

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN FCER1A PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE SEPSIS EN EL PACIENTE POST-QUIRÚRGICO



Universidad de Valladolid

AUTORES:

ÁNGELA SAGREDO CUARTANGO
MARÍA LUISA TORRES TORRES

TUTOR:

RAQUEL ALMANSA MORA

GRADO EN MEDICINA 2012-2018. TRABAJO FIN DE GRADO

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	5
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	5
OBJETIVOS.....	5
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	6
SUJETOS DEL ESTUDIO.....	6
ASPECTOS ÉTICOS.....	7
ANÁLISIS MOLECULAR.....	7
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	8
5. RESULTADOS.....	9
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....	9
VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE FCER1A.....	10
REGRESIÓN LOGÍSTICA BINARIA PARA EVALUAR EL RIESGO DE SEPSIS EN EL PACIENTE POSQUIRÚRGICO.....	11
CAPACIDAD DIAGNÓSTICA FCER1A Y PCT PARA DETECTAR LOS PACIENTES CON SEPSIS.....	13
5.5 COMBINACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES SÉPTICOS.....	14
6. DISCUSIÓN.....	16
7. CONCLUSIONES.....	18
8. BIBLIOGRAFÍA.....	19
9. ANEXO.....	21

1. RESUMEN

Introducción. La sepsis supone una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta disregulada a la infección, en la que el retraso diagnóstico/terapéutico ensombrece el pronóstico. Esto obliga al desarrollo de nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz. La evaluación de los niveles de expresión génica en pacientes sépticos ha permitido identificar una lista de genes con potencial utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad, destacando el gen FCER1A (receptor del fragmento Fc de la IgE).

Material y métodos. El objetivo principal de este proyecto fue evaluar la capacidad de los niveles de FCER1A para identificar la presencia de sepsis en pacientes post-quirúrgicos, de forma aislada, y en combinación con otros biomarcadores clásicos como la procalcitonina (PCT). Para ello se realizó un estudio de cohortes observacional prospectivo, analizando 154 muestras de sangre de pacientes postquirúrgicos (101 sépticos y 53 controles). Se compararon las características clínicas, los niveles de expresión del gen FCER1A, medidos por PCR digital, y los valores séricos de PCT entre grupos.

Resultados. Los pacientes sépticos mostraron niveles de expresión de FCER1A significativamente menores respecto al grupo control. Además, los niveles de expresión de este gen correlacionaron de forma inversa con la gravedad de la enfermedad. El análisis multivariante mostró que la expresión aumentada del gen FCER1A era un factor protector (OR=0,477) para presentar infección. El análisis AUROC reveló que la combinación del FCER1A con la PCT mejoraba la capacidad de detectar sepsis de la PCT, (AUROC [IC95%], *p*) PCT/FCER1A: (0,84 [0,72-0,87] <0,001), PCT: (0,80, [0,73-0,88], < 0,001).

Conclusión. La expresión del gen FCER1 en combinación con la procalcitonina, consigue mejorar la sensibilidad de ésta sin perder especificidad para el diagnóstico de sepsis en el paciente postquirúrgico. Esto convierte al gen FCER1A en un complemento útil para el diagnóstico precoz de la sepsis.

Palabras Clave: diagnóstico, sepsis, expresión génica, FCER1A, respuesta inmune, ddPCR

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente la sepsis se define como una disfunción de órgano potencialmente mortal causada por una respuesta disregulada a la infección (1). Pese a que se han realizado grandes avances tanto científicos como clínicos en esta enfermedad, la incidencia de la sepsis y el shock séptico ha aumentado considerablemente en los últimos años. En EEUU se estima que la sepsis afecta a más de 500.000 pacientes anualmente (2). En Europa se estima una incidencia de 240 - 400 casos por 100.000 habitantes y año (3). Entre las razones responsables de esta alta prevalencia destacan el envejecimiento, la inmunosupresión, los tratamientos más agresivos, etc.

La sepsis requiere una identificación rápida y un tratamiento inmediato, pasando de esta forma a engrosar el grupo de enfermedades tiempo dependientes (como el infarto del miocardio o el trauma grave o el ictus), en las que el retraso diagnóstico/terapéutico influye negativamente en la evolución del proceso (4). Por ello, es necesario identificar biomarcadores que permitan detectar la presencia de sepsis de la manera más precoz posible. La mayor parte de los que actualmente se utilizan, reflejan la respuesta inflamatoria que sufren los pacientes a consecuencia de la infección. Sin embargo, en muchas ocasiones, estos biomarcadores no son los suficientemente sensibles o específicos, pudiendo elevarse en otros contextos o quedar enmascarados por otras condiciones (5). Así mismo, no hay que olvidar que el paciente séptico se caracteriza por presentar una respuesta inflamatoria exacerbada en paralelo a cierto grado de inmunosupresión (6). En esta línea, un abordaje poco explorado es utilizar biomarcadores que reflejen la disfunción inmunológica descrita en el paciente séptico.

Mediante un análisis de microarrays, una herramienta de análisis masivo del transcriptoma humano completo, se identificaron 2.396 genes cuyos niveles de expresión se encontraban alterados en el paciente séptico postquirúrgico, comparados con un grupo de pacientes postquirúrgicos no infectados (7). Muchos de estos genes participan en rutas de señalización implicadas en la respuesta inmunológica, destacando la depresión de genes relacionados con la inmunidad mediada por células. Entre todos éstos, el gen FCER1A (receptor

de alta afinidad del fragmento Fc de la inmunoglobulina E) fue el que mostró menores niveles de expresión en el grupo de pacientes sépticos comparado con el grupo no séptico (con un “fold change” de 6.50). Este hecho lo convierte en un potencial biomarcador para el diagnóstico temprano de sepsis.

