



Universidad de Valladolid



FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR,
BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGÍA**

TESIS DOCTORAL:

**MARCADORES GRANULOCÍTICOS PARA
DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICACIÓN DE
GRAVEDAD Y PRONÓSTICO EN LA INFECCIÓN**

MARTA MARTÍN FERNÁNDEZ

Valladolid, 2020



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**MARCADORES GRANULOCÍTICOS PARA
DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICACIÓN DE
GRAVEDAD Y PRONÓSTICO EN LA INFECCIÓN**

Presentada por Dña. Marta Martín Fernández para
optar al grado de
Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Jesús Francisco Bermejo Martín y Dra. Raquel
Almansa Mora

Tutor:

Dra. María Teresa Pérez García

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:

La financiación de los fondos FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) “Una manera de hacer Europa” y Fondo de Investigaciones Sanitarias, “Instituto de Salud Carlos III” Proyecto [PI16/01156].

La financiación de la Consejería de Educación de Castilla y León y el Fondo Social Europeo.



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

D. Jesús Francisco Bermejo Martín, con D.N.I./Pasaporte 09344393E, Investigador Principal del IIMD-23 Grupo de Investigación Biomédica en Infección Respiratoria y Sepsis (BioSepsis) del Instituto de Biomedicina de Salamanca (IBSAL) y Hospital Universitario Río Hortega (HURH).

D^a Raquel Almansa Mora, con D.N.I./Pasaporte 71120519B, Investigadora del IIMD-23 Grupo de Investigación Biomédica en Infección Respiratoria y Sepsis (BioSepsis) del Instituto de Biomedicina de Salamanca (IBSAL) y Hospital Universitario Río Hortega (HURH).

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“Marcadores granulocíticos para el diagnóstico, estratificación de gravedad y pronóstico en la infección”**, realizada por D^a Marta Martín Fernández, alumna del Programa de Doctorado en Investigación Biomédica.

Autorizan su presentación, considerando que el trabajo reúne los requisitos necesarios para poder ser presentado como Tesis Doctoral y que la autora ha demostrado un adecuado manejo del método científico como para poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, 2 de septiembre de 2020

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Dr. Jesús Francisco Bermejo Martín

Fdo.: Dra. Raquel Almansa Mora

A mis padres y a Álvaro

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, me paro a pensar en todo el mundo al que quiero dar las gracias, y me doy cuenta de cuántas personas han colaborado, de una u otra manera, en esta tesis y me han ayudado a lo largo del camino para hacerla hoy una realidad. Así que a todos los que habéis aportado vuestro granito de arena para que esto sea posible, ¡gracias!

Mis primeras palabras de agradecimiento no podían ser para otros que no fueran mis directores de tesis, por todo lo que me han ayudado y aportado a lo largo de estos años.

Jesús, muchas gracias por todas las cosas que me has aportado a lo largo de estos años, tanto a nivel profesional como personal. Gracias por motivarme día a día y dejarme participar en este apasionante proyecto, y por enseñarme a amar esta bonita profesión. Gracias por tu paciencia en mis comienzos, por tu confianza desde el primer momento y por tus refuerzos siempre positivos para seguir adelante.

Raquel, pieza fundamental en este camino. Gracias por recibirme en tu despacho con los brazos abiertos desde el primer día. Me has enseñado que la ciencia, el trabajo y el buen humor pueden ir de la mano. Gracias por conectar tan bien conmigo, por toda tu ayuda y apoyo a lo largo de estos años, por todo lo que me has aportado, por tu preocupación, por siempre estar ahí, es un verdadero placer trabajar contigo.

Por supuesto, otro apartado especial sería para mis chicas, mis compañeras. Alicia, Cristina y Noelia, gracias por crear una atmósfera de trabajo tan maravillosa, me habéis enseñado que el humor, la paciencia y el buen hacer son compatibles. Sois unas profesionales como la copa de un pino. Ana e Irene, gracias por descubrirme esa parte de la microbiología más desconocida para mí, siempre con una sonrisa. Lucía, el tiempo que estuvimos juntas fue suficiente para saber que eres una compañera excepcional, siempre la alegría de la huerta.

También quiero dar las gracias a todo el personal de los Servicios de Anestesia y Reanimación y Cirugía General del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, del Hospital Universitario de Salamanca y del Hospital Universitario Río Hortega. Agradecer a enfermeros, residentes, adjuntos y, a todos los que han participado, su inconmensurable labor y colaboración. Sin vuestro trabajo esto no hubiera sido posible. Gracias a Silvia, Mario, Eduardo, Carmen, César por resolver siempre mis infinitas

dudas, por estar siempre dispuestos a ayudar y por haber hecho que este trabajo saliera adelante.

También quiero dar las gracias a mis amigos de toda la vida, por su preocupación y apoyo durante todos estos años. A Silvia, por estar siempre ahí, arrimando el hombro. A Patri y Patru por preocuparos e interesaros tanto en esto. A mis “Supervivientes” del Máster, Laura, Moni y Bea, que tan buenos ratos me han hecho pasar, por todo lo que hemos vivido juntas durante estos años, y lo que nos queda.

Gracias a mi compañero de vida, a mi mejor amigo, Álvaro. Por tu infinita paciencia y apoyo, por creer en mí más que yo misma, por inculcarme siempre que puedo con todo lo que me proponga. Gracias por hacerme mejor persona día a día, por remar siempre en la misma dirección, por hacerme feliz, no podría haber elegido un mejor acompañante en el camino.

Por último, a mi familia; a los que están y, muy especialmente, a los que ya no están pero siempre estarán, porque sé que hoy se sentirían muy orgullosos, siempre seréis luz en mi camino. Gracias a mi tío Javi, el doctor de la familia, por sus infinitos consejos, por su preocupación y por su gran interés, aunque seamos de campos tan diferentes.

Y, sobre todo, quiero dar las gracias a los pilares fundamentales de mi vida, mis padres. Siempre seréis mi ejemplo a seguir. Gracias por vuestro amor y apoyo incondicional, por vuestro esfuerzo, por haberme dado la oportunidad de conseguir todo lo que me proponga. Gracias por depositar toda vuestra confianza en mí, por empujarme a ser mejor día a día, por haberme dado todo lo que teníais y más, sin pedir nada a cambio. Me habéis hecho ser la persona que soy. Espero que hoy estéis tan orgullosos de mí, como yo lo estoy de vosotros. Nunca os podré agradecer todo lo que habéis hecho por mí.

“La ciencia no sólo es una disciplina de razón, sino también de romance y pasión”.
Stephen Hawking

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”.
Miguel de Unamuno

ÍNDICE

ÍNDICE	11-13
ABREVIATURAS	14-18
RESUMEN	19-20
I. INTRODUCCIÓN	21-56
I.A) EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA DE LA SEPSIS.....	22-27
I.B) EVOLUCIÓN DE LA DEFINICIÓN DE SEPSIS.....	27-33
I.C) ESCALAS DE GRAVEDAD EN LA SEPSIS.....	33-36
I.D) ENDOTELIO Y SEPSIS.....	37-40
I.E) LA GRANULOPOYESIS.....	40-44
I.F) EL NEUTRÓFILO Y LA SEPSIS.....	44-47
I.G) BIOMARCADORES.....	48-52
I.H) LAS TÉCNICAS DE PCR Y SU EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO.....	52-56
II. JUSTIFICACIÓN	57-59
III. HIPÓTESIS	60-61
IV. OBJETIVOS	62-64
IV. A) OBJETIVOS PRINCIPALES.....	63
IV. B) OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	64
V. MATERIAL Y MÉTODOS	65-89
VI. RESULTADOS	90-124
VII. DISCUSIÓN	125-141
VIII. CONCLUSIONES	142-144
IX. RENDIMIENTO CIENTÍFICO	145-230

X. ANEXOS **231-246**

XI. BIBLIOGRAFÍA **247-266**

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN: *Ácido Desoxirribonucleico*

ADNc: *Ácido Desoxirribonucleico copia de cadena simple*

ANGPT1: *Angiopoyetina-1*

ANGPT2: *Angiopoyetina-2*

ARN: *Ácido Ribonucleico*

ARNm: *Ácido Ribonucleico mensajero*

APACHE: *Acute Physiology and Chronic Evaluation*

AZU1: *Azurocidina 1*

BPI: *Proteína que Aumenta la Permeabilidad Bactericida*

CD177: *Molécula CD177*

CD24: *Molécula CD24*

CEACAM6: *Molécula de Adhesión Celular CEA 6*

CEACAM8: *Molécula de Adhesión Celular CEA 8*

CHIT1: *Chitinasa 1*

CID: *Coagulación Intravascular Diseminada*

CTSG: *Catepsina G*

DAMPs: *Patrones Moleculares Asociados a Daño*

dd PCR: *Reacción en Cadena de la Polimerasa Digital*

DEFA4: *Defensina alfa 4*

EDTA: *Ácido Etilendiamino Tetra Acético*

ELANE: *Elastasa*

eNOS: *Sintasa Endotelial de Óxido Nítrico*

ESI-ToF: *Tiempo de Vuelo de Ionización por Electrospray*

ESM1: *Endocan*

G-CSF: *Factor de Crecimiento Granulocítico*

GM-CSF: *Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos*

GOT/AST: *Aspartato aminotransferasa*

GPT/ALT: *Alanino aminotransferasa*

H₂O₂: *Peróxido de Hidrógeno*

HCUV: *Hospital Clínico Universitario de Valladolid*

HURH: *Hospital Universitario Río Hortega*

HUSA: *Hospital Universitario de Salamanca*

ICAM-1: *Molécula de Adhesión Intercelular 1*

IL: *Interleucinas*

IL18R1: *Receptor 1 de la Interleucina 18*

IL1R2: *Receptor tipo 2 de la Interleucina 1*

Ig: *Inmunoglobulina*

iNOS: *Sintasa Inducible de Óxido Nítrico*

LCN2: *Lipocalina 2*

LFA-1: *Antígeno 1 asociado a la Función Linfocitaria*

LOD: *Logistic Organ Dysfunction*

LTF: *Lactoferrina*

MAC-1: *Antígeno de Macrófago 1*

MALDI-ToF: *Tiempo de Vuelo de Ionización / Desorción Láser asistido por Matriz*

MCP-1: *Proteína Quimiotáctica de Monocitos*

MIP-1 α : *Proteína Inflamatoria del Macrófago*

MMP8: *Metaloproteinasa 8*

MMP9: Metaloproteinasa 9

MMP25: Metaloproteinasa 25

MOSF: Multiple Organ System Failure

MPM: Mortality Probability Model

MPO: Mieloperoxidasa

MR-ProADM: Fragmento Medio de la Pro-adrenomedulina

NAPDH: Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina

NETs: Trampas Extracelulares de Neutrófilos

NK: Natural Killers

ODIN: Organ Dysfunction and/or Infection

OLFM4: Olfactomedina 4

OOP: Optimal Operating Point

OSF: Organ System Failure

PAF: Factor de Activación Plaquetar

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógeno

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR: Proteína C Reactiva

PCT: Procalcitonina

ProADM: Pro-adrenomedulina

PRTN3: Proteinasa 3

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real

REA: Unidad de Reanimación

RNA-seq: Secuenciación de ARN

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: *Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción inversa*

SAPS: *Simplified Acute Physiologic Score*

SDCI: *Sindecan 1*

SDRA: *Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo*

SEL-E: *Selectina E*

SEL-P: *Selectina P*

SIRS: *Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica*

SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment.*

STOM: *Estomatina*

TCNI: *Transcobalamina*

TF: *Factor Tisular*

TGF- β : *Factor Transformador del Crecimiento beta*

THBD: *Trombomodulina*

TNF- α : *Factor de Necrosis Tumoral alfa*

TTPA: *Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado*

UCI: *Unidad de Cuidados Intensivos*

VCAM-1: *Molécula de Adhesión de Células Vasculares 1*

VEGF: *Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular*

RESUMEN

Resumen

La sepsis constituye un problema sanitario de primer orden a nivel mundial. Es una enfermedad tiempo-dependiente, con una elevada tasa de morbilidad y mortalidad. Esto hace que el diagnóstico precoz sea fundamental para disminuir dichas tasas. El aumento progresivo de su incidencia y prevalencia hace que la sepsis suponga una importante carga socioeconómica para los sistemas sanitarios. Actualmente, supone la primera causa de mortalidad no coronaria a nivel mundial y representa una de las patologías más prevalentes tanto en los servicios de Urgencias hospitalarias como en las Unidades de Cuidados Intensivos.

