magy N, Mauny F, Dupond J-L. [Value of eosinopenia in inflammatory disorders: an «old» marker revisited]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne.* julio de 2003;24(7):431-5.
165. Bermejo-Martín JF, Tamayo E, Ruiz G, Andaluz-Ojeda D, Herrán-Monge R, Muriel-Bombín A, et al. Circulating neutrophil counts and mortality in septic shock. *Crit Care Lond Engl.* 2014;18(1):407.
166. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* junio de 2008;36(5):309-32.

167. Que Y-A, Guessous I, Dupuis-Lozeron E, Alves de Oliveira CR, Ferreira Oliveir C, Graf R, et al. Prognostication of Mortality in Critically Ill Patients With Severe Infections. *Chest*. 1 de septiembre de 2015;148(3):674-82.
168. Inchai J, Pothirat C, Liwsrisakun C, Deesomchok A, Kositsakulchai W, Chalermpanchai N. Ventilator-Associated Pneumonia: Epidemiology and Prognostic Indicators of 30-Day Mortality. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(3):181-6.
169. Zhou X-Y, Ben S-Q, Chen H-L, Ni S-S. A comparison of APACHE II and CPIS scores for the prediction of 30-day mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. *Int J Infect Dis*. enero de 2015;30:144-7.
170. Giamarellos-Bourboulis EJ, Norrby-Teglund A, Mylona V, Savva A, Tsangaris I, Dimopoulou I, et al. Risk assessment in sepsis: a new prognostication rule by APACHE II score and serum soluble urokinase plasminogen activator receptor. *Crit Care*. 2012;16(4):R149.
171. Mirsaeidi M, Peyrani P, Ramirez JA, Investigators IM through PA of CT of H-AP (IMPACT-H. Predicting Mortality in Patients with Ventilator-Associated Pneumonia: The APACHE II Score versus the New IBMP-10 Score. *Clin Infect Dis*. 1 de julio de 2009;49(1):72-7.
172. Dabar G, Harmouche C, Salameh P, Jaber BL, Jamaledine G, Waked M, et al. Community- and healthcare-associated infections in critically ill patients: a multicenter cohort study. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. agosto de 2015;37:80-5.
173. Goel V, Hogade SA, Karadesai S. Ventilator associated pneumonia in a medical intensive care unit: Microbial aetiology, susceptibility patterns of isolated microorganisms and outcome. *Indian J Anaesth*. noviembre de 2012;56(6):558-62.
174. Combes A, Figliolini C, Trouillet J-L, Kassis N, Wolff M, Gibert C, et al. Incidence and outcome of polymicrobial ventilator-associated pneumonia. *Chest*. mayo de 2002;121(5):1618-23.
175. Bauer TT, Ferrer R, Angrill J, Schultze-Werninghaus G, Torres A. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, and microbiology. *Semin Respir Infect*. diciembre de 2000;15(4):272-9.
176. Scholte JBJ, van der Velde JIM, Linssen CFM, van Dessel HA, Bergmans DCJJ, Savelkoul PHM, et al. Ventilator-associated Pneumonia caused by commensal oropharyngeal a retrospective Analysis of a prospectively collected Database. *BMC Pulm Med*. 2015;15:86.
177. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*. 27 de septiembre de 1995;274(12):968-74.
178. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA*. 16 de julio de 1997;278(3):234-40.

179. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. 1 de enero de 2014;5(1):4-11.
180. Nair GB, Niederman MS. Year in review 2013: Critical Care--respiratory infections. Crit Care Lond Engl. 2014;18(5):572.
181. Désirée Boehme J, Pietkiewicz S, Lavrik I, Jeron A, Bruder D. Morphological and Functional Alterations of Alveolar Macrophages in a Murine Model of Chronic Inflammatory Lung Disease. Lung. 30 de agosto de 2015;
182. Almansa R, Sanchez-Garcia M, Herrero A, Calzada S, Roig V, Barbado J, et al. Host Response Cytokine Signatures in Viral and Nonviral Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. J Interferon Cytokine Res. mayo de 2011;31(5):409-13.
183. Rothenberg ME. Eosinophilia. N Engl J Med. 28 de mayo de 1998;338(22):1592-600.
184. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. Nat Rev Immunol. enero de 2013;13(1):9-22.
185. Felton JM, Lucas CD, Rossi AG, Dransfield I. Eosinophils in the Lung – Modulating Apoptosis and Efferocytosis in Airway Inflammation. Front Immunol [Internet]. 1 de julio de 2014 [citado 5 de octubre de 2015];5. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076794/>
186. Furuta GT, Atkins FD, Lee NA, Lee JJ. Changing roles of eosinophils in health and disease. Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol. julio de 2014;113(1):3-8.
187. Soukup JM, Becker S. Role of monocytes and eosinophils in human respiratory syncytial virus infection in vitro. Clin Immunol Orlando Fla. junio de 2003;107(3):178-85.
188. Rosenberg HF, Dyer KD, Domachowske JB. Respiratory Viruses and Eosinophils: exploring the connections. Antiviral Res. julio de 2009;83(1):1-9.
189. Su Y-C, Townsend D, Herrero LJ, Zaid A, Rolph MS, Gahan ME, et al. Dual Proinflammatory and Antiviral Properties of Pulmonary Eosinophils in Respiratory Syncytial Virus Vaccine-Enhanced Disease. J Virol. 1 de febrero de 2015;89(3):1564-78.
190. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozłowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nat Med. septiembre de 2008;14(9):949-53.
191. Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. J Allergy Clin Immunol. 9 de junio de 2015;
192. Prince LR, Graham KJ, Connolly J, Anwar S, Ridley R, Sabroe I, et al. Staphylococcus aureus induces eosinophil cell death mediated by  $\alpha$ -hemolysin. PloS One. 2012;7(2):e31506.
193. Simon, C.E. A Manual of Clinical Diagnosis. London (Kimpton); 1922. p.53 p.

194. Schilling V. The blood picture. 8.<sup>a</sup> ed. St Louis, CV: Mosby Co; 1929.
195. Morgan JE, Beeson PB. Experimental observations on the eosinopenia induced by acute infection. *Br J Exp Pathol.* abril de 1971;52(2):214-20.
196. Bass DA. Behavior of eosinophil leukocytes in acute inflammation. II. Eosinophil dynamics during acute inflammation. *J Clin Invest.* octubre de 1975;56(4):870-9.
197. López de Toro Martín Consuegra I, Sánchez Casado M, Rodríguez Villar S, Raigal Caño A, López Reina Torrijos P, Velasco Ramos A, et al. Evaluación de la eosinopenia como marcador de infección en pacientes ingresados en una Unidad de Cuidados Intensivos. *Med Intensiva.* mayo de 2010;34(4):246-53.
198. Lewis SM. Chapter 2 - Reference ranges and normal values. En: Bates SMLJB, editor. *Dacie and Lewis Practical Haematology (Tenth Edition)* [Internet]. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006 [citado 7 de octubre de 2015]. p. 11-24. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0443066604500064>
199. Holland M, Alkhalil M, Chandromouli S, Janjua A, Babores M. Eosinopenia as a marker of mortality and length of stay in patients admitted with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirol Carlton Vic.* enero de 2010;15(1):165-7.
200. Rahimi-Rad MH, Asgari B, Hosseinzadeh N, Eishi A. Eosinopenia as a Marker of Outcome in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mædica.* marzo de 2015;10(1):10-3.
201. Abidi K, Khoudri I, Belayachi J, Madani N, Zekraoui A, Zeggwagh AA, et al. Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units. *Crit Care Lond Engl.* 2008;12(2):R59.
202. Abidi K, Belayachi J, Derras Y, Khayari ME, Dendane T, Madani N, et al. Eosinopenia, an early marker of increased mortality in critically ill medical patients. *Intensive Care Med.* julio de 2011;37(7):1136-42.
203. Ho KM, Towler SC. A comparison of eosinopenia and C-reactive protein as a marker of bloodstream infections in critically ill patients: a case control study. *Anaesth Intensive Care.* mayo de 2009;37(3):450-6.
204. Shaaban H, Daniel S, Sison R, Slim J, Perez G. Eosinopenia: Is it a good marker of sepsis in comparison to procalcitonin and C-reactive protein levels for patients admitted to a critical care unit in an urban hospital? *J Crit Care.* diciembre de 2010;25(4):570-5.
205. Garnacho-Montero J, Huici-Moreno MJ, Gutiérrez-Pizarraya A, López I, Márquez-Vácaro JA, Macher H, et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2014;18(3):R116.