Sin embargo, aunque los microarrays han demostrado ser una herramienta muy útil para la identificación de biomarcadores a nivel sistémico, estos ensayos presentan una serie de limitaciones que dificultan su aplicación en la práctica clínica: realizan una cuantificación semi-cuantitativa, requieren varios días para su montaje con muchos puntos críticos, y precisan un análisis bioinformático complejo. Por ello, en los últimos años, el Laboratorio de Investigación en Infección e Inmunidad del HCUV se ha especializado en el desarrollo de métodos más rápidos que permitan realizar una cuantificación exacta a tiempo real de estos potenciales biomarcadores (8,9) y que tengan una mayor traslación en la clínica. En este sentido la reacción en cadena de la polimerasa digital (PCRdd) abre un abanico de posibilidades. La PCR digital es una nueva tecnología que permite cuantificar moléculas de ADN con una elevada exactitud, sensibilidad y reproductividad, sin necesidad de generar una curva patrón (difícil de estandarizar). Esto la convierte en una tecnología superior a la PCR a tiempo real convencional y una alternativa ideal para aplicaciones clínicas basadas en PCR cuantitativa.

Este proyecto pretende desarrollar una nueva herramienta de diagnóstico precoz, rápida y exacta, de sepsis post-quirúrgica en base a la cuantificación, mediante PCR digital, de los niveles de expresión del gen FCER1A en sangre periférica.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La cuantificación de los niveles de expresión en sangre periférica del gen FCER1A permite distinguir a los pacientes sépticos post-quirúrgicos de los pacientes sometidos a una cirugía que no desarrollan una sepsis.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es cuantificar los niveles de expresión del gen FCER1A en el paciente séptico y evaluar su utilidad como biomarcador para el diagnóstico de sepsis.

Los **objetivos secundarios** son:

- Desarrollar una PCR digital para la cuantificación de los niveles de expresión génica del gen FCER1A en muestras de sangre del paciente post-quirúrgico.
- Evaluar la capacidad de los niveles de expresión de FCER1A para identificar la presencia de sepsis en el paciente post-quirúrgico.
- Estudiar la asociación de los niveles de expresión génica de FCER1A con la gravedad de la enfermedad.
- Comparar la capacidad diagnóstica de FCER1A con la capacidad diagnóstica de otros biomarcadores clásicos de sepsis.
- Combinar los niveles de expresión génica de FCER1A con la procalcitonina, uno de los biomarcadores actualmente más utilizados para el diagnóstico de sepsis.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Nuestro Trabajo de Fin de Grado se diseñó como un estudio de cohortes observacional prospectivo cuyo objetivo principal ha sido expuesto con anterioridad.

SUJETOS DEL ESTUDIO

Se utilizó una colección de 154 muestras de sangre de una cohorte ya existente de pacientes postquirúrgicos, reclutada entre abril de 2013 y enero de 2016, procedente de un proyecto financiado por el ISCIII (PI13/02110).

Los criterios de inclusión utilizados en este estudio se detallan a continuación: pacientes adultos (> 18 años) de ambos sexos sometidos a una intervención quirúrgica (cardiorácica, abdominal, neurocirugía, vascular, renal/urológica).

Los grupos comparados en este estudio fueron los siguientes:

- Controles post-quirúrgicos: en el estudio se incluyeron 53 pacientes post-quirúrgicos que no presentaron signos de infección en ningún momento del post-operatorio y cuyos cultivos microbianos de rutina resultaron negativos hasta el alta, excluyendo el resto.
- Pacientes sépticos: Se incluyeron en este grupo 101 pacientes que cumplieron los criterios de sepsis según la definición propuesta por la American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, en todos sus grados (sepsis, sepsis grave y shock séptico). Estos pacientes fueron reclutados en el momento que apareció la sospecha de infección, ya fuese en la REA o en la planta de cirugía.
- Controles sanos: 16 voluntarios de ambos sexos, de edad similar a los casos, sin antecedentes clínicos relevantes, incluidos inmunosupresión, cáncer, signos de infección aguda o crónica, reclutados en el Centro de Transfusiones y Hemoterapia de Castilla y León.

Entre los datos clínicos asociados a cada muestra se encuentra información referente a sus antecedentes personales, motivo de la cirugía, exploración física diaria, datos hematológicos, bioquímicos, y foco/s de la infección. La severidad de la enfermedad se asignó utilizando el SOFA score.

Se utilizó como biomarcador de referencia para el diagnóstico de sepsis la Procalcitonina (PCT) medida en plasma mediante electroquimioluminiscencia (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Meylan, France). El límite de detección para la misma fue 0,2 ng/ml.

ASPECTOS ÉTICOS

Este Trabajo de Fin de Grado ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del área de salud este de Valladolid con código PI 17- 871 (*Ver Anexo. Documento 1 y 2*). Todas las muestras de sangre que se usaron en este proyecto proceden de pacientes que firmaron el consentimiento informado (CI). Los datos clínicos asociados a cada muestra han sido anonimizados y se encuentran en una base de datos creada en el servidor del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

ANÁLISIS MOLECULAR

Extracción y control de calidad del ARNm

Las muestras de sangre venosa fueron tomadas en las primeras 24 horas del diagnóstico de sepsis o en las primeras 24 horas del ingreso del paciente control postquirúrgico. Se recogieron en un tubo especial que preserva el ARNm utilizando el kit PaxGene Blood RNA System (PreAnalytix), y se almacenaron en el Laboratorio de Investigación en Infección e Inmunidad del HCUV a -80°C hasta su análisis. La concentración y pureza del ARNm total obtenido se analizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 y su integridad se evaluó mediante un Bioanalizador Experion de Biorad.