La ausencia de un síntoma guía en la sepsis hace que su diagnóstico sea complicado, y que por tanto, dispongamos de una baja sensibilidad y especificidad para detectarla. Esto puede provocar, por una parte, la no identificación de los pacientes con la consiguiente demora en el tratamiento y una mayor mortalidad; y por otra parte, el sobrediagnóstico de pacientes con el consecuente sobretratamiento con antibióticos. Por ello, es fundamental disponer de herramientas diagnósticas rápidas y fiables. En este sentido, la utilización de biomarcadores puede ser una importantísima alternativa a la hora de conseguir estos objetivos.

En la sepsis se ha observado la existencia de una desregulación en la función del neutrófilo, desembocando en fenómenos de granulopoyesis de emergencia o degranulación de los neutrófilos, así como la presencia de disfunción endotelial.

Esta tesis pretende poner de manifiesto cuál es el papel que juegan biomarcadores representativos de la granulopoyesis de emergencia, la degranulación del neutrófilo y la disfunción endotelial en el diagnóstico, estratificación de gravedad y pronóstico en la infección, en el contexto de pacientes quirúrgicos, utilizando aproximaciones tanto transcriptómicas mediante PCR de última generación, como proteómicas mediante tecnología multiplex.

I. INTRODUCCIÓN

I. A) EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA DE LA SEPSIS.

La sepsis representa un problema sanitario de primer orden a nivel mundial. Es una enfermedad tiempo-dependiente, con una elevada tasa de morbilidad y mortalidad. Esto hace que el diagnóstico precoz sea fundamental para disminuir dichas tasas. El aumento progresivo de su incidencia y prevalencia hace que la sepsis suponga una importante carga socioeconómica para los sistemas sanitarios. Actualmente, constituye la primera causa de mortalidad no coronaria a nivel mundial y representa una de las patologías más prevalentes tanto en los servicios de Urgencias hospitalarias como en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), resultando ser más del 80% de los casos originarios de la comunidad.

◆ EPIDEMIOLOGÍA

Globalmente, se ha estimado que 31,5 millones de casos de sepsis y 19,4 millones de casos de sepsis grave se tratarían cada año en hospitales de todo el mundo, pudiendo llegar a producirse hasta 5,3 millones de muertes anuales en todo el planeta.¹ La sepsis ocasiona más defunciones que otras patologías comunes como el cáncer de mama o próstata o el infarto de miocardio.

Más de 1,7 millones de personas en Estados Unidos son diagnosticadas de sepsis cada año, una cada 20 segundos y la incidencia aumenta cada año. La sepsis es la principal causa de muerte en Estados Unidos², 270.000 personas mueren cada año, una cada 2 minutos³. Hasta el 87% de los casos de sepsis se originan en la comunidad³. La sepsis supone aproximadamente el 6% de las hospitalizaciones y el 35% de las muertes hospitalarias³. Además, supone la principal causa de reingresos hospitalarios, con un 19%

de casos que vuelven a ser hospitalizados a los 30 días⁴. La mortalidad asociada a la sepsis aumenta hasta un 8% por cada hora de retraso en su tratamiento. Hasta un 80% de las muertes a causa de la sepsis se podrían haber evitado con un diagnóstico precoz y un tratamiento rápido⁵. Además, los supervivientes a la sepsis tienen una esperanza de vida menor, tienen peor calidad de vida y tienen un 42% más de probabilidades de cometer un suicidio^{6 7}. La sepsis es la patología con mayor coste hospitalario en Estados Unidos^{8 9}. El coste medio por estancia hospitalaria es de 18.400\$, el doble del coste medio por estancia de todas las demás afecciones¹⁰.

En Europa, el estudio SOAP afirma que la sepsis podría ser ya la enfermedad más prevalente en las UCIs, con una mortalidad y gasto económico mayor que otras patologías de similar prevalencia¹¹. Vincent JL *et al* en un estudio comparando una década después los pacientes del estudio SOAP (2002) con los del estudio ICON (2012), afirman que la presencia de sepsis ha aumentado ligeramente de un 29,6% a un 31,9%. Sin embargo, las estancias en UCI y la mortalidad tanto hospitalaria como a los 60 días se han mantenido estables a lo largo del tiempo¹².

En España, se ha estimado la incidencia de sepsis en 367 casos por cada 100.000 habitantes y año, con una mortalidad hospitalaria asociada del 12,8%. Los casos de sepsis grave se establecieron en 104 casos por cada 100.000 habitantes y año, con una mortalidad hospitalaria del 20,7%. En el caso del shock séptico se estimó una incidencia de 31 casos por cada 100.000 habitantes y año, con una mortalidad hospitalaria asociada del 45,7%. En España se estiman 17.000 fallecimientos anuales a causa de la sepsis, de los cuales el 70% fallece durante los tres primeros días tras el diagnóstico¹³. La sepsis ha generado un incremento en términos de hospitalización, muertes y costes en el sistema sanitario público español desde el año 2000 hasta el 2013, pero la incidencia y mortalidad parecen estabilizarse en el intervalo del 2010 al 2013, observándose una disminución en la estancia hospitalaria durante este mismo intervalo de tiempo¹⁴.

Junto con todo esto, debemos tener también en cuenta el progresivo aumento de población anciana, en la que están presentes diversos factores como las comorbilidades que padecen, que afectan en muchas ocasiones a su salud endotelial; la malnutrición; la fragilidad y la inmunosenescencia, la alteración de su sistema inmune debido a la edad. Todos ellos son factores predisponentes a un mayor riesgo a la hora de desarrollar formas graves de

sepsis¹⁵. En el año 1950 el porcentaje de personas mayores de 60 años suponía en torno al 8% de la población mundial, habiéndose incrementado dicho porcentaje hasta el 10% en el año 2000. Se estima que en el año 2050 este porcentaje se elevará hasta el 21%¹⁶. Además, se prevé que durante las próximas décadas, la población mayor de 80 años aumente al doble de la existente en la actualidad, estimándose el porcentaje de esta población para el año 2050 en un 9,6% de la población total en Europa y en torno al 9% de la población de América del Norte¹⁷.

◆ HISTORIA

El concepto de sepsis ha estado presente a lo largo de la historia, existiendo tratados médicos en los que se habla de la existencia de un terrible cuadro sufrido por algunas personas y la posible extensión generalizada de una infección, así como de los remedios que se empleaban para tratarlo. Así, hacia el año 1550 a.C, en el “papiro Ebers” escrito en lengua hierática egipcia se relatan cuadros de “hinchazones malolientes con abundante pus y aire en su interior, que si se inciden quirúrgicamente pueden extender su mal a todos los miembros del cuerpo”¹⁸.

El origen de la palabra sepsis proviene del griego σήψις (sipsis) que significa putrefacción: σῆπ- σήπω (gr. ‘pudrir’) más el sufijo -σις σήψις (pudrir-se). Homero fue el primero en acuñar dicha definición hace más de 2.700 años¹⁹. Se consideraba esta enfermedad como una descomposición biológica en el interior del cuerpo a causa de unos “principios internos” capaces de generar una peligrosa autointoxicación, resultante en una putrefacción maloliente²⁰. Dicho concepto de “generación espontánea” se mantuvo durante siglos, hasta el siglo XIX²¹.

Ya el médico griego Hipócrates (460-370 a.C) describió, probablemente por primera vez, el cuadro clínico del shock séptico y años después, el filósofo florentino Niccolò Maquiavelo (1469-1537) describió la complejidad que suponía tanto diagnosticar dicha

enfermedad como su tratamiento²². Por otra parte, Galen (129-199 d.C) consideró que la sepsis era un evento loable, necesario para la curación de las heridas²³.

Por otro lado, Marcus Terentius Varro, alrededor del año 100 a.C, fue el primero en articular el concepto de contagio. Sugirió que “pequeñas criaturas invisibles a la vista, llenan la atmósfera, y respiradas a través de la nariz, causan enfermedades peligrosas”²². En 1546, Girolamo Fracastoro escribió “contagium virum”, primer indicio claro de lo que se ha llegado a conocer como “teoría del germen”. Teorizó que las infecciones se podían transmitir por contacto directo o indirecto a través del aire, por semillas o gérmenes invisibles²⁴. Sus teorías tienen un superficial, pero notable parecido con los postulados de Koch, que llegaron 300 años más tarde. Sin embargo, no fue hasta el año 1683 cuando de la mano de Anthony van Leeuwenhoek, fueron posibles las primeras observaciones al microscopio²².

En 1847, Ignaz Semmelweis introdujo un hito fundamental, las prácticas antisépticas previas a los exámenes de pacientes. Observó que existía una relación entre la fiebre puerperal desarrollada por las parturientas que eran asistidas durante el parto por obstetras estudiantes, y que habían participado previamente en autopsias²⁵. Instauró el lavado de manos con una solución de cal antes de las exploraciones ginecológicas, reduciendo la tasa de mortalidad de la fiebre puerperal del 18% al 3%. Esto representó el primer ensayo clínico realizado en enfermedades infecciosas²⁶.

Louis Pasteur durante la segunda mitad del siglo XIX, demostró mediante un experimento, que el proceso de putrefacción no tiene lugar sin la participación de organismos vivos. Robert Koch, en la década de 1870 describió los agentes etiológicos de algunas enfermedades como el ántrax, el cólera o la tuberculosis²⁷. Esto sentó las bases para empezar a prevenir la entrada de microorganismos en el cuerpo humano. Así, Joseph Lister (1827-1912) al observar que las fracturas abiertas se infectaban más que las cerradas, comenzó a desarrollar métodos antisépticos en las cirugías²⁸.

El descubrimiento de que los gérmenes producían y secretaban sustancias venenosas, llamadas “toxinas” vino de la mano de Ludwig Brieger (1849-1919) en el año 1886. Las toxinas de la difteria y el tétanos fueron las primeras toxinas bacterianas identificadas. Estos hallazgos culminaron con el descubrimiento de las anti-toxinas por Emil von

Behring (1854-1917) y Shibasaburo Kitasato (1856-1931) en 1890. Richard Pfeiffer (1858-1945), compañero de Robert Koch, estableció en el año 1892 el concepto de “endotoxina”, definido como un veneno bacteriano termoestable y responsable de las consecuencias fisiopatológicas de algunas enfermedades infecciosas, a diferencia del concepto de “exotoxina”, que son termolábiles²⁹. Fue por primera vez en el año 1909, cuando se publicó la información relativa a los doce primeros casos de pacientes con sepsis provocada por bacterias gram negativo, en concreto *Escherichia coli*, de los cuales fallecieron la mitad³⁰.

Pero la primera definición científica de sepsis no llegó hasta el año 1914 cuando Hugo Schottmüller la definió así: "la sepsis es un estado causado por la invasión microbiana de una fuente infecciosa local en el torrente sanguíneo que conduce a signos de enfermedad sistémica en órganos a distancia"³¹.

Sin embargo, fue William Osler en uno de sus famosos libros “The Evolution of modern Medicine”, el primero en reconocer el papel fundamental que juega la respuesta del huésped en esta enfermedad y en entenderla tal y como lo hacemos ahora. En su libro cita: “salvo en contadas ocasiones, el paciente parece morir de la respuesta del cuerpo a la infección en lugar de por la infección”^{32 33}.

En el año 1967 se describe por primera vez la existencia de un cuadro clínico agudo al que hoy conocemos con el nombre de “Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA)”. En el año 1973 Tilney publica por primera vez la presencia de un síndrome clínico en el que se produce un fallo progresivo de diversos órganos³⁴. Bone en los años 90 postula que en el contexto de un proceso séptico, el fallo de órgano se desencadena como consecuencia de la desregulación de la respuesta inflamatoria sistémica entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios³⁵.

Es en el año 1992 cuando por fin el ACCP (American College of Chest Physicians) y la SCCM (Society of Critical Care Medicine) deciden reunirse con el objetivo de aunar conceptos y elaborar definiciones en el 1º Consenso Internacional, para su utilización en la práctica clínica y en materia de investigación³⁶.