206. Merino CA, Martínez FT, Cardemil F, Rodríguez JR. Absolute eosinophils count as a marker of mortality in patients with severe sepsis and septic shock in an intensive care unit. *J Crit Care*. agosto de 2012;27(4):394-9.
207. Yip B, Ho KM. Eosinopenia as a predictor of unexpected re-admission and mortality after intensive care unit discharge. *Anaesth Intensive Care*. marzo de 2013;41(2):231-41.
208. Aslam A Shivani, Vinod V Prabhu, Shashikant H Kulkarni. Can Eosinopenia be used as an Indicator to Predict Mortality in Surgical Intensive Care Unit-. *Sch J Appl Med Sci*. 2015;3(3D):1320-2.
209. Terradas R, Grau S, Blanch J, Riu M, Saballs P, Castells X, et al. Eosinophil count and neutrophil-lymphocyte count ratio as prognostic markers in patients with bacteremia: a retrospective cohort study. *PloS One*. 2012;7(8):e42860.
210. Shankar-Hari M, Spencer J, Sewell WA, Rowan KM, Singer M. Bench-to-bedside review: Immunoglobulin therapy for sepsis - biological plausibility from a critical care perspective. *Crit Care Lond Engl*. 2012;16(2):206.
211. Pan Q, Hammarström L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunol Rev*. diciembre de 2000;178:99-110.
212. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med Camb Mass*. febrero de 2008;14(1-2):64-78.
213. Rose ME, Lang DM. Evaluating and managing hypogammaglobulinemia. *Cleve Clin J Med*. febrero de 2006;73(2):133-7, 140, 143-4.
214. Monneret G, Venet F, Kullberg B-J, Netea MG. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol*. abril de 2011;49 Suppl 1:S17-23.
215. Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, Nocito M, Loma AM, Nieto C, et al. Early levels in blood of immunoglobulin M and natural killer cells predict outcome in nonseptic critically ill patients. *J Crit Care*. diciembre de 2013;28(6):1110.e7-1110.e10.
216. Mohr A, Polz J, Martin EM, Grießl S, Kammler A, Pötschke C, et al. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response: Cellular immune response. *Eur J Immunol*. febrero de 2012;42(2):341-52.
217. Almansa R, Tamayo E, Heredia M, Gutierrez S, Ruiz P, Alvarez E, et al. Transcriptomic evidence of impaired immunoglobulin G production in fatal septic shock. *J Crit Care*. abril de 2014;29(2):307-9.
218. Venet F, Gebeile R, Bancel J, Guignant C, Poitevin-Later F, Malcus C, et al. Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients. *Int Immunopharmacol*. diciembre de 2011;11(12):2086-90.

219. Taccone FS, Stordeur P, De Backer D, Creteur J, Vincent J-L. Gamma-globulin levels in patients with community-acquired septic shock. *Shock Augusta Ga.* octubre de 2009;32(4):379-85.
220. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, Carrasco E, Goncalves L, Heredia M, et al. Beneficial role of endogenous immunoglobulin subclasses and isotypes in septic shock. *J Crit Care.* diciembre de 2012;27(6):616-22.
221. Blaese RM. IgG subclass deficiency and specific antibody deficiency. En: *Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases* Immune Deficiency Foundation. 51st–3rd ed. Towson MD; 2007.
222. Driessen G, van der Burg M. Educational paper: primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr.* junio de 2011;170(6):693-702.
223. Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, Almansa R, Rico L, Gandía F, et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2011;15(5):R243.
224. Myrianthefs PM, Boutzouka E, Baltopoulos GJ.  $\gamma$ -globulin levels in patients with community-acquired septic shock: *Shock.* mayo de 2010;33(5):556-7.
225. Prucha M, Zazula R, Herold I, Dostal M, Hyanek T, Bellingan G. Presence of hypogammaglobulinemia in patients with severe sepsis, septic shock, and SIRS is associated with increased mortality. *J Infect.* marzo de 2014;68(3):297-9.
226. Giamarellos-Bourboulis EJ, Apostolidou E, Lada M, Perdios I, Gatselis NK, Tsangaris I, et al. Kinetics of circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. *Crit Care Lond Engl.* 21 de octubre de 2013;17(5):R247.
227. Shankar-Hari M, Culshaw N, Post B, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Bermejo-Martín JF, et al. Endogenous IgG hypogammaglobulinaemia in critically ill adults with sepsis: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* agosto de 2015;41(8):1393-401.
228. Rimawi RH. Sepsis in an Immunocompromised Host. 2013;1-5.
229. Almansa R, Heredia-Rodríguez M, Gomez-Sanchez E, Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Rico L, et al. Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J Infect.* mayo de 2015;70(5):445-56.
230. T. Papo. Inmunoglobulinas polivalentes por vía intravenosa. En: *Tratado de Medicina.* Elsevier Masson; 2015.
231. Soares MO, Welton NJ, Harrison DA, Peura P, Shankar-Hari M, Harvey SE, et al. An evaluation of the feasibility, cost and value of information of a multicentre randomised controlled trial of intravenous immunoglobulin for sepsis (severe sepsis and septic shock): incorporating a systematic review, meta-analysis and value of information analysis. *Health Technol Assess Winch Engl.* 2012;16(7):1-186.