Cuantificación de ARNm del gen FCER1A

La cuantificación de los niveles de expresión del gen FCER1A se llevó a cabo mediante la plataforma de PCR digital QX200 de Biorad, siguiendo el protocolo del Laboratorio de Investigación en Infección e Inmunidad de

HCUV(9). El mismo se basa en la cuantificación de copias de ARNm de cada gen de interés, partiendo de una cantidad fija de ARN calculada en base a los datos del nanodrop (*Ver Anexo. Ilustración 1*). Por lo tanto, la ddPCR permite obtener copias de ARNm del gen de interés por ng ARN total.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos generados en la cuantificación de transcritos de FCER1A así como la información clínica asociada a cada paciente, se sometieron a varios tipos de análisis estadísticos utilizando el programa SPSS.

Para el análisis descriptivo de la información clínica de la cohorte analizada, se utilizó el Test X^2 para las variables categóricas y el Test U de Mann Whitney para las variables continuas. Las diferencias en la expresión génica se analizaron también con el Test U de Mann Whitney. La correlación entre la gravedad en base al SOFA score y los niveles de expresión génica del FCER1A se calculó con el Test de Spearman.

La asociación entre las variables de nuestro estudio y la presencia/ ausencia de sepsis, independientemente de la expresión del gen FCER1A, fue analizada mediante una regresión logística multivariante ajustada por factores de confusión. Las variables que se incluyeron fueron aquellas con p valor $< 0,1$ en el análisis de regresión univariante. El mismo análisis mutivariante se realizó también para la PCT.

Para la evaluación de la capacidad diagnóstica de sepsis del gen FCER1A se calculó el Área Bajo la Curva ROC (AUROC) y el punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad máxima conjunta, esto es, el OOP (del inglés, Optimal Operating Point). Se consideró como valor del OOP el punto en la curva más cercano al ángulo superior izquierdo, (donde la $S = 1$ y la $E = 1$). Para calcular ese punto, utilizamos el teorema de Pitágoras:

$$\sqrt{\quad}$$

En base a tener como referencia un biomarcador cuya capacidad diagnóstica de sepsis ya fuera conocida, el OOP y el AUROC de la PCT también fueron calculados.

Con el objetivo de comprobar si la combinación de ambos biomarcadores (FCER1A y PCT) mejoraba la capacidad diagnóstica de la PCT, se calculó el AUROC del Ratio PCT/FCER1A y el Test deLong. Las variables categóricas clasificadas en función del OOP del ratio PCT/FCER1A, fueron sometidas posteriormente a un análisis multivariante.

5. RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Los pacientes sépticos y los controles quirúrgicos fueron comparados en función de sus características clínicas. En ambos grupos, predominaron los pacientes mayores de 60 años, siendo la edad significativamente mayor en los sépticos. El perfil de comorbilidades fue similar entre los casos sépticos y los controles quirúrgicos, no obstante, en los primeros se observó una mayor prevalencia de insuficiencia renal crónica. Los pacientes sépticos necesitaron cirugía urgente en casi 2/3 de los casos, mientras que en los controles quirúrgicos predominó la cirugía programada. La cirugía abdominal fue más prevalente en el grupo de los pacientes sépticos, sin embargo la urológica predominó en los controles quirúrgicos. En cuanto a la evolución de los pacientes, la cohorte séptica presentó mayor grado de fallo orgánico, evidenciable por una mayor puntuación en la escala SOFA. A su vez, la estancia hospitalaria/UCI también fue mayor en dicho grupo. Ninguno de los pacientes de la cohorte quirúrgica falleció, pero un 25% de los pacientes sépticos lo hizo de manera intrahospitalaria. Señalar por último, que los pacientes sépticos mostraron niveles más altos de PCR y PCT, y mayor recuento sanguíneo de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

En cuanto al origen de infección, el foco más prevalente fue el abdominal seguido del foco respiratorio. Aproximadamente el 84,2% de los pacientes sépticos (n=85) mostraron al menos una identificación positiva en los test microbiológicos. Como se muestra en la Tabla 1, las bacterias que se aislaron con mayor frecuencia fueron Gram⁻, seguidas de Gram⁺ y cultivos polimicrobianos.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes

		PACIENTES SEPSIS (n=101)	CONTROLES QUIRÚRGICOS (N=53)	P	
Características	Edad (mediana, IQR)	72,0 (15,0)	64,0 (18,0)	0,006	
	Varones	65,3 (66)	71,7 (38)	N.S	
Comorbilidades, % (n)	Presión sanguínea	55,4(56)	60,0 (30)	N.S	
	Enfermedad crónica cardiovascular	47,5(48)	34,0 (18)	N.S	
	Enfermedad pulmonar crónica	14,8 (15)	21,1(11)	N.S	
	Fallo hepático crónico	3,0(3)	5,8 (3)	N.S	
	Enfermedad renal crónica	14,9(15)	2,0 (1)	0,012	
	Enfermedad neurológica	5,0(5)	3,7 (2)	N.S	
	Enfermedad cerebro vascular	4,0(4)	5,6 (3)	N.S	
	Diabetes Mellitus	33,6 (34)	18,9 (10)	0,053	
	Cáncer	29,7(30)	45,3 (24)	0,054	
	Inmunosupresión	18,0(17)	13,9 (5)	N.S	
	Origen cirugía, % (n)	Cirugía Urgente	63,4(64)	3,8 (2)	<0,001
		Cardiorotáca	30,0 (30)	39,6 (21)	N.S
		Digestiva	62,0 (62)	43,4(23)	0,033
Neurocirugía		1,0 (1)	1,9(1)	N.S	
Vascular		3,0 (3)	3,7(2)	N.S	
Urológica/renal		1,0 (1)	9,4(5)	0,011	
Otras		4,0 (4)	1,9(1)	N.S	
Evolución y desenlace		Estancia media hospitalaria (mediana, IQR)	26,5(23,5)	10,0(7,0)	< 0,001
	Estancia media UCI (mediana, IQR)	14,0 (17,0)	4,0 (3,0)	<0,001	
	SIRS,%(n)	100,0 (101)	56,6(30)	<0,001	
	Shock séptico,%(n)	61,4(62)	N.A	N.A	
	Fallecidos antes del día 28,%(n)	19,8 (20)	0	<0,001	
Origen infección, % (n)	Mortalidad hospitalaria,%(n)	24,7 (25)	0	<0,001	
	Desconocida	14,8 (15)	N.A	N.A	
	Tracto respiratorio	18,8 (19)	N.A	N.A	
	Abdomen	45,5 (46)	N.A	N.A	
	Tracto urinario	4,9 (5)	N.A	N.A	
	Lecho quirúrgico	5,9 (6)	N.A	N.A	
	Bacteriemia/catéter	4,9 (5)	N.A	N.A	
	Otros	4,9 (5)	N.A	N.A	
	Microbiología, % (n)	Gram+	46,5 (47)	N.A	N.A
		Gram-	60,4 (61)	N.A	N.A
Hongos		9,9 (10)	N.A	N.A	
Virus		2,0 (2)	N.A	N.A	
Polimicrobiana		44,6 (45)	N.A	N.A	
Parámetros al diagnóstico (mediana, IQR)		SOFA score	8 (6)	1 (3)	<0,001
	Bilirrubina total (mg/dl)	0,7(1,3)	0,8(0,5)	N.S	
	Glucosa (mg/dl)	152,0 (78,0)	135,0 (55,0)	N.S	
	Recuento plaquetario (cél/mm3)	180.000,0 (194,7)	155.000,0 (740.000,0)	N.S	
	INR	1,3 (0,4)	1,23 (0,4)	N.S	
	ScvO2 (%)	73,1 (19,0)	68,8(80,0)	N.S	
	PCR (mg/dl)	232,3 (169,2)	57,7 (77,7)	<0,001	
	Procalcitonina (ng/dl)	5,6 (17,5)	0,5 (0,9)	<0,001	
	Glóbulos blancos (cél/mm3)	14.465,0 (10.257,5)	12.290,0(4.875,0)	0,023	
	Linfocitos (cél/mm3)	944,3(818,6)	1.008,0 (894,3)	N.S	
	Monocitos (cél/mm3)	1.068,5 (51.887,6)	781,9 (1.327,8)	N.S	
	Neutrófilos (cél/mm3)	12.337,0 (9.220,5)	10.016,0(4.704,5)	0,017	
	Eosinófilos (cél/mm3)	49,9 (2.052,6)	12,3(70,5)	0,019	
	Basófilos (cél/mm3)	78,4 (1.593,2)	28,8 (68,9)	0,006	

Las variables continuas están representadas con la mediana y el rango intercuartílico (IQR); Las variables categóricas están representadas como (%.n). UCI indica Unidad de cuidados intensivos; INR, International Normalized Ratio; N.A, no aplicable; N.S, no significativo; ScvO2, saturación venosa central; SIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE FCER1A

Los niveles de expresión génica del FCER1A en los grupos de pacientes del estudio fueron distintos. Como muestra el gráfico (Figura 1), la mediana de

expresión del gen FCER1A en los controles sanos fue de 265,0 copias/ng ARN (IQR=251,4); en los controles quirúrgicos fue de 47.8 copias/ng ARN (IQR=80.9), y la expresión del mismo en pacientes sépticos fue de 15.2 copias/ng ARN (IQR=29.8).

Por tanto, se pudo objetivar que la expresión del gen FCER1A estaba disminuida de forma significativa en los pacientes sépticos con respecto a los otros grupos.

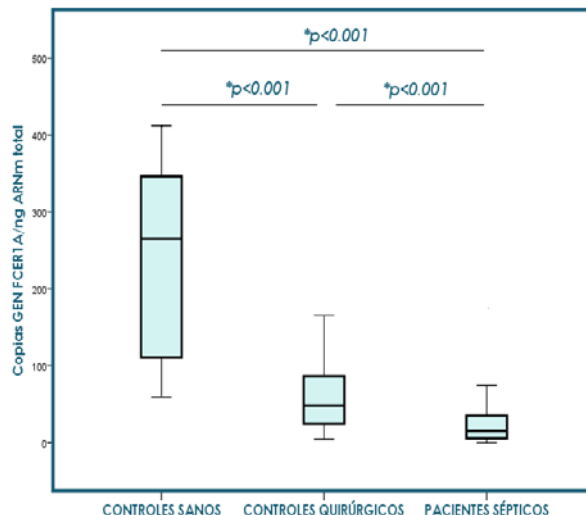


Figura 1. Diagrama de cajas que muestra los niveles de expresión génica del FCER1A en los distintos grupos de

Cuando se evaluó la relación existente entre los valores de expresión del gen FCER1A y la gravedad de la enfermedad, medida en base al score de progresión de fallo de órgano, SOFA, el test de Spearman evidenció una relación inversa ($r = - 0,321$) entre la expresión del gen FCER1A y el SOFA score ($p=0,001$).

REGRESIÓN LOGÍSTICA BINARIA PARA EVALUAR EL RIESGO DE SEPSIS EN EL PACIENTE POSQUIRÚRGICO

Análisis univariante

Con el fin de estudiar si la asociación existente entre los biomarcadores a estudio (FCER1A y PCT) y la presencia de sepsis era independiente de las comorbilidades, factores clínicos y demográficos de los pacientes, se realizó un análisis multivariante. Para ello, primero se identificaron aquellas variables asociadas con la presencia de sepsis ($p < 0.1$) que pudieran actuar como factores de confusión. Como se muestra en la Tabla 2, dichas variables de ajuste fueron: edad, enfermedad renal crónica, diabetes mellitus, cáncer, cirugía urgente, SOFA score al diagnóstico y PCR.