Las definiciones de los conceptos asociados a la sepsis siguen siendo materia de debate y controversia entre los expertos, habiéndose producido varias actualizaciones a lo largo de estos últimos años. La sepsis sigue siendo un problema sanitario de primer orden, disponiendo de un gran porcentaje de los recursos sanitarios y suponiendo un reto para su manejo y tratamiento. Sigue siendo de carácter prioritario el diagnóstico precoz de esta enfermedad, la única arma de la que disponemos, y que ha demostrado ser hasta ahora, la más eficaz para un mejor tratamiento y pronóstico de este síndrome.

I. B) EVOLUCIÓN DE LA DEFINICIÓN DE SEPSIS.

Como consecuencia de la complejidad y ambigüedad de la sepsis, no es hasta los años 90 cuando se establece una terminología para definirla. Roger Bone, en 1980, propone por primera vez el concepto de “síndrome sepsis”, definido por la presencia de hipotermia ($<35^{\circ}\text{C}$) o hipertermia ($>38,3^{\circ}\text{C}$), taquicardia (>90 lpm), taquipnea (>20 rpm), evidencia clínica de foco de infección, y la presencia de al menos mala perfusión o disfunción de un órgano, reflejado por entidades como la presencia de hipoxemia, oliguria, lactato elevado³⁷. Aunque este término de síndrome sepsis ha sido utilizado para establecer los criterios de inclusión para estudios clínicos, no define de forma satisfactoria a un grupo homogéneo de pacientes^{38 39}.

1º Consenso Internacional

Como ya se mencionó anteriormente, no es hasta el año 1992 cuando el ACCM (American College of Chest Physicians) y la SCCM (Society of Critical Care Medicine) deciden aunar criterios y establecer definiciones en torno a la sepsis en el 1º Consenso Internacional. Como resultado de este primer consenso se introdujo el término de “Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica” (SIRS), el cual se define por la presencia de al menos dos de los siguientes cuatro criterios clínicos:

- Temperatura > 38°C o < 36°C.
- Taquicardia > 90 lpm.
- Taquipnea > 20 rpm o PaCo2 < 32mmHg.
- Leucocitosis ($12 \times 10^9/L$) o leucopenia ($< 4 \times 10^9/L$) o >10% formas inmaduras.

El SIRS representa una respuesta inflamatoria de cualquier etiología, entre las que se incluye la sepsis cuando se confirma, además, la presencia de una infección. Dentro de la patología de la sepsis se definieron varios estadios de gravedad: sepsis grave, como aquella sepsis que cursa con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión; y shock séptico, como aquella sepsis grave asociada, además, a una hipotensión refractaria a tratamiento de resucitación con fluidos³⁶ (Figura 1).

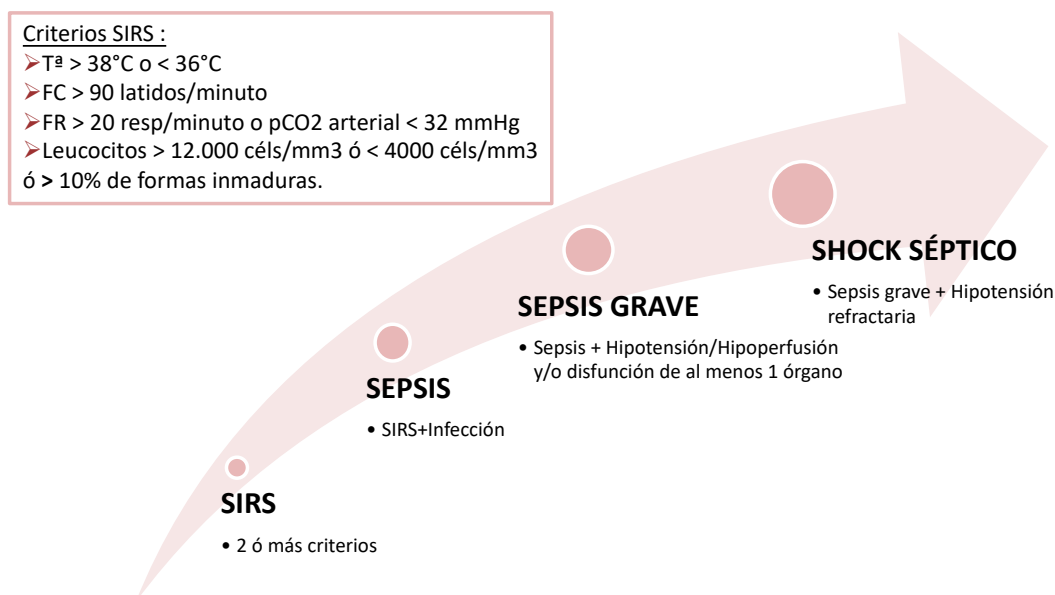


Figura 1. Definiciones del 1º Consenso Internacional de 1992.

De esta conferencia también surgió el nuevo término de “Síndrome de disfunción multiorgánica” (MODS), definido como “la presencia de disfunción orgánica de forma aguda en aquellos pacientes que no son capaces de mantener su homeostasis sin tratamiento”. Desde entonces, se han propuesto numerosas escalas para evaluar y cuantificar el grado de disfunción orgánica, así como el grado de morbilidad posterior en estos pacientes^{36 40}.

2º Consenso Internacional

Poco tiempo después de la celebración de esta primera conferencia de 1992, comenzaron a surgir controversias y debates entre los expertos en torno al concepto de SIRS, que lo consideraban muy sensible y poco específico. Por este motivo, en el año 2001 se convocó una nueva conferencia (2º Consenso Internacional), en la que se modificaron y ampliaron los criterios que definían la presencia de SIRS, y se validaron el resto de definiciones.

En 2001, se introduce el sistema PIRO (Predisposición, Infección, Respuesta, Disfunción Orgánica) en base a factores pronósticos relacionados con la sepsis, pretendiendo hacer una clasificación similar a la ya existente en TNM tumoral⁴¹ (Tabla 1).

P	Predisposición genética del paciente que puede condicionar mala evolución.
I	Infección dependiendo del agente causal, localización y extensión, o el tiempo de espera para la implantación de terapia antibiótica.
R	Respuesta inflamatoria del organismo que implica liberación de mediadores proinflamatorios y citoquinas que desembocan en un fallo orgánico.
O	Disfunción Orgánica como principal factor determinante del mal pronóstico en los pacientes sépticos.

Tabla 1. Sistema PIRO introducido en 2001. Adaptación de Levy M.M et al. “2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference” (PMID: 12664219).

Para la elaboración de este sistema PIRO se tuvieron en cuenta las clasificaciones sugeridas por los participantes en las conferencias para la definición de sepsis, así como para la estratificación de los pacientes tanto por datos de laboratorio como por criterios clínicos.

En el año 2004, diferentes organizaciones como la Sociedad Europea de Medicina y Cuidados Intensivos”, el “Foro de Sepsis Internacional”, o la “Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos”, llevaron a cabo una serie de iniciativas, como la publicación de guías internacionales de la “Campaña para sobrevivir a la Sepsis” (SSC) en revistas de gran impacto como “Critical Care Medicine”⁴² e “Intensive Care Medicine”⁴³, con el único objetivo de intentar disminuir la mortalidad asociada a la sepsis grave y el shock séptico.

En estas guías se resumen diferentes pautas de actuación clínica en la sepsis grave y shock séptico. Se actualizaron en el año 2012, publicándose en 2013. Según la actualización de la SSC del 2012, se pautan los siguientes criterios de sepsis^{44 45}:

CONCEPTO	DEFINICIÓN	CRITERIOS
<p style="text-align: center;">Sepsis</p>	<p style="text-align: center;">Infección conocida o sospechada asociada a manifestaciones clínicas.</p>	<p>Manifestaciones generales:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Temperatura > 38°C o < 36°C -Taquicardia > 90 lpm -Taquipnea > 20 rpm o PaCo₂ < 32mmHg -Alteración estado mental. -Edema significativo o balance positivo de fluidos (20 mL/kg 24 h). -Hiperglucemia (>140 mg/dL or 7,7 mmol/L) en ausencia de diabetes. <p>Variables inflamatorias:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Leucocitosis (>12x10⁹/L) o Leucopenia (<4x10⁹/L (o >10% formas inmaduras -Proteína C Reactiva en plasma > 2 SD el valor normal. -Procalcitonina en plasma > 2 SD el valor normal. <p>Variables hemodinámicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Hipotensión (TAS<90mmHg, TAM<70 mmHg o disminución de >40mmHg en TAS basal). <p>Variables disfunción de órgano:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ <300) -Oliguria aguda (<0,5 mL kg⁻¹ h⁻¹ durante al menos 2 h a pesar de adecuada resucitación fluídica). -Aumento de creatinina (>0,5 mg/dL o 44,2 μmol/L)

		<ul style="list-style-type: none"> -Alteración de coagulación (INR >1,5 o aPTT >60 s) -Íleo -Trombocitopenia (plaquetas >100.000 μL^{-1}) -Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total >4 mg/dL o 70 $\mu\text{mol/L}$ en plasma) <p>Variables perfusión de tejidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Hiperlactatemia (>1 mmol/L) -Disminución del relleno capilar o moteado
Sepsis Grave	Sepsis + disfunción de un órgano o hipoperfusión tisular secundaria a la infección.	<ul style="list-style-type: none"> -Hipotensión -Lactato por encima de los niveles normales. -Oliguria (<0,5 mL $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ durante al menos 2 h a pesar de adecuada resucitación con fluidoterapia). -$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ <250 en ausencia de neumonía como foco de infección. -$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ <200 en presencia de neumonía como foco de infección. -Creatinina >2,0 mg/dL (176,8 $\mu\text{mol/L}$) -Bilirrubina >2 mg/dL (34,2 $\mu\text{mol/L}$) -Plaquetas <100.000 μL. -INR >1,5
Shock Séptico	Hipotensión refractaria a pesar de adecuada resucitación con fluidoterapia que precisa de vasopresores.	<ul style="list-style-type: none"> -Hipotensión -Lactato por encima de los niveles normales. -Oliguria (<0,5 mL $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ durante al menos 2 h a pesar de adecuada resucitación con fluidoterapia).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de SSC, publicadas en 2013

3º Consenso Internacional

En el año 2016 tiene lugar el 3º Consenso Internacional (SEPSIS-3) para las definiciones de sepsis y shock séptico. La principal novedad es que desaparecen los términos de SIRS y sepsis grave, centrándose exclusivamente en la fisiopatología de la sepsis, que cobra una mayor relevancia en este escenario⁴⁶.

Cobra especial importancia en estas definiciones el fallo de órgano, evaluado a través de la escala de gravedad más usada en las unidades de cuidados críticos, la escala SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)⁴⁶. Así, se promulgan las siguientes definiciones:

- Sepsis: respuesta desregulada del huésped a la infección, que produce una disfunción de órgano potencialmente mortal. Se define como una infección documentada o sospecha de la misma en presencia de fallo multiorgánico, definido como un incremento agudo de 2 o más puntos en la escala SOFA, asumiendo una puntuación de 0 en aquellos pacientes en los que se desconozca la existencia previa de fallo de órgano (Figura 2)⁴⁶.
- Shock séptico: situación en la que las anomalías celulares, circulatorias y metabólicas subyacentes son lo suficientemente profundas para aumentar su mortalidad. Se define como una sepsis asociada a una hipotensión persistente que requiere el uso de vasopresores para mantener una tensión arterial media (TAM) ≥ 65 mmHg y la presencia de lactato ≥ 2 mmol/L, a pesar de realizar una correcta fluidoterapia (Figura 2)⁴⁷.