232. Kreymann KG, de Heer G, Nierhaus A, Kluge S. Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med.* diciembre de 2007;35(12):2677-85.
233. Neilson AR, Burchardi H, Schneider H. Cost-effectiveness of immunoglobulin M-enriched immunoglobulin (Pentaglobin) in the treatment of severe sepsis and septic shock. *J Crit Care.* septiembre de 2005;20(3):239-49.
234. Karatzas S, Boutzouka E, Venetsanou K, Myrianthefs P, Fildisis G, Baltopoulos G. The effects of IgM-enriched immunoglobulin preparations in patients with severe sepsis: another point of view. *Crit Care Lond Engl.* diciembre de 2002;6(6):543-4; author reply 545.
235. Alejandria MM, Lansang MAD, Dans LF, Mantaring JB 3rd. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;9:CD001090.
236. Almansa R, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Nogales L, Blanco J, Eiros JM, et al. The original sins of clinical trials with intravenous immunoglobulins in sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2015;19:90.
237. Pinheiro da Silva F, César Machado MC. Personalized Medicine for Sepsis. *Am J Med Sci.* 21 de septiembre de 2015;
238. Cohen J, Vincent J-L, Adhikari NKJ, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis.* mayo de 2015;15(5):581-614.
239. László I, Trásy D, Molnár Z, Fazakas J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. *J Immunol Res.* 2015;2015:1-13.
240. Berlot G, Vassallo MC, Busetto N, Bianchi M, Zornada F, Rosato I, et al. Relationship between the timing of administration of IgM and IgA enriched immunoglobulins in patients with severe sepsis and septic shock and the outcome: a retrospective analysis. *J Crit Care.* abril de 2012;27(2):167-71.
241. Wasserman M, Levinstein M, Keller E, Lee S, Yoshikawa TT. Utility of fever, white blood cells, and differential count in predicting bacterial infections in the elderly. *J Am Geriatr Soc.* junio de 1989;37(6):537-43.
242. Kaminsky P, Deibener J, Lesesve JF, Humbert JC. [Changes in hemogram parameters in infections]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne.* febrero de 2002;23(2):132-6.
243. Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis--a prospective, observational study. *BMC Immunol.* 2013;14:8.
244. Wyllie DH, Bowler ICJW, Peto TEA. Relation between lymphopenia and bacteraemia in UK adults with medical emergencies. *J Clin Pathol.* septiembre de 2004;57(9):950-5.

- 
245. Akilli NB, Yortanlı M, Mutlu H, Günaydın YK, Koylu R, Akca HS, et al. Prognostic importance of neutrophil-lymphocyte ratio in critically ill patients: short- and long-term outcomes. *Am J Emerg Med*. diciembre de 2014;32(12):1476-80.
246. Tamayo E, Almansa R, Carrasco E, Ávila-Alonso A, Rodríguez-Fernández A, Wain J, et al. Quantification of IgM molecular response by droplet digital PCR as a potential tool for the early diagnosis of sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2014;18(3):433.
247. Illerhaus G, Wirth K, Dwenger A, Waller CF, Garbe A, Brass V, et al. Treatment and prophylaxis of severe infections in neutropenic patients by granulocyte transfusions. *Ann Hematol*. mayo de 2002;81(5):273-81.
248. Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg Infect Dis*. febrero de 2007;13(2):191-8.
249. Al-Gwaiz LA, Babay HH. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent*. 2007;16(5):344-7.
250. Huang W, Yao Y, Long Q, Yang X, Sun W, Liu C, et al. Immunization against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Effectively Protects Mice in both Pneumonia and Sepsis Models. *PLoS ONE*. 23 de junio de 2014;9(6):e100727.