El análisis univariante mostró una clara asociación entre niveles bajos de expresión del gen FCER1A y la probabilidad de presentar una sepsis (OR = 0,4). A su vez, también se evidenció la asociación entre niveles altos de PCT sérica y la probabilidad de presentar una sepsis (OR= 1,03).

Tabla 2. Análisis univariante. Variables de ajuste		EXP (B) =OR	IC 95%		P
Biomarcadores	FCER1A	0,40	0,28	0,58	< 0,001
	PCT	1,03	1,005	1,056	0,02
Características	Edad (mediana, IQR)	1,03	1,00	1,06	0,023
	Enfermedad renal crónica	9,07	1,16	70,69	0,035
Comorbilidades,% (n)	Diabetes Mellitus	2,18	0,98	4,87	0,057
	Cáncer	0,51	0,26	1,02	0,056
Origen cirugía	Cirugía Urgente	43,24	9,94	188,11	< 0,001
Parámetros al diagnóstico	SOFA score al diagnóstico	1,72	1,44	2,06	< 0,001
	PCR (mg/dl)	1,01	1,00	1,01	< 0,001

OR indica odds ratio, PCT procalcitonina, IC Intervalo de confianza, P valor de significación

Análisis multivariante para FCER1A

El análisis multivariante evidenció que el aumento de expresión del gen FCER1A es un factor protector (OR=0,48) para el hecho de tener infección, independientemente del resto de variables de ajuste, de forma estadísticamente significativa ($p = 0,035$). Del mismo modo, las variables Cirugía Urgente, SOFA score, PCR son factores de riesgo, independientemente del resto de variables de ajuste, de forma estadísticamente significativa, tal y como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis multivariante GEN FCR1A		EXP (B) =OR	IC 95%		P
Biomarcador	FCER1A	0,48	0,24	0,95	0,035
Características	Edad (mediana, IQR)	1,01	0,95	1,07	0,865
	Enfermedad renal crónica	3,14	0,20	50,29	0,419
Comorbilidades,% (n)	Diabetes Mellitus	3,15	0,86	11,54	0,083
	Cáncer	1,77	0,47	6,60	0,398
Origen cirugía	Cirugía Urgente	32,90	5,21	207,67	<0,001
Parámetros al diagnóstico	SOFA score al diagnóstico	1,65	1,28	2,13	<0,001
	PCR (mg/dl)	1,003	1,001	1,006	0,018

OR indica odds ratio, PCT procalcitonina, IC Intervalo de confianza, P valor de significación

Análisis multivariante para PCT

El aumento de PCT es un factor de riesgo (OR=1,55) para el hecho de tener infección, independientemente del resto de variables, de forma estadísticamente significativa ($p = 0,022$). Como se muestra en la Tabla 4, las variables de ajuste se comportan de la misma manera que las del modelo anteriormente citado.

Tabla 4. Análisis multivariante PCT		EXP (B) =OR	IC 95%		P
Biomarcador	PCT	1,55	1,07	2,26	0,022
Características	Edad (mediana, IQR)	1,01	0,95	1,07	0,789
Comorbilidades,% (n)	Enfermedad renal crónica	3,39	0,21	55,94	0,394
	Diabetes Mellitus	3,43	0,91	12,99	0,070
	Cáncer	1,02	0,27	3,84	0,972
Origen cirugía	Cirugía Urgente	37,82	6,18	231,51	<0,001
Parámetros al diagnóstico	SOFA score al diagnóstico	1,56	1,23	1,98	<0,001
	PCR (mg/dl)	1,003	1,00	1,01	0,003

OR indica odds ratio, PCT procalcitonina, IC Intervalo de confianza, P valor de significación

CAPACIDAD DIAGNÓSTICA FCER1A Y PCT PARA DETECTAR LOS PACIENTES CON SEPSIS

El análisis AUROC para el gen FCER1A, reflejado en la Figura 2, muestra un área bajo la curva de 0,76, lo que significa que existe 76% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un paciente séptico utilizando este marcador, sea más acertado que el de un paciente post-quirúrgico no séptico. El mejor punto de corte para utilizar la expresión del gen FCER1A con valor diagnóstico es 28,9 copias (OOP). Una expresión menor de tal valor, puede ser diagnóstico de sepsis con una S= 67,9% y una E =69%.

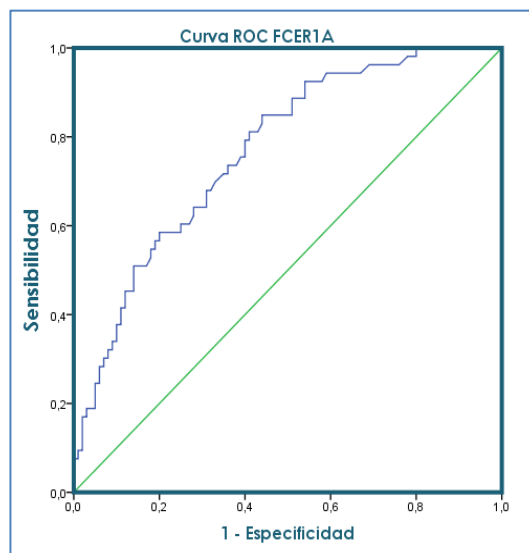


Figura 2. Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad en cada punto, acorde con los niveles de expresión del FCER1A para el diagnóstico de sepsis.

El análisis AUROC para la procalcitonina, reflejado en la Figura 3, muestra un área bajo la curva de 0,8, lo que significa que existe 80% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un paciente séptico utilizando este marcador, sea más acertado que el de un paciente post-quirúrgico no séptico. El mejor punto de corte para utilizar la PCT con valor diagnóstico es 1,115 mg/dl (OOP). Un valor por encima de ese punto de corte, puede utilizarse para el diagnóstico de sepsis con una S = 73,3% y una E = 75,5%.