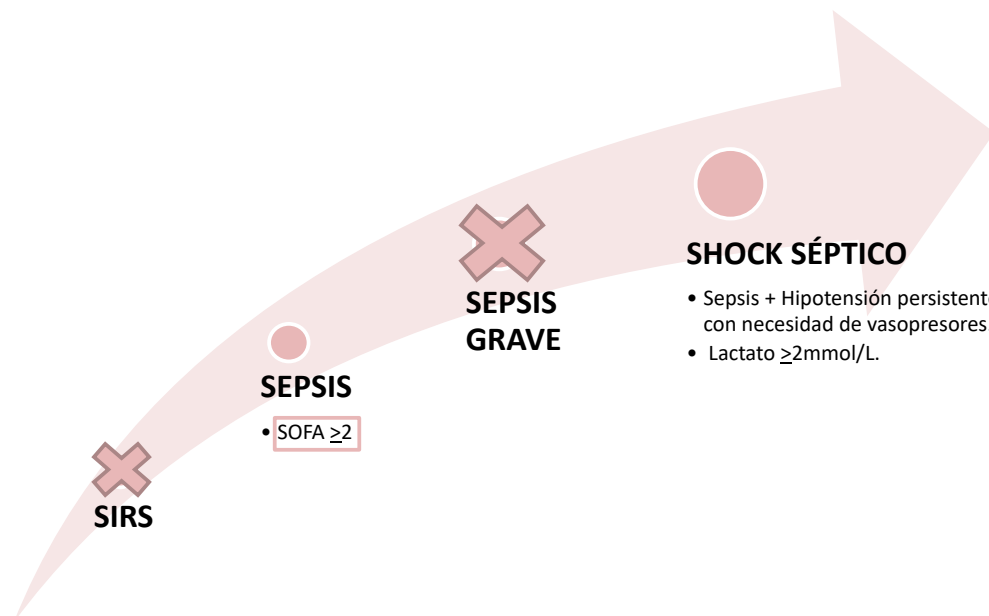


Figura 2. Definiciones del 3º Consenso Internacional para las definiciones de sepsis y shock séptico (SEPSIS-3).

Además, en esta conferencia se introduce un nuevo concepto, el quick SOFA (qSOFA), basado también en la escala SOFA, y cuyo propósito es dotar a los clínicos de una herramienta precoz que les permita detectar con mayor antelación y fuera de las unidades de cuidados críticos, a los pacientes que puedan estar desarrollando una infección con fallo de órgano, considerando que la presencia de 2 de los 3 criterios que lo definen, hace que un paciente tenga un qSOFA positivo, y por tanto, sea sospechoso de estar desarrollando una sepsis (Tabla 3)⁴⁶.

CRITERIOS qSOFA (quick SOFA)
-Frecuencia respiratoria > 22 rpm.
-Alteración del estado mental (Escala de Coma de Glasgow (GCS) ≤ 13).
-Presión arterial sistólica (PAS) ≥ 100 mmHg.

Tabla 3. Criterios qSOFA del 3º Consenso Internacional para las definiciones de sepsis y shock séptico (SEPSIS-3)⁴⁶.

I. C) ESCALAS DE GRAVEDAD EN LA SEPSIS

Las escalas de gravedad son herramientas que nos aportan información a la hora de valorar el diagnóstico o pronóstico de un paciente, así como de su evolución clínica, ayudando al clínico en la toma de decisiones en los pacientes con sepsis. Estas escalas se desarrollan a partir de grandes bases de datos donde se recogen variables que están implicadas en la gravedad de esta enfermedad. Las variables que se incluyan dentro de una determinada escala o “score” deben ser previamente ponderadas y valoradas tanto por expertos como por datos estadísticos que las apoyen y validen correctamente.

Dentro de las unidades de cuidados críticos, en las escalas de gravedad, las variables pueden clasificarse como agudas (desórdenes fisiológicos o disfunciones orgánicas) o crónicas (edad o enfermedades crónicas previas).

Este tipo de escalas pueden ofrecer una orientación general, pero el principal problema al que se enfrentan, es no poder hacer un uso real de las mismas en la toma de decisiones individuales. Además, en muchas ocasiones, estas escalas tienen un componente subjetivo, que depende del clínico que la emplee, haciendo que las valoraciones a través de estas escalas puedan cambiar.

En líneas generales, estas escalas pueden clasificarse bien en función de si son objetivas o subjetivas o bien en función del momento en el que se apliquen (primer día de la enfermedad o a lo largo de la estancia en la UCI) (Tabla 4).

MOMENTO USO	OBJETIVA/SUBJETIVA	ESCALA
“Del 1º día”	Objetiva	SAPS II APACHE III MPM II LOD
	Subjetiva	SAPS I APACHE II
“A lo largo de la estancia”	Subjetiva	OSF ODIN MOSF SOFA LOD

Tabla 4. Clasificación de las principales escalas de gravedad. SAPS: Simplified Acute Physiologic Score; APACHE: Acute Physiology and Chronic Evaluation; MPM: Mortality probability model; LOD: Logistic Organ Dysfunction; OSF: Organ system failure; ODIN: Organ Dysfunction and/or Infection; MOSF: Multiple Organ System failure; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

Como podemos observar, las escalas empleadas para valorar el estado de un paciente a lo largo de su hospitalización en la UCI son subjetivas. Cabe destacar el caso de la escala SOFA, referencia para las actuales definiciones de sepsis establecidas por el 3º Consenso Internacional (SEPSIS-3).

El SOFA (“Sequential Organ Failure Assessment”) se trata de una escala que se emplea para determinar el fallo de órgano durante la estancia en UCI de un paciente. Es una escala dinámica, para la evaluación continuada e independiente del estado de seis órganos o sistemas a lo largo del tiempo⁴⁸ (Tabla 5). Sin embargo, se trata de una escala subjetiva, ya que, la determinación de algunos parámetros recogidos en la misma, como la Escala de Coma de Glasgow, depende de la persona que lo esté valorando. Además, como bien se ha dicho, es una escala que se emplea en las unidades de cuidados críticos, lo cual conlleva que sus parámetros sólo pueden recogerse en un servicio de esta naturaleza, y no en cualquier planta de hospitalización, por lo que no es posible evaluar el fallo de órgano mediante esta escala en cualquier servicio hospitalario. Esto supone un impedimento a la hora de encontrar y valorar con precocidad a aquellos pacientes que

puedan acabar desarrollando una sepsis y que, lógicamente, aún no hayan requerido de ingreso en una UCI.

SISTEMA	ESCALA SOFA				
	0	1	2	3	4
Respiratorio PaO ₂ /FiO ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7) con soporte respiratorio	<100 (13,3) con soporte respiratorio
Coagulación Plaquetas, x10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático Bilirrubina, mg/dl (μmol/L)	<1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (204)
Cardiovascular	TAM ≥70 mm Hg	TAM <70 mm Hg	Dopamina <5 o dobutamina (cualquier dosis)	Dopamina 5,1-15 o epinefrina ≤0,1 o norepinefrina ≤0,1	Dopamina >15 o epinefrina >0,1 o norepinefrina >0,1
Sistema Nervioso Central Escala de Coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	>5,0 (440)
Diuresis, ml/día				<500	<200

Tabla 5. Escala de gravedad SOFA para la evaluación del fallo de órgano durante la estancia en UCI. Adaptación de Singer, M. et al⁴⁶. Un incremento en la escala SOFA de >2 puntos se asocia a un aumento en la mortalidad, valores por encima de 8 se asocian con alto riesgo de mortalidad.

Por tanto, es notoria la necesidad de encontrar alternativas objetivas y sencillas que permitan valorar el estado de los pacientes tanto en las UCIs como fuera de ellas, especialmente si queremos ser lo más precoces posibles a la hora de identificar a este tipo de pacientes, algo clave para su tratamiento y, por ende, para su pronóstico.

I. D) ENDOTELIO Y SEPSIS

La disfunción endotelial es un evento central en la fisiopatología de la sepsis⁴⁹. La disfunción endotelial precede al fallo de órgano y juega un papel crucial en su patogénesis, incrementando la permeabilidad vascular, promoviendo la activación de la cascada de la coagulación, edema tisular y comprometiendo la perfusión de órganos vitales⁵⁰.

El endotelio vascular constituye una barrera semipermeable que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos. Controla el intercambio de fluidos, leucocitos y proteínas plasmáticas, abriendo y cerrando de forma coordinada las uniones celulares que lo componen⁵¹. Previene la entrada de microorganismos en los tejidos, y además, realiza una función anticoagulante natural que evita la activación descontrolada de la coagulación. Un endotelio vascular normal está formado por una capa de células endoteliales sobre una membrana basal, con el glicocáliz en la región luminal⁵².

- Glicocáliz: es una capa organizada formada por proteoglicanos sulfatados, glicoproteínas, hialuronano, y proteínas plasmáticas que se adhieren a una matriz de superficie que recubre la superficie luminal del endotelio. Actúa como una barrera de protección entre la sangre y la pared del vaso, contribuyendo a mantener la barrera endotelial, a regular la adhesión endotelial de leucocitos y a inhibir la trombosis intravascular⁵³.
- Células endoteliales: conforman una capa continua que cubre nuestra vasculatura, sobre una membrana basal formada por lamininas, colágenos, nidógenos/entactinas y perlecan. Las células endoteliales que cubren la pared vascular están unidas mediante uniones estrechas (formadas mayoritariamente por ocludinas y claudinas), uniones adherentes (compuestas principalmente por cadherinas del endotelio vascular) y uniones tipo gap (formadas por conexinas)⁴⁹⁵⁴. Embebida en la membrana basal y fuera de la misma se encuentra una capa no continua de unas células llamadas pericitos, que se cree que tienen un papel en la angiogénesis⁵².

La disfunción endotelial en la sepsis

La sepsis produce una disfunción endotelial que induce en las células endoteliales un estado proadhesivo, procoagulante y antifibrinolítico, alterando así la hemostasia, el tráfico de leucocitos, la inflamación, la función barrera y la microcirculación⁵⁵. Durante el desarrollo de la sepsis se producen los siguientes eventos fisiopatológicos que afectan a la integridad del endotelio:

a) Inflamación sistémica y aumento del estrés oxidativo:

Durante la “tormenta molecular” que se produce durante la sepsis participan un gran número de mediadores que inician y amplifican el daño en el endotelio. Dentro de estas moléculas cabe destacar la presencia de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs), histamina, citoquinas, bradiquinina, factor de activación plaquetar (PAF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), productos de la degradación de fibrina y especies reactivas de oxígeno (ROS)^{56 57 58 59}. Sin embargo, el endotelio no es sólo un testigo silencioso durante la sepsis sino que estimula la respuesta inflamatoria mediante la producción de quimiocinas que atraen células inmunes⁵⁹.

b) Degradación y pérdida del Glicocáliz:

La pérdida del glicocáliz durante la sepsis se produce como consecuencia del “cocktail” de moléculas prooxidativas y proinflamatorias que se genera^{49 56 60}. Esta respuesta deletérea se ve agravada por la liberación de componentes de las trampas extracelulares del neutrófilo (NETs) y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como los heparan sulfatos, productos de la propia degradación del glicocáliz^{53 60}.

c) Destrucción de las uniones intercelulares, ruptura de la barrera endotelial y muerte de células endoteliales.

El escenario oxidativo y proinflamatorio que se produce durante la sepsis induce la destrucción de las uniones intercelulares, formando espacios entre las células endoteliales^{49 56 60}. Se produce la muerte de células endoteliales como consecuencia de la liberación de NETs, en concreto, por la acción de proteasas y proteínas catiónicas como defensinas e histonas liberadas por estas NETs^{55 61}. Las toxinas bacterianas rompen la

barrera endotelial matando directamente células endoteliales, debilitando su citoesqueleto y rompiendo las uniones intercelulares de estas células endoteliales⁵⁸.

d) Aumento de la adhesión y extravasación leucocitaria.

La pérdida de glicocálix hace que el endotelio se vea expuesto a la adhesión de leucocitos⁶⁰. La presencia de citoquinas proinflamatorias durante la sepsis permite la adhesión de células inmunes activadas a la pared vascular y promueve la migración hacia tejidos circundantes mediante la inducción de la expresión de moléculas como Selectina E (SEL-E), Selectina P (SEL-P), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) o molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1)⁵⁶. Durante la sepsis se produce una pérdida de la integridad de la barrera endotelial como consecuencia de la adhesión de neutrófilos activados⁶². Estos neutrófilos activados liberan proteasas que contribuyen a la degradación de las proteínas de unión⁵². Los neutrófilos extravasados producen enzimas destructivas y radicales libres de oxígeno, los cuales inducen daño tisular.

e) Inducción de un estado procoagulante y antifibrinolítico.

En la sepsis se produce un aumento de la producción de óxido nítrico, un potente vasodilatador, mediado por la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)^{56 63}. Sin embargo, tiene lugar una importante reducción de la producción de óxido nítrico mediante la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), lo que ocasiona una alteración directa de la vasodilatación y promueve la adhesión leucocitaria y plaquetar⁵⁷. El déficit en la regulación de la expresión endotelial de trombosmodulina y de los receptores de la proteína C, da lugar a una menor activación de la proteína C activada, que tiene función anticoagulante⁶⁴. Las células endoteliales liberan una glicoproteína procoagulante llamada factor tisular (TF) mientras permanezca inhibida la síntesis del inhibidor de la ruta del factor tisular⁵⁵. La activación plaquetar y de la cascada de coagulación produce trombosis microvascular⁵³. Además, las NETs promueven una hipercoagulabilidad en los pacientes con sepsis, brindando un soporte para la formación de trombos⁵⁵. La asociación existente entre el factor tisular y las NETs podría centrarse en la generación de trombina y en la formación de coágulos de fibrina en los sitios de infección o activación de neutrófilos, con la presencia de trombina activa, que lleva a una mayor activación plaquetar⁶⁵. La disfunción vascular aguda y las fugas contribuyen a la aparición de

hipotensión, hipoxia local, perfusión de órganos insuficiente, isquemia, y, en última instancia, al fallo de órgano, síndrome de distrés respiratorio agudo, shock y muerte en los pacientes más graves^{57 66}.

Teniendo todo esto en cuenta, se podrían emplear marcadores de daño endotelial para el diagnóstico, estratificación de riesgo y pronóstico en la sepsis. En consonancia con esto, se ha descrito que el empleo de perfiles basados en biomarcadores endoteliales es de utilidad a la hora de categorizar a los pacientes en subgrupos homogéneos de diferente gravedad⁶⁷. Además, se ha descubierto que en pacientes con sepsis, las moléculas de adhesión endotelial pueden ayudar a predecir el fallo multiorgánico y la mortalidad⁶⁸.

I. E) LA GRANULOPOYESIS.

Los leucocitos son las células sanguíneas que se encargan de reconocer y eliminar cualquier agente extraño del organismo. Se tratan, por tanto, de un componente fundamental en la lucha contra la infección y el desarrollo de la reacción inflamatoria. Podemos diferenciar cinco tipos de leucocitos según sus características morfológicas: linfocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos.

La función principal de los granulocitos consiste en la fagocitosis y muerte de microorganismos. El origen de los granulocitos tiene lugar en la médula ósea a partir de un progenitor común a todas las células sanguíneas, en un proceso escalonado de diferenciación, proliferación y maduración. La célula madre totipotente, bajo el influjo de los factores del microambiente medular, daría lugar a células progenitoras cada vez más comprometidas hacia la serie mieloide, de las que, finalmente, se originarían los precursores granulocíticos morfológicamente reconocibles en la médula ósea⁶⁹.

Estos precursores continúan proliferando y diferenciándose en una secuencia de maduración mediante la cual van adquiriendo las características necesarias para ejercer su función como granulocito maduro. Dicha secuencia de maduración sigue el siguiente orden⁶⁹ (Figura 3):

- Mieloblasto: se trata de la primera célula morfológicamente reconocible de la granulopoyesis. Su tamaño es de 10-15 μm y posee un núcleo redondo de gran tamaño, con cromatina laxa y de dos a tres nucléolos bien visibles. El citoplasma es escaso, débilmente basófilo y desprovisto de gránulos.
- Promielocito: posee características similares a las del mieloblasto, pero su tamaño es mayor, su citoplasma más amplio y contiene numerosos gránulos azurófilos peroxidasa positivos, los llamados gránulos primarios.
- Mielocito: presenta un núcleo redondeado y posee una cromatina más condensada sin nucléolos visibles. El citoplasma ha perdido toda su basofilia y contiene numerosos gránulos. A partir de este estadio comienza la formación de granulación secundaria específica (neutrófila, eosinófila y basófila).
- Metamielocito: posee un núcleo indentado y excéntrico, de aspecto reniforme, y el citoplasma está lleno de granulaciones secundarias, y las primarias, aunque existen, ya no son visibles. Esta célula ha perdido la capacidad mitótica.
- Cayado o banda: su tamaño es algo menor que el de su predecesor y el núcleo se ha estrechado en forma de banda o herradura.
- Granulocito segmentado neutrófilo: su origen tiene lugar por segmentación nuclear a partir del cayado. Se trata de los elementos más maduros de la granulopoyesis. Son células redondeadas de 12-14 μm , cuyo núcleo presenta de dos a cinco lóbulos unidos por finos puentes cromatínicos. El citoplasma contiene numerosos gránulos neutrófilos.

- Granulocito segmentado eosinófilo: posee un tamaño ligeramente mayor que el del neutrófilo (16 μm). Suele tener un núcleo bilobulado, y el citoplasma posee unos gránulos grandes de forma redondeada muy típicos.
- Granulocito segmentado basófilo: es similar al eosinófilo, con la distinción de que sus gránulos son intensamente basófilos y se disponen encima del núcleo, lo que dificulta su visualización.

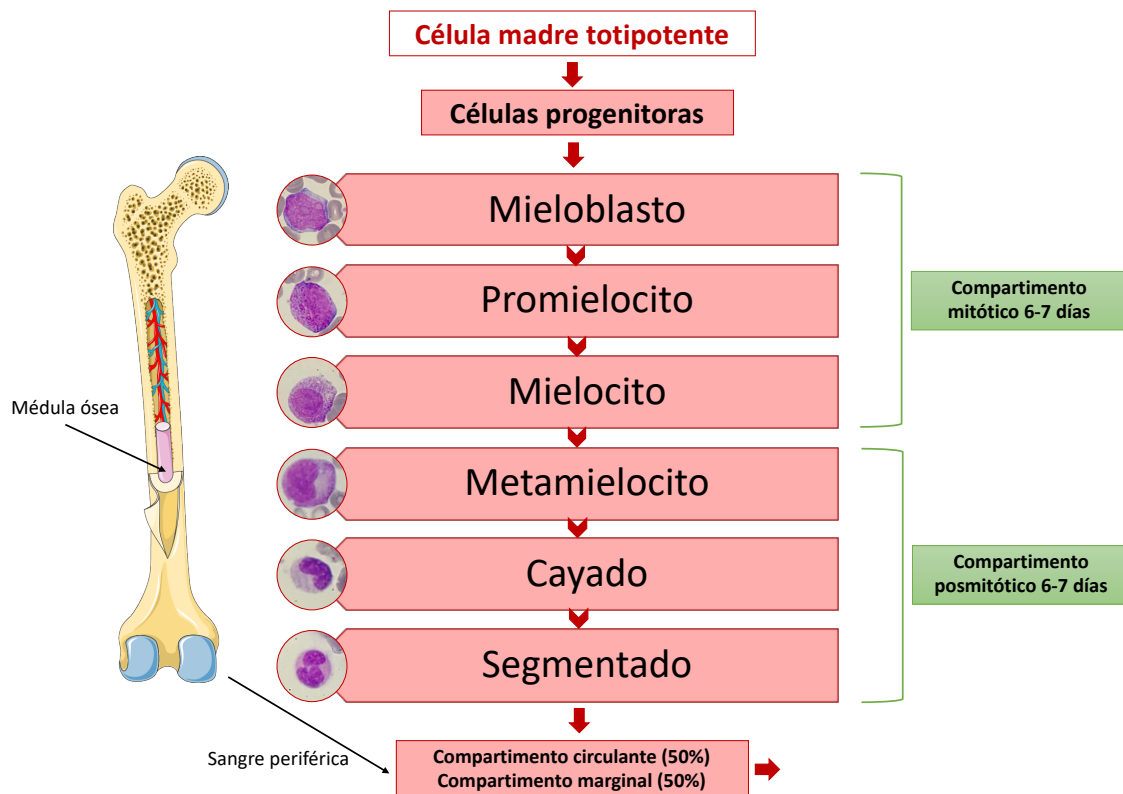


Figura 3. Maduración y cinética de los granulocitos. Adaptación del capítulo de García Hernández A.M y Jarque Ramos I. "LEUCOCITOS. PATOLOGÍA DE LOS GRANULOCITOS. AGRANULOCITOSIS." ⁶⁹

La producción diaria de granulocitos neutrófilos se estima en torno a 1×10^{11} células. Desde el punto de vista de la cinética celular, se pueden establecer dos compartimentos medulares de los elementos granulocíticos⁶⁹:

- Compartimento mitótico o proliferativo. Incluye los precursores con capacidad de división: mieloblasto, promielocito y mielocito.

- Compartimento posmitótico o madurativo. Las células de este compartimento (metamielocito, cayado y segmentado) continúan madurando, pero ya no se dividen. Doblan en número al compartimento anterior y proporcionan una reserva de granulocitos que pueden ser liberados rápidamente en circunstancias diversas.

El periodo de tiempo que transcurre desde el mieloblasto hasta la formación del granulocito maduro es de 12 a 14 días. La mitad de este tiempo transcurre en el compartimento posmitótico, pero puede acortarse si existe un aumento de la demanda de granulocitos.

Tras su liberación de la médula ósea, los granulocitos pasan al torrente sanguíneo, donde aproximadamente la mitad de ellos circulan libremente, en lo que se conoce como compartimento circulante, mientras que la otra mitad se adhiere a la pared de los capilares y vénulas, en el llamado compartimento marginal, existiendo un equilibrio dinámico entre ellos modulado por la homeostasis fisiológica. Los granulocitos están presentes en la circulación sanguínea durante unas 6 horas, y posteriormente se distribuyen en los tejidos, donde, tras una vida corta de 1 a 2 días, son destruidos, como consecuencia de su envejecimiento, o eliminados por la mucosa del tubo digestivo, tras su acción defensiva.

Los mecanismos que rigen la regulación de la granulopoyesis no son del todo conocidos, aunque parece esencial la existencia de una interrelación de una serie de factores estimuladores e inhibidores, proporcionados por las células del microambiente medular. Entre estos factores estimuladores destacan cuatro: el factor de crecimiento de células madre (c-kit ligand, stem cell factor), que es una glicoproteína producida por las células del estroma medular; la interleucina 3 (IL-3); el factor de crecimiento granulomonocítico (GM-CSF) y el factor de crecimiento granulocítico (G-CSF) ⁶⁹. El factor de crecimiento de células madre estimula la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas más primitivas junto a la IL-3 y al GM-CSF y, además, interviene en el desarrollo de otros tejidos. La estimulación de la IL-3 tiene lugar en las células progenitoras pluripotentes, aunque también tiene efecto sobre los progenitores más comprometidos. La IL-3 es producida por los linfocitos T, los fibroblastos, las células endoteliales, los mastocitos y las células NK (natural killer). El GM-CSF estimula la producción de

neutrófilos, monocitos y eosinófilos, mientras que el G-CSF solo estimula la de los granulocitos neutrófilos. El GM-CSF es secretado por los linfocitos T activados, pero al igual que el G-CSF, también por fagocitos mononucleares, células endoteliales y fibroblastos, cuando estas células están activadas por determinadas citoquinas, como la IL-1, el factor de necrosis tumoral (TNF) o por endotoxinas bacterianas. Además de aumentar la capacidad proliferativa de los progenitores mieloides, el GM-CSF y el G-CSF acortan el tiempo de producción de los neutrófilos y su maduración en la médula, de tal manera que aceleran su liberación a la sangre periférica. También incrementan la producción de proteínas granulares y estimulan la liberación de proteasas y otros contenidos celulares.

Por otra parte, los factores inhibidores se conocen menos; entre ellos encontramos el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β), la proteína inflamatoria del macrófago (MIP-1 α), el TNF alfa (TNF- α), el pentapéptido P Glu-Glu-Asp-Cys-Lys y otras moléculas como las prostaglandinas, el factor plaquetario 4 y los interferones⁶⁹.

Es importante resaltar la existencia de una compleja red de factores solubles y elementos celulares que interrelacionan la granulopoyesis y el proceso inflamatorio, y modulan la respuesta granulopoyética en función de estímulos diversos.

I. F) EL NEUTRÓFILO Y LA SEPSIS.

Los neutrófilos son las células más importantes en la defensa natural del huésped contra los microorganismos, especialmente, gracias a los gránulos existentes en su citoplasma:

- Gránulos azurófilos primarios. Son lisosomas que contienen mieloperoxidasas y poderosas enzimas hidrolíticas necesarias para la destrucción de microorganismos (hidrolasas ácidas, proteasas como la proteinasa 3, la catepsina G y la elastasa;

proteínas catiónicas como lisozima, defensinas, azurocidina, proteína de aumento de permeabilidad bactericida (BPI), etc.)⁷⁰.