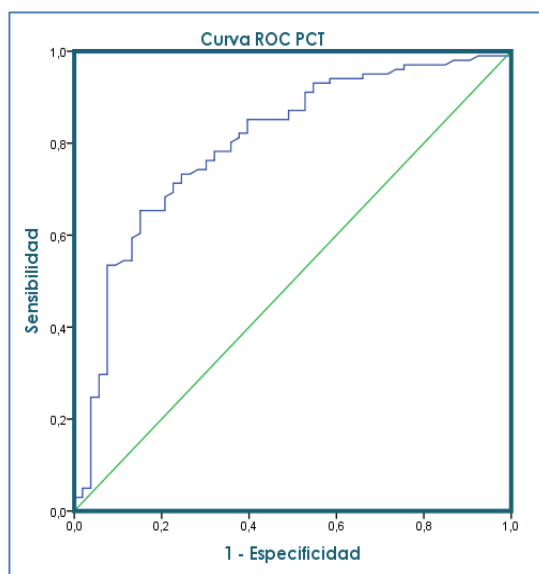


Figura 3. Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad en cada punto, acorde con los niveles de expresión de PCT para el diagnóstico de sepsis.

COMBINACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES SÉPTICOS

Una vez analizada la capacidad diagnóstica de ambos biomarcadores por separado, se calculó la potencia diagnóstica de los mismos en combinación. Como se muestra en la Tabla 5, el área bajo la curva ROC del Ratio PCT/FCER1A fue de 0,84, lo que supone una mejora respecto al biomarcador de referencia. Posteriormente, se calculó su OPP (0,0424). Este punto de corte mejoraba la sensibilidad de la PCT manteniendo la misma especificidad.

Tabla 5. AUROC para distinguir pacientes sépticos de controles quirúrgicos.

	AREA	IC 95%	p	OOP	S (%)	E (%)
FCER1A	0,76	0,69	0,84	<0,001	28,900	67,9
PCT	0,80	0,73	0,88	<0,001	1,115	73,3
PCT/FCER1A	0,84	0,72	0,87	<0,001	0,0424	77,3

IC indica Intervalo de confianza, P valor de significación, OPP optimal operating point, PCT procalcitonina, S sensibilidad, E especificidad

Las AUROC de la PCT y el Ratio PCT/FCER1A para diferenciar los pacientes sépticos de los controles quirúrgicos se muestran en la Figura 3.

El AUROC para Ratio PCT/FCER1A mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto al AUROC de la PCT según el Test de DeLong ($p= 0,05$).

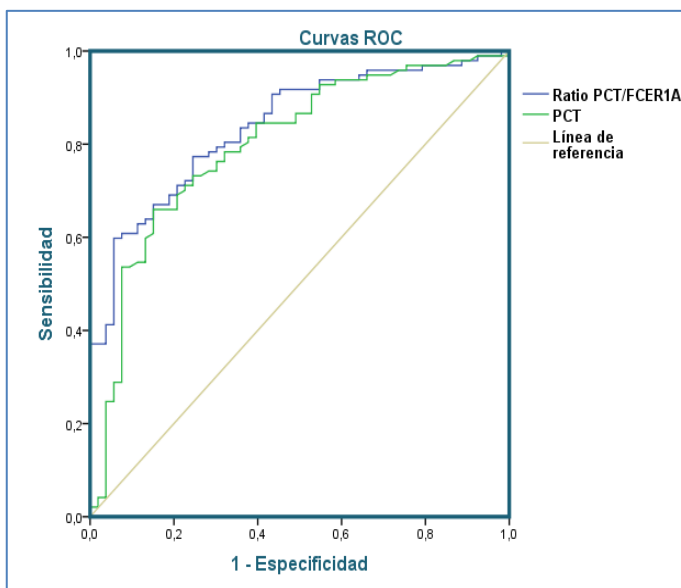


Figura 3. Curva ROC que muestra la sensibilidad y especificidad en cada punto para el diagnóstico de sepsis. En azul se muestra el ratio PCT/FCER1A. En verde la PCT. En gris, la línea de referencia.

Dividiendo a los pacientes en dos grupos en función del OOP para el Ratio PCT/FCER1A y del OOP para la PCT, se realizó un análisis multivariante. Las variables de ajustes para ambos fueron: edad, cirugía urgente, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus, cáncer, Proteína C reactiva y SOFA score. Como se muestra en la Tabla 6, este análisis reveló que los valores mayores del OOP del Ratio PCT/FCER1A identifican la presencia de sepsis con mayor probabilidad (OR= 4,804) que los pacientes que muestran valores de PCT séricos mayores de su respectivo OOP (OR=4,480).

Tabla 6. Análisis multivariante para el OOP

	OR	IC 95%		p
PCT/FCER1A	4,804	1,275	18,132	0,02
PCT	4,480	1,229	16,331	0,023

OR indica odds ratio, IC Intervalo de confianza, P valor de significación

6. DISCUSIÓN

En base a las nuevas definiciones, la sepsis es una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta disregulada a la infección (1). Se trata de una enfermedad tiempo dependiente, puesto que el momento e idoneidad del tratamiento pueden ser clave para el pronóstico del paciente (4). En el caso de los pacientes postquirúrgicos, la identificación y el control del foco de infección, así como la rápida instauración del tratamiento antibiótico adecuado, son pasos críticos para la supervivencia de los mismos. Todo esto pone de manifiesto la importancia de identificar biomarcadores de diagnóstico precoz de sepsis en el paciente postquirúrgico.

Como ya se ha mencionado, la sepsis se caracteriza por la existencia de una respuesta inmunológica disregulada, definida por la presencia simultánea de inflamación exacerbada e inmunosupresión (6). La gran mayoría de los biomarcadores utilizados en el diagnóstico de sepsis se han centrado en la respuesta inflamatoria del paciente a la infección. Es el caso de la procalcitonina (PCT), uno de los marcadores bioquímicos clásicamente más empleados. Como era esperable, en la cohorte de pacientes utilizada en este proyecto, los valores sistémicos de PCT permitían detectar con una buena sensibilidad y especificidad la presencia de sepsis, validando los resultados publicados en muchas otras cohortes. Sin embargo, este biomarcador no está exento de críticas, puesto que se eleva inespecíficamente en otros contextos clínicos (10,11).