- Gránulos secundarios o específicos. Contienen lisozima; lactoferrina, que presenta actividad bactericida y bacterioestática contra virus, hongos y bacterias⁷¹; lipocalina 2, que también presenta propiedad microbicida; olfactomedina 4; transcobalamina I y otras sustancias que intervienen en la activación de la fagocitosis. Son peroxidasa negativos.
- Gránulos terciarios o gelatinasa. Este tipo de gránulos se movilizan cuando el neutrófilo establece el primer contacto con el endotelio activado. Contienen enzimas que degradan matriz como la gelatinasa, y receptores de membrana como CD11b/CD18, CD177, CEACAM8, etc, los cuales son fundamentales en las primeras fases de la respuesta inflamatoria del neutrófilo y la extravasación hacia tejidos inflamados⁷².
- Vesículas secretoras. No se les considera verdaderos gránulos del neutrófilo, siendo significativamente más pequeñas que éstos. Constituyen un importante reservorio de receptores asociados a membrana, como MMP25, LFA-1, CD11b/CD18, MAC-1, así como actina, proteínas de unión a actina y fosfatasa alcalina, esenciales para que el neutrófilo establezca un contacto firme con el endotelio vascular activado y complete la diapédesis hacia tejidos inflamados donde mediante quimiotaxis localiza y erradica el patógeno responsable^{72 73}.

El neutrófilo realiza fundamentalmente cuatro funciones: adhesión, quimiotaxis, fagocitosis y bacteriolisis.

- Adhesión: la migración de los neutrófilos desde la sangre hacia los tejidos consiste en un proceso activo en el que interviene un complejo conjunto de moléculas de adhesión en la membrana de los leucocitos, que se activan secuencialmente y que tienen sus correspondientes receptores en el endotelio vascular. Este mecanismo les permite rodar y adherirse con progresiva firmeza a la superficie endotelial mediante selectinas, integrinas y otras moléculas y sus receptores para finalmente atravesar la barrera endotelial⁶⁹.

- Quimiotaxis: es aquel mecanismo por el cual múltiples factores quimiotácticos (productos liberados por los microorganismos, células dañadas, IL-8, fracciones del complemento, etc) forman un gradiente químico que dirige la diapédesis de los neutrófilos a los tejidos en la dirección precisa del foco de infección o inflamación, donde se acumulan tras pasar entre las células endoteliales de la microcirculación⁶⁹.
- Fagocitosis: durante este proceso se lleva a cabo el reconocimiento de la bacteria o material extraño y su consiguiente ingestión. Dicho reconocimiento se ve favorecido en gran medida cuando el microorganismo en cuestión se encuentra opsonizado por moléculas de IgG y complemento (C3b), debido a que el neutrófilo posee receptores específicos de membrana para las mismas. Acto seguido, la membrana se invagina y simultáneamente emite pseudópodos, englobando la partícula en un fagosoma⁶⁹.
- Bacteriolisis: la formación del fagosoma atrae a los gránulos, que se unen a la misma, degranulándose. La muerte del microorganismo se produce en parte, por la acción lítica de las diferentes enzimas granulares, pero el mecanismo más importante consiste en la generación de metabolitos del oxígeno, de gran poder microbicida. El oxígeno es reducido por el fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH), formándose radicales superóxido (O_2^-), que generan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual actúa de sustrato para la mieloperoxidasa, que oxida los haluros en ácido hipocloroso y cloraminas, siendo estas últimas unos potentes microbicidas. Existe un mecanismo de detoxificación que impide que ese exceso de H_2O_2 generado destruya al granulocito y dañe los tejidos adyacentes⁶⁹.

El neutrófilo es, por tanto, una pieza fundamental en la respuesta inmune innata durante la sepsis, secretando citoquinas reguladoras, quimiocinas, y leucotrienos, endocitando patógenos y contribuyendo directamente en la destrucción de microbios⁷⁴. En la sepsis se ha observado la existencia de una desregulación en la función del neutrófilo, desembocando en una alteración de la migración dirigida de los neutrófilos al foco de

infección, donde se produce una respuesta antimicrobiana inadecuada⁷⁵. También se han descrito alteraciones cuantitativas del neutrófilo en las formas graves de sepsis. La presencia de cifras bajas de neutrófilos circulantes en pacientes con shock séptico y desenlace fatal⁷⁶ puede deberse a condiciones inmunosupresoras previas, una mayor adhesión del neutrófilo al endotelio vascular, migración a tejidos, mayor apoptosis y una producción insuficiente en médula ósea⁷⁷.

La producción de formas inmaduras del neutrófilo podría representar una necesidad de expandir neutrófilos circulantes en respuesta a una infección, así como el remplazo de neutrófilos destruidos o consumidos en los pacientes más graves. Una pérdida del balance entre formas maduras e inmaduras puede provocar respuestas ineficaces de los neutrófilos durante la sepsis⁷⁴. Se ha descrito la asociación entre la presencia de un mayor número de formas inmaduras del neutrófilo en sangre de pacientes sépticos y mal pronóstico⁷⁸, así como un mayor riesgo de mortalidad tras sufrir un shock séptico⁷⁹. Estas formas inmaduras del neutrófilo contienen proteasas, que contribuyen a la protección del huésped contra los patógenos invasores mediada por el sistema independiente del oxígeno del neutrófilo⁸⁰. Estas proteasas son eficaces en su tarea de destruir patógenos, pero también pueden ocasionar daño celular y tisular^{81 82}, pudiendo provocar la pérdida de la integridad de la barrera endotelial⁶². En este contexto, se ha relacionado la presencia de altos niveles de expresión de marcadores del neutrófilo inmaduro, como la elastasa, la mieloperoxidasa y la catepsina G, con un mayor fallo de órgano y mortalidad⁸³.

Las proteasas del neutrófilo contribuyen a una imprimación local del neutrófilo y a una destrucción bacteriana deficiente mediante su adhesión e inactivación del receptor de C5a⁸⁴, observándose una correlación entre niveles bajos de los receptores de C5a en los neutrófilos y la gravedad de la enfermedad⁸⁵. También se ha descrito la contribución de las proteasas del neutrófilo en la fisiopatología de la Coagulación Intravascular Diseminada (CID) en la sepsis, promoviendo junto con nucleosomas externalizados, la formación de trombos en los vasos sanguíneos⁸⁶.

I. G) BIOMARCADORES.

La ausencia de un síntoma guía en la sepsis hace que su diagnóstico sea complicado, y que por tanto, dispongamos de una baja sensibilidad y especificidad para detectarla. Esto puede provocar, por una parte, la no identificación de los pacientes con la consiguiente demora en el tratamiento y una mayor mortalidad; y por otra parte, el sobrediagnóstico de pacientes con el consecuente sobretratamiento con antibióticos⁸⁷.

Como ya se ha comentado, en la sepsis es fundamental el diagnóstico precoz y la rápida toma de decisiones para implementar cuanto antes las medidas terapéuticas correspondientes, algo vital para el pronóstico y la supervivencia de los pacientes. Por ello, es fundamental disponer de herramientas diagnósticas rápidas y fiables. En este sentido, la utilización de biomarcadores puede ser una importantísima alternativa a la hora de conseguir estos objetivos.

En el caso de la sepsis, durante su proceso fisiopatológico se liberan e interaccionan una gran cantidad de mediadores y moléculas que nos pueden ser útiles como marcadores tanto de diagnóstico como de pronóstico de la enfermedad.

El cultivo microbiológico sigue siendo un gran aliado a la hora de identificar la presencia de una infección así como para la guía terapéutica de la misma. Sin embargo, es un procedimiento que requiere gran inversión de tiempo y que, a menudo, genera falsos negativos⁸⁸. En los últimos años, se han desarrollado nuevas tecnologías más rápidas y con buena sensibilidad que permiten hacer un diagnóstico más individualizado. Como ejemplos más destacados, podemos citar el diagnóstico molecular, la microbiología digital y las técnicas de espectrometría de masas (MALDI-ToF y ESI-ToF). En el caso de la sepsis ante un hemocultivo positivo, se establecerá el resultado y el tratamiento utilizando el MALDI-ToF directo así como detectando ciertos genes de resistencia mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El biomarcador ideal ha de proveer tanto una alta sensibilidad como una alta especificidad, con el objetivo de detectar a todos los pacientes enfermos, evitando diagnosticar erróneamente aquéllos que no lo estén. Por ello, a lo largo de los años se han

evaluado numerosas moléculas con el fin de encontrar un buen biomarcador para la sepsis⁸⁹. En el caso de esta enfermedad, un biomarcador debería ser capaz de reflejar la presencia de infección así como la evolución de la misma y la respuesta al tratamiento⁹⁰⁹¹. Además de todo esto, debemos tener siempre en cuenta la variabilidad existente entre sujetos, que puede influir en la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores.

En esta patología existen una serie de biomarcadores clásicos que se han utilizado extensamente para el diagnóstico de infección y para evaluar el pronóstico de la enfermedad: la Proteína C Reactiva (PCR), y la Procalcitonina (PCT).

La Proteína C Reactiva es una proteína glicosilada, un reactante de fase aguda, sintetizada por los hepatocitos en el hígado estimulados por IL-6 e IL-8, en respuesta a un daño tisular o infección⁹²⁹³. Esta proteína fue descubierta en el año 1930 por William Tillet y Thomas Francis, en el suero procedente de pacientes con neumonía, en el que precipitaba una fracción (Fracción C) derivada del pneumococco⁹⁴.

El rango de normalidad para los valores en plasma de PCR se ha situado en niveles <10 mg/dl. La producción de esta proteína se ve aumentada pasadas las 4-6 horas tras la agresión inicial, pudiendo elevarse en las primeras 24-48 horas varios cientos de veces por encima de su nivel basal, manteniéndose elevada durante la fase aguda de la infección y hasta que cese la agresión⁹⁵. El punto de corte de esta proteína establecido para la detección de infección se ha fijado en torno a 10 mg/dl, con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 58%, observándose una correlación entre la concentración en plasma y la gravedad de la infección⁹⁶. La eficacia del tratamiento antibiótico puede verse reflejada en una disminución de los valores de la PCR en las primeras 48 horas⁹⁷.

La modesta especificidad de la PCR hace que sea un biomarcador con ciertas limitaciones, haciendo que en ocasiones se generen falsos positivos derivados de procesos no infecciosos con carácter inflamatorio⁹⁸. Además, su farmacocinética varía en función de las características y hábitos de vida del paciente, y posee una cinética de eliminación lenta, haciendo que su valor pronóstico sea inferior al de otros biomarcadores⁹⁹.

La Procalcitonina (PCT) es un precursor de la hormona calcitonina sintetizada fisiológicamente por las células C del tiroides¹⁰⁰. En el contexto de las infecciones

bacterianas, la secreción sistémica de la PCT es un componente de la respuesta inflamatoria, siendo sintetizada en varios tejidos neuroendocrinos extratiroides⁸⁹. Su concentración se eleva rápidamente en sangre durante una infección bacteriana grave como la sepsis, pudiéndose detectar en las primeras 2-4 horas posteriores a la agresión y alcanzando una concentración máxima entre las 24-48 horas¹⁰¹. Esto hace que su uso pueda propiciar una detección precoz de la infección así como una monitorización de su evolución y respuesta al tratamiento¹⁰².

La evolución de la concentración de esta proteína durante una enfermedad bacteriana grave se debe a que las endotoxinas y exotoxinas bacterianas impiden la hidrólisis de la Procalcitonina a calcitonina, aumentando, por tanto, los niveles de la Procalcitonina¹⁰³. Sin embargo, esta elevación no es exclusiva de las infecciones bacterianas, ya que, la PCT puede elevarse también en otros escenarios como infecciones fúngicas sistémicas, traumatismos o en patologías de fallo renal¹⁰⁴. A pesar de ello, la Procalcitonina ha resultado ser superior tanto en la diferenciación entre infección y no infección¹⁰⁵ como entre infección vírica y bacteriana¹⁰⁶, presentando también una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de sepsis en comparación con otros biomarcadores¹⁰⁷.

En condiciones normales los valores en sangre de la Procalcitonina están por debajo de 0,5 ng/ml. Valores por encima de esta referencia pueden darse en pacientes con infección, pero también pueden producirse en otras patologías como enfermedades autoinmunes, traumatismos, procesos cardíacos, cirugías, quemaduras y pancreatitis¹⁰⁸. La presentación de valores de Procalcitonina por encima de 10 ng/ml se asocia a una alta probabilidad de tener sepsis grave y shock séptico¹⁰⁹.

Además, la Procalcitonina puede ayudarnos a guiar el tratamiento antibiótico y a producir su desescalada¹¹⁰. Se ha observado, además, que un descenso significativo en los niveles de Procalcitonina, puede ser un indicador útil de supervivencia en pacientes con shock séptico cuando se alcanzan concentraciones de más de 10 ng/ml en sangre, relacionándose también dichas observaciones con la puntuación en la escala SOFA¹¹¹.

Otros biomarcadores aparte de la PCR y la PCT, han sido evaluados para su potencial uso en la sepsis:

El lactato, que actualmente se ha incluido como uno de los parámetros para definir la presencia de shock séptico en los criterios SEPSIS-3^{46 47}, como consecuencia de su buena capacidad para valorar la evolución y pronóstico de los pacientes. El aumento del metabolismo anaerobio durante la sepsis da lugar a la aparición de hipoxemia e hipoperfusión tisular, lo cual se refleja en la elevación del lactato. La presencia de niveles elevados de lactato presenta una fuerte relación con una mayor mortalidad hospitalaria¹¹².

La Proadrenomedulina (proADM) también se ha estudiado por su potencial utilidad como biomarcador en la sepsis. La Adrenomedulina regula el tono vascular y la permeabilidad endotelial¹¹³, utilizándose su parte intermedia, la proADM, como biomarcador debido a su mayor estabilidad. Sus niveles se elevan en patologías cardíacas, respiratorias, renales y sepsis, siendo su concentración mínima en condiciones normales. Su producción se ve aumentada como consecuencia del estrés oxidativo, citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-1, hormonas como la angiotensina II y la aldosterona y factores de hipoxia o la hiperglucemia¹¹⁴. La Proadrenomedulina se eleva en el shock séptico como consecuencia de la disminución de su aclaramiento y el aumento de la producción de citoquinas¹¹⁵. La MR-proADM es el fragmento medio de la Proadrenomedulina, el cual es más estable y refleja directamente los niveles del péptido activo, la Adrenomedulina, que es rápidamente degradada¹¹⁶. Se ha observado que la MR-proADM es un potencial marcador de la progresión de la enfermedad en pacientes con sospecha de infección que llegan al servicio de urgencias¹¹⁷, así como un predictor de fallo de órgano en pacientes con neumonía comunitaria¹¹⁸. Por tanto, se trata de un biomarcador de diagnóstico y de pronóstico en la sepsis, debido a que la presencia de niveles elevados se asocia a mayor gravedad y mortalidad.

Las citoquinas representan otro tipo de biomarcadores asociados a la sepsis. Existe una presencia concomitante de altos niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, TNF- α y MCP-1 y citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 e IL-1RA en el momento del diagnóstico en formas graves de sepsis⁷⁴. También se ha descrito que esa presencia en el paciente con sepsis tanto de citoquinas proinflamatorias como antiinflamatorias, combinadas en forma de score, se asocia a un peor pronóstico¹¹⁹.

Hasta ahora se han estudiado en la sepsis más de 180 biomarcadores, lo cual se ve reflejado en el gran número de estudios al respecto^{120 121 122}. A pesar de ello, no se ha

encontrado, hasta la fecha, un único biomarcador con la suficiente sensibilidad y especificidad para su uso clínico.

En este sentido, la transcriptómica ha demostrado ser una herramienta de descubrimiento muy útil para la mejora del diagnóstico y pronóstico de la sepsis^{83 123 124 125 126}. Sin embargo, la transcriptómica hasta hace poco se basaba en tecnologías complejas, que limitaban su utilización a la investigación (microarrays, secuenciación) o tecnologías de difícil estandarización, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real^{127 128}. Esto se ha solventado con la evolución de tecnologías como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en concreto, PCRs de última generación, como la PCR digital, que se describirá más adelante¹²⁹.

Por otra parte, la proteómica se presenta como un instrumento fundamental en la investigación biomédica, tanto para desarrollar herramientas de diagnóstico y pronóstico, como para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el diseño de fármacos y vacunas. La evaluación de biomarcadores de naturaleza proteica es técnicamente más sencilla que para aquellos de origen transcriptómico. El desarrollo de dispositivos “point of care” puede contribuir a implementar este tipo de biomarcadores en la rutina clínica¹³⁰.

I. H) LAS TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y SU EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO.

La transcriptómica se ocupa del estudio del conjunto de ácidos ribonucleicos (ARN) o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo. Existen varios tipos de ARN, pero el más importante es el ARN mensajero (ARNm), debido a que es esencial para la generación de proteínas¹³¹.

El ARNm se transcribe a partir de una secuencia de ADN, mediante la acción de la ARN polimerasa. Esta enzima sintetiza una secuencia de ARNm, la cual se transporta al citoplasma, donde los ribosomas se encargan de traducir su secuencia y ensamblar los distintos aminoácidos, formando una proteína. Casi todas las células contienen los mismos genes, sin embargo, cada tipo celular puede presentar un transcriptoma diferente. Esto quiere decir que cada tipo celular puede activar o reprimir la expresión de determinados genes, generando un patrón de expresión génica específico. Además, los patrones de expresión génica pueden variar en el tiempo, dependiendo de la situación funcional en la que se encuentren las células, por ejemplo, en la salud y en la enfermedad. Así, si se compara el transcriptoma completo de una muestra biológica de individuos sanos y enfermos se podría llegar a establecer el patrón de expresión génica que se asocia a una patología concreta.

Por tanto, el transcriptoma humano completo permite comprender cómo funciona en condiciones normales una célula o tejido y también ayuda a entender cómo pueden contribuir a la fisiopatología de una determinada enfermedad los cambios en el nivel normal de expresión de un gen o conjunto de genes, y en consecuencia, identificar posibles dianas terapéuticas.

Así pues, la transcriptómica brinda numerosas aplicaciones de cara a la clínica^{132 83}, útiles en enfermedades como la sepsis, permitiendo realizar una estratificación de pacientes, o el descubrimiento de biomarcadores tanto diagnósticos, como pronósticos, así como también la identificación de posibles dianas terapéuticas.

Algunas tecnologías como los microarrays y el RNA-seq permiten estudiar el transcriptoma completo, sin embargo, son técnicas muy complejas y su tiempo de realización es elevado, impidiendo que puedan aplicarse a la rutina clínica. Por ello, son herramientas utilizadas como técnicas de descubrimiento.

Por otro lado, existe otra tecnología, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite cuantificar de forma más sencilla y rápida, los niveles de expresión de un número limitado de genes, siendo más viable su traslación a la clínica. La PCR fue desarrollada en el año 1983 por Kary Mullis, llevando a cabo el aislamiento y amplificación de

determinados fragmentos de ADN gracias a la acción de la ADN-polimerasa, permitiendo la detección de pequeñas cantidades específicas de ADN o ARN¹³³. Para poder detectar ARN, se necesita realizar previamente el paso que transforma el ARN en ADN copia de cadena simple (ADNc) mediante la acción de la enzima transcriptasa inversa, que es una ADN polimerasa dependiente de ARN. Una vez generada esa nueva cadena de ADNc ya se puede amplificar y detectar mediante la PCR.

Durante todo este tiempo, la PCR ha ido evolucionando notoriamente gracias a los avances en el campo de la biología molecular:

- La primera generación de PCR, conocida como PCR convencional, detecta el producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. Como resultado de esto, se obtiene una medición cualitativa, se puede afirmar si se ha detectado un transcrito o no, pero no la cantidad de éste en ninguno de los puntos de la reacción.
- La segunda generación, conocida como PCR cuantitativa a tiempo real (q PCR), detecta mediante sondas fluorescentes la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado, permitiendo medir así la amplificación del producto mientras progresa la reacción. Se obtiene, por tanto, una medición cuantitativa relativa, puesto que determina la cantidad de copias detectadas utilizando una curva de referencia. Por este último motivo, puede verse afectada por diversos factores como la eficiencia de la reacción o el ruido de fondo.
- La tercera generación, conocida como PCR digital, consiste en una combinación de las anteriores, manteniendo el uso de sondas fluorescentes para conocer los niveles de expresión de un determinado gen, pero de una forma más precisa, reproducible y sensible que las técnicas de PCR anteriores, con tasas de error menores¹³⁴. Esta técnica brinda una cuantificación absoluta, realizando una lectura de punto final (positivos o negativos), pero ofreciendo una medida exacta de las copias detectadas sin necesidad de utilizar una curva patrón, haciéndola una herramienta muy interesante y muy útil a la hora de realizar análisis de expresión génica.

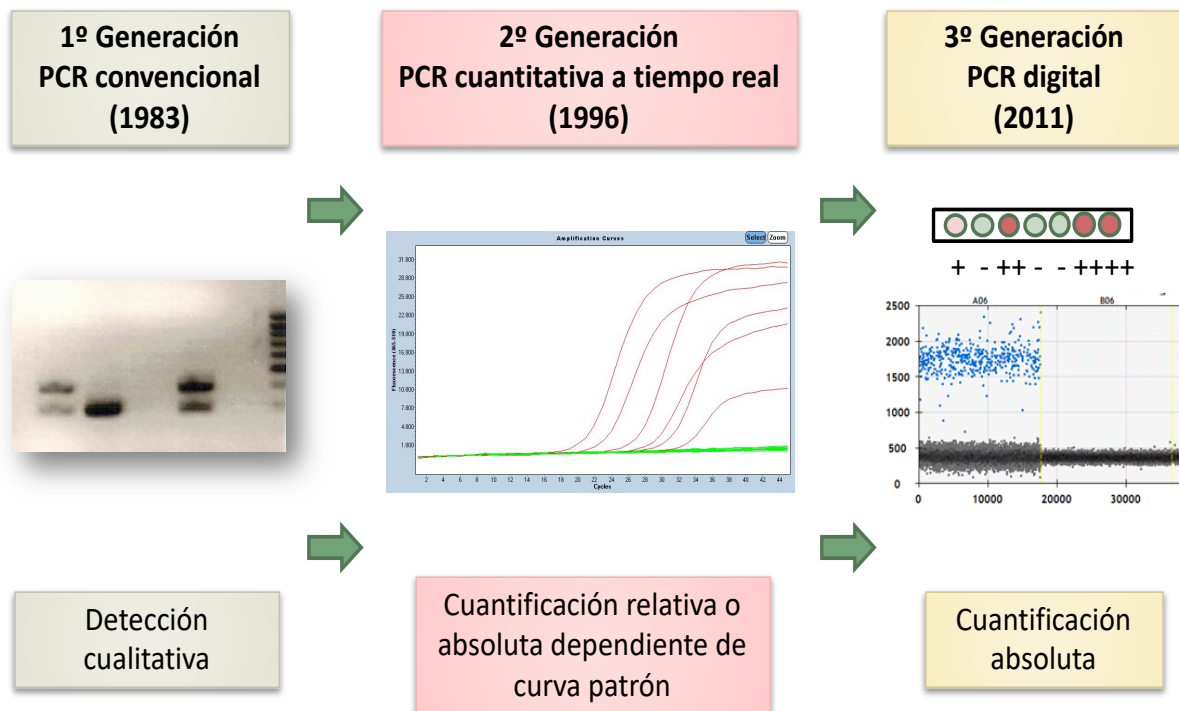


Figura 4. Evolución de la PCR a lo largo del tiempo. Adaptado del capítulo de Almansa R., Martín-Fernández M. y Bermejo-Martín J.F. “Metodología básica de investigación biomédica” para Editorial Médica Panamericana.

El fundamento de esta tecnología se basa en la partición de la muestra de ADN o ADNc en aproximadamente 20.000 gotas, realizando, en cada una de esas particiones, reacciones de PCR individuales en paralelo. Algunas de estas particiones contendrán la molécula diana y, por tanto, serán positivas y habrá amplificación, mientras que otras no contendrán esa molécula diana siendo negativas. Además, es capaz de identificar la cantidad de moléculas de ADNc presentes en cada partición, todo esto determinado en función del nivel de fluorescencia en cada partición¹³⁵.