Dado que el uso de biomarcadores que reflejan el estado de inmunosupresión no ha sido suficientemente estudiado, el objetivo principal de este proyecto fue explorar la utilización de los mismos en el diagnóstico de sepsis en el paciente postquirúrgico. Dentro de los genes que participan en la sinapsis inmunológica, y cuya expresión deprimida se ha relacionado con la presencia de sepsis, destaca el gen FCER1A (7). Los pacientes sépticos analizados en este proyecto, mostraron niveles de expresión de este gen significativamente menores en comparación con los controles no infectados. El gen FCER1A codifica el receptor alfa de alta afinidad del fragmento Fc de la inmunoglobulina E. Se expresa constitutivamente en mastocitos y basófilos y

juega un papel importante en la liberación extracelular de diversos mediadores inflamatorios, tales como la histamina, en procesos alérgicos (12,13). El gen FCER1A también se expresa en células dendríticas y monocitos, siendo ambas células presentadoras de antígeno (14). Estas células fagocitan antígenos, los procesan y los presentan a las células T específicas a través del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA). Este proceso es un paso clave para desarrollar una respuesta inmune adaptativa homeostática a la infección. La depresión de la expresión de éste gen podría reflejar un defecto a la hora de desarrollar una respuesta adaptativa efectiva a nivel sistémico. Sin embargo, dada la naturaleza descriptiva de este proyecto, se necesitan estudios funcionales que, mediante modelos celulares o animales, exploren el papel que juega este receptor en la fisiopatología de la sepsis.

No obstante, los resultados obtenidos en el análisis de regresión evidenciaron que los niveles de expresión de FCER1A mostraron una fuerte asociación con la presencia de sepsis, independientemente de la gravedad, la presencia de otras comorbilidades y del estado basal inflamatorio del paciente, medido por los niveles séricos de la proteína C reactiva. Por otro lado, analizando la capacidad diagnóstica del gen FCER1A, se obtuvo una sensibilidad de 67,9% y una especificidad de 69%, con un área bajo la curva ROC de 0,76 para detectar la presencia de sepsis. Dichos resultados, por sí solos, no evidencian la superioridad del biomarcador FCER1A frente a la PCT. Sin embargo, al combinar ambos biomarcadores, el ratio PCT/FCER1A mostró una mejor precisión para diferenciar entre pacientes sépticos y no sépticos, (AUROC: 0,84; IC: 0,72-0,87; $p < 0,001$) mejorando la sensibilidad de la PCT sin perder especificidad. Además, el análisis de regresión también reflejó que el ratio PCT/FCER1A mostraba una asociación más fuerte con la presencia de sepsis que la que presentaba la PCT.

En conclusión, los resultados obtenidos en este proyecto demuestran como la combinación de la cuantificación de PCT, un péptido que refleja la respuesta pro-inflamatoria del huésped a la infección, con la de FCER1A, un transcrito que refleja la supresión inmunológica que ocurre en la sepsis, es una

buenas estrategias para aumentar las posibilidades de detectar esta enfermedad en pacientes quirúrgicos.

La cuantificación de PCT se implementa ampliamente en entornos clínicos medianos y grandes, en menos de 30 minutos. A su vez, la PCR digital, es una tecnología emergente y altamente reproducible, que permite la cuantificación absoluta de la expresión génica en menos de 4 horas, posibilitando la aplicación del análisis transcriptómico a la práctica clínica (15). Existen, además del gen FCER1A, otros genes candidatos con potencial valor diagnóstico (7). Se deben realizar, por tanto, nuevos estudios que exploren si la combinación de éstos con la PCT y el gen FCER1A, se podría traducir en una mayor precisión diagnóstica de sepsis en el paciente postquirúrgico.

7. CONCLUSIONES

- Los pacientes sépticos post-quirúrgicos presentan niveles de expresión del gen FCER1A significativamente menores que los controles post-quirúrgicos no infectados.
- Existe una asociación inversa entre los niveles de expresión del gen FCER1A y el grado de fallo de órgano, medido por el score SOFA.
- La asociación entre los niveles de expresión del gen FCER1A y la presencia de sepsis es independiente de la gravedad, la presencia de otras comorbilidades y del estado basal inflamatorio del paciente.
- La capacidad diagnóstica del gen FCER1A se aproxima a la de otros biomarcadores clásicos de sepsis, como la Procalcitonina (PCT).
- Niveles sistémicos de expresión del gen FCER1A por debajo de 28,9 copias/ng ARNm total muestran un buen balance entre sensibilidad y especificidad. Éste podría ser un punto de corte útil para el diagnóstico temprano de sepsis en el paciente post-quirúrgico.
- La combinación de la expresión del gen FCER1A y los valores séricos de PCT mejora la sensibilidad de ésta sin perder especificidad para el diagnóstico de sepsis.

- La combinación de marcadores de respuesta pro-inflamatoria del huésped a la infección, con marcadores que reflejan la supresión inmunológica que caracteriza la sepsis, parece ser una buena estrategia para aumentar la precisión de detectar esta enfermedad en pacientes quirúrgicos.

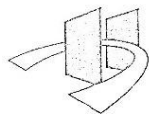
8. BIBLIOGRAFÍA

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 23 de febrero de 2016;315(8):801-10.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care: Crit Care Med. julio de 2001;29(7):1303-10.
3. 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.
4. Martin-Loeches I, Levy MM, Artigas A. Management of severe sepsis: advances, challenges, and current status. Drug Des Devel Ther. 2015;9:2079-88.
5. Moore LJ, Moore FA. Early diagnosis and evidence-based care of surgical sepsis. J Intensive Care Med. abril de 2013;28(2):107-17.
6. Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Gandía F, Gómez-Herreras JI, Gomez-Sanchez E, et al. Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. J Infect. mayo de 2016;72(5):525-36.
7. 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.

8. 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.
9. Almansa R, Ortega A, Ávila-alonso A, Heredia-rodríguez M, Martín S, Benavides D, et al. Quantification of Immune Dysregulation by Next-generation Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients. *Ann Surg* [Internet]. 7 de julio de 2017 [citado 20 de marzo de 2018];
10. Ruiz-Alvarez MJ, García-Valdecasas S, De Pablo R, Sanchez García M, Coca C, Groeneveld TW, et al. Diagnostic efficacy and prognostic value of serum procalcitonin concentration in patients with suspected sepsis. *J Intensive Care Med*. febrero de 2009;24(1):63-71.
11. Tang BMP, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. marzo de 2007;7(3):210-7.
12. Greer AM, Wu N, Putnam AL, Woodruff PG, Wolters P, Kinet J-P, et al. Serum IgE clearance is facilitated by human FcεRI internalization. *J Clin Invest*. marzo de 2014;124(3):1187-98.
13. Korosec P, Turner PJ, Silar M, Kopac P, Kosnik M, Gibbs BF, et al. Basophils, high-affinity IgE receptors, and CCL2 in human anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. septiembre de 2017;140(3):750-758.e15.
14. Shin J-S, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci CMLS*. junio de 2015;72(12):2349-60.
15. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. octubre de 2013;10(10):1003-5.

9. ANEXO

Documento 1. Informe de aprobación del CEIC/ CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID-ESTE



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE (CEIC-VA-ESTE-HCUV)

Valladolid a 21 de Diciembre de 2017

En la reunión del CEIC/CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE del 21 de diciembre de 2017, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

PI 17-871 TFG	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE FCER1A PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE SEPSIS EN EL PACIENTES POST-QUIRÚRGICO	I.P.: RAQUEL ALMANSA EQUIPO: M ^a LUISA TORRES, ÁNGELA SAGREDO. LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN INFECCIÓN E INMUNIDAD DEL HCUV RECIBIDO: 14-12-2017
------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

A continuación les señalo los acuerdos tomados por el CEIC/CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE en relación a dicho Proyecto de Investigación:

Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** y la **aceptación** del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud Valladolid Este para que sea llevado a efecto dicho Proyecto de Investigación.

Un cordial saludo.

Dr. F. Javier Álvarez
CEIC/CEIm Área de Salud Valladolid Este
Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Farmacología, Facultad de Medicina,
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7, 47005 Valladolid
alvarez@med.uva.es,
jalvarezgo@saludcastillayleon.es
tel.: 983 423077



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL GEN FCER1A PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE SEPSIS EN EL PACIENTE POST-QUIRÚRGICO.

Documento 2. *Informe de aprobación del CEIC/ CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID-ESTE*

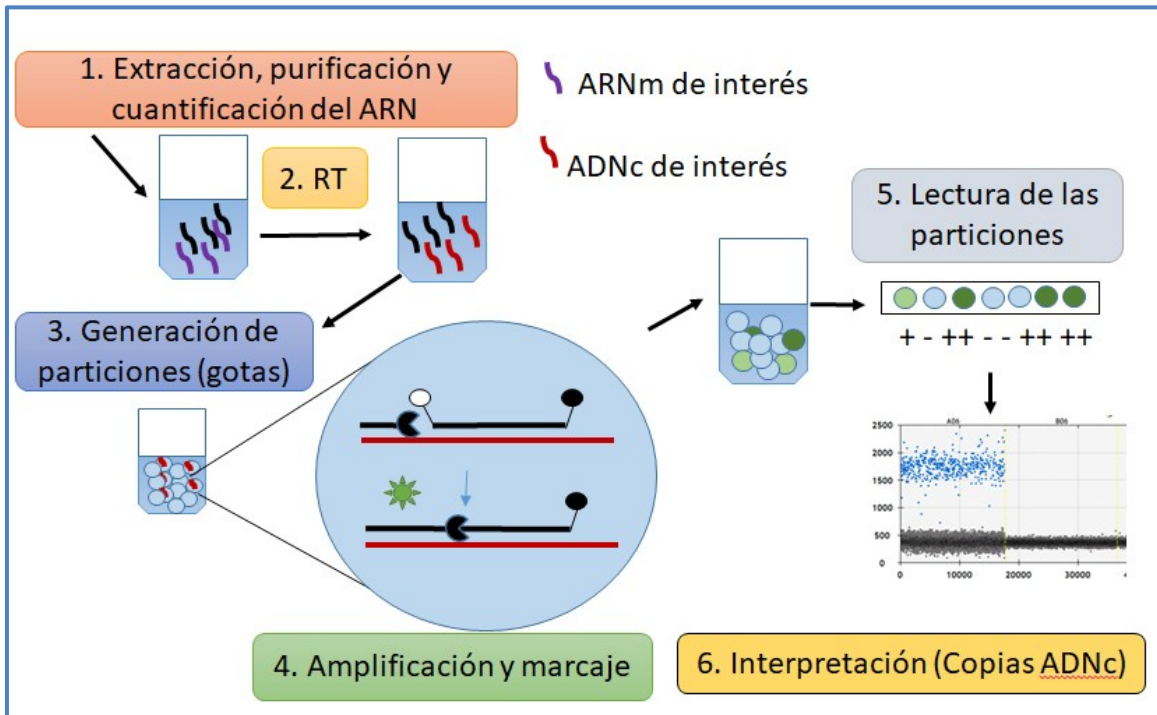


Ilustración 1: Ilustración que muestra la técnica de la PCR digital.