Esta tecnología ofrece un papel fundamental en el análisis de la expresión génica puesto que permite la cuantificación absoluta de los niveles de expresión de forma directa y precisa, siendo de especial utilidad cuando los transcritos son poco abundantes o las muestras son complejas^{134 135}.

Por tanto, esta técnica será una de las herramientas clave que emplearemos en este trabajo para identificar posibles biomarcadores del neutrófilo en sangre, y evaluar su papel en el diagnóstico, la estratificación de riesgo y el pronóstico de mortalidad en la infección.

II. JUSTIFICACIÓN

Justificación

La sepsis es una enfermedad con una gran prevalencia en el entorno quirúrgico, causando una elevada morbimortalidad. En concreto, la sepsis quirúrgica supone un tercio del total de casos de sepsis. La elevadísima incidencia y mortalidad, en sus formas más graves, de esta patología a nivel mundial, hace que sea un problema de primer orden y que su diagnóstico y pronóstico sean de carácter prioritario.

Al tratarse de una enfermedad tiempo-dependiente es fundamental realizar un diagnóstico de la forma más precoz posible. La ausencia de un síntoma guía en esta enfermedad dificulta sobremanera su diagnóstico, provocando un retraso en el mismo y en el consiguiente tratamiento y, por tanto, empeorando la evolución y el pronóstico en estos pacientes. En cuanto a la valoración de la gravedad y pronóstico de estos pacientes se realiza empleando escalas clínicas, cuyos parámetros son complejos, restringiendo su uso a las unidades de cuidados críticos, y siendo éstas subjetivas, pudiendo variar en función del clínico que las valore. Parece fundamental, por tanto, buscar alternativas que puedan mejorar las herramientas existentes en la actualidad y proporcionar un mejor rendimiento a la hora de realizar el diagnóstico y de valorar la evolución y el pronóstico de los pacientes con sepsis.

En este sentido, la puesta a punto de biomarcadores a través de tecnologías punteras, rápidas y aplicables a la rutina clínica puede ser una estrategia de gran utilidad a la hora de solventar estas dificultades. Por ello, es esencial evaluar qué combinaciones de biomarcadores resultan más útiles ante cada situación clínica. En el contexto de la sepsis quirúrgica se ha demostrado que el empleo de biomarcadores puede ayudar en el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, a día de hoy no disponemos de un biomarcador lo suficientemente sensible y específico para diagnosticar esta enfermedad ni para valorar su evolución y pronóstico.

Durante la sepsis se producen una serie de eventos fisiopatológicos tales como la granulopoyesis de emergencia, la degranulación de los neutrófilos y el daño endotelial. La disfunción endotelial precede al fallo de órgano y juega un papel crucial en su patogénesis, incrementando la permeabilidad vascular, promoviendo la activación de la cascada de la coagulación, edema tisular y comprometiendo la perfusión de órganos vitales⁵⁰. En la sepsis se ha observado la existencia de una desregulación en la función del neutrófilo, así como de alteraciones cuantitativas del neutrófilo en las formas graves. Una pérdida del balance entre formas maduras e inmaduras puede provocar respuestas ineficaces de los neutrófilos durante la sepsis⁷⁴. Las proteasas del neutrófilo, que contribuyen a la protección del huésped contra los patógenos invasores, pueden ocasionar daño celular y tisular^{81 82}, pudiendo provocar la pérdida de la integridad de la barrera endotelial⁶².

Por tanto, en este trabajo, se ha querido indagar en el papel que podrían jugar diferentes biomarcadores relacionados con la granulopoyesis de emergencia, el daño endotelial y la degranulación de los neutrófilos en el diagnóstico, la estratificación de gravedad y el pronóstico de la infección. De esta manera, se podría conseguir una combinación de biomarcadores que nos permitiera describir cada escenario clínico a lo largo de todo el espectro de la infección, pudiendo mejorar así el diagnóstico de la sepsis, así como evaluar la evolución de la misma a un shock séptico y, finalmente, enriquecer la capacidad de pronóstico de la misma.

III. HIPÓTESIS

Hipótesis

La sepsis es una enfermedad caracterizada por la presencia de diversas alteraciones fisiopatológicas como la granulopoyesis de emergencia, la degranulación del neutrófilo o el daño endotelial. Cuantificar la expresión de genes mediante PCR digital y de proteínas mediante tecnología Luminex, relacionados con estos eventos fisiopatológicos, podría ser una herramienta de utilidad para el diagnóstico, la estratificación por gravedad y el pronóstico de pacientes quirúrgicos con infección.

IV. OBJETIVOS

IV. A) OBJETIVOS PRINCIPALES

- Evaluar si la cuantificación de niveles de expresión en sangre de genes que codifican proteasas del neutrófilo mediante PCR digital permite realizar un diagnóstico diferencial de sepsis en pacientes quirúrgicos.
- Evaluar si la cuantificación de niveles de expresión en sangre de genes involucrados en la granulopoyesis de emergencia mediante PCR digital permite estratificar por gravedad a pacientes quirúrgicos con infección.
- Evaluar si la cuantificación de niveles de proteínas en plasma relacionadas con la degranulación del neutrófilo mediante tecnología Luminex permite estratificar por gravedad a pacientes quirúrgicos con infección.
- Evaluar si la cuantificación de niveles de proteínas en plasma involucradas en el daño endotelial mediante tecnología Luminex permite estratificar por gravedad a pacientes quirúrgicos con infección.
- Evaluar si la cuantificación de niveles de expresión en sangre de genes involucrados en la granulopoyesis de emergencia mediante PCR digital permite predecir el pronóstico de pacientes quirúrgicos con infección y fallo de órgano.

IV. B) OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Implementar dos estudios prospectivos multicéntricos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid (HURH) y el Hospital Clínico de Salamanca (HUSA).
- Recoger muestras de sangre y datos clínicos sobre gravedad, evolución clínica y pronóstico de pacientes quirúrgicos.
- Desarrollar y poner a punto un método para la cuantificación de niveles de expresión de genes de la granulopoyesis de emergencia basado en la PCR digital.
- Difundir los resultados en publicaciones científicas internacionales y congresos del área de la infección y sepsis.
- Proteger los resultados mediante la solicitud de una patente.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Por una parte, se llevó a cabo un estudio observacional prospectivo donde se reclutaron pacientes quirúrgicos ingresados en la planta de los servicios de Cirugía General, Unidades de Reanimación y de Cuidados Críticos del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid y Hospital Clínico Universitario de Valladolid durante el periodo de abril de 2013 a enero de 2016 y que desarrollaron signos de infección, así como también pacientes quirúrgicos control sin infección.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se reclutaron pacientes quirúrgicos con infección, sepsis o shock séptico de los servicios de Cirugía General y Anestesiología y Reanimación (REA) de los tres centros participantes (Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid y Hospital Clínico Universitario de Salamanca) durante el periodo comprendido entre enero de 2017 y enero de 2019.

A la hora de recoger los datos clínicos basados en parámetros demográficos, bioquímicos, hematológicos, radiológicos y microbiológicos, se empleó una hoja específica de recogida de datos en los tres centros participantes. Además, se reclutaron donantes sanos con características similares en cuanto a edad y sexo procedentes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

• Pacientes

Se reclutaron dos cohortes de pacientes diferentes: una cohorte inicial llamada cohorte I, para evaluar las diferencias entre pacientes quirúrgicos con sepsis y pacientes quirúrgicos sin infección, y una segunda cohorte llamada cohorte II, para evaluar el papel de los biomarcadores tanto en la estratificación de los pacientes quirúrgicos a lo largo de todo el espectro de gravedad de la infección, como en el pronóstico de mortalidad.

- Cohorte I: se reclutaron prospectivamente un total de 101 pacientes adultos (≥ 18 años) hospitalizados en el servicio de Cirugía General o en las Unidades de Reanimación Quirúrgica de los hospitales participantes, diagnosticados de sepsis (de acuerdo a la definición propuesta por “the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference”) ^{36 136} desde Abril de 2013 hasta Enero de 2016. Se reclutó también un grupo control constituido por 53 pacientes quirúrgicos sin signos de infección. Finalmente, se reclutaron 16 donantes de sangre, todos ellos con una composición en cuanto a edad y sexo similar a la de los pacientes. Se utilizó un protocolo estándar de recogida de datos clínicos, incluyendo la historia clínica, examen físico, datos demográficos, análisis hematológico, bioquímico, microbiológico y pruebas radiológicas. Las decisiones de tratamiento se tomaron de forma individual no estandarizada por un médico especialista.

- Criterios de inclusión: pacientes quirúrgicos \geq de 18 años de edad con signos de infección y sospecha de sepsis que ingresaron en las plantas de los servicios de Cirugía General o REA del Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid y del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

- Grupo control sano: pacientes sanos donantes del banco de sangre.
- Grupo control de pacientes quirúrgicos: pacientes quirúrgicos ingresados sin signos de infección.
- Grupo casos de pacientes quirúrgicos con sepsis: pacientes quirúrgicos reclutados en las primeras 12h desde el inicio de los signos de infección, sospecha o confirmación de sepsis (de acuerdo a la definición propuesta por “the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference”) ^{36 136}.
- Grupo casos de pacientes quirúrgicos con shock séptico: pacientes quirúrgicos ingresados con diagnóstico de sepsis, que requieren la administración de fármacos vasoconstrictores, o fallo orgánico grave (de acuerdo a la definición

propuesta por “the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference”) ^{36 136}.

- Criterios de exclusión: pacientes menores de edad, o bien que no firmen el consentimiento informado.

- Cohorte II: se reclutaron 252 pacientes adultos (≥ 18 años) hospitalizados en los servicios de Cirugía General o en las Unidades de Reanimación Quirúrgica de los hospitales participantes, diagnosticados de infección (de acuerdo a la definición propuesta por “US Centers for Disease Control and Prevention National Surveillance”), sepsis o shock séptico (de acuerdo a las definiciones propuestas en el consenso SEPSIS-3), prospectivamente en el estudio, desde enero de 2017 hasta enero de 2019. Finalmente, se reclutaron 16 donantes de sangre, todos ellos con características de edad y sexo similares a las de los pacientes reclutados para el estudio. Se utilizó un protocolo estándar de recogida de datos clínicos, incluyendo la historia clínica, examen físico, datos demográficos, análisis hematológico, bioquímico, microbiológico y pruebas radiológicas. Las decisiones de tratamiento se tomaron de forma individual no estandarizada por un médico especialista.

Se definieron los siguientes criterios para la selección de pacientes:

- Criterios de inclusión: pacientes quirúrgicos \geq de 18 años de edad con signos de infección, sepsis o shock séptico, que ingresaron en las plantas de los servicios de Cirugía General o REA del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, Hospital Clínico Universitario de Valladolid y Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

- Grupo control sano: donantes sanos del banco de sangre.
- Grupo control de pacientes quirúrgicos: pacientes quirúrgicos ingresados en estas unidades de hospitalización y que no presentaron signos de infección.
- Grupo casos de pacientes quirúrgicos con infección: pacientes quirúrgicos reclutados en las primeras 12h desde el inicio de los signos de infección (de acuerdo a la definición propuesta por “US Centers for Disease Control and Prevention National Surveillance”).

- Grupo casos de pacientes quirúrgicos con sepsis: pacientes quirúrgicos ingresados con diagnóstico de sepsis, basado en las definiciones publicadas en el consenso SEPSIS-3 (infección y 2 puntos en la escala SOFA).
 - Grupo casos de pacientes quirúrgicos con shock séptico: pacientes quirúrgicos ingresados con diagnóstico de shock séptico, basado en las definiciones publicadas en el consenso SEPSIS-3 (sepsis con presencia de hipotensión mantenida, uso de vasopresores y niveles de lactato por encima de 2 mmol/L).
- Criterios de exclusión: pacientes menores de edad, o bien que no firmen el consentimiento informado.

Se utilizó una tercera cohorte de pacientes de un estudio previo de microarrays para realizar una retrovalidación de parte de los resultados. Esta cohorte estaba constituida por un total de 72 pacientes adultos (≥ 18 años) hospitalizados en la Unidad de Reanimación Quirúrgica de uno de los hospitales participantes (Hospital Clínico Universitario de Valladolid), con el diagnóstico de infección con fallo de órgano (de acuerdo a la definición de infección propuesta por “US Centers for Disease Control and Prevention National Surveillance” y la presencia de fallo de órgano definida por la escala SOFA) incluidos retrospectivamente en el estudio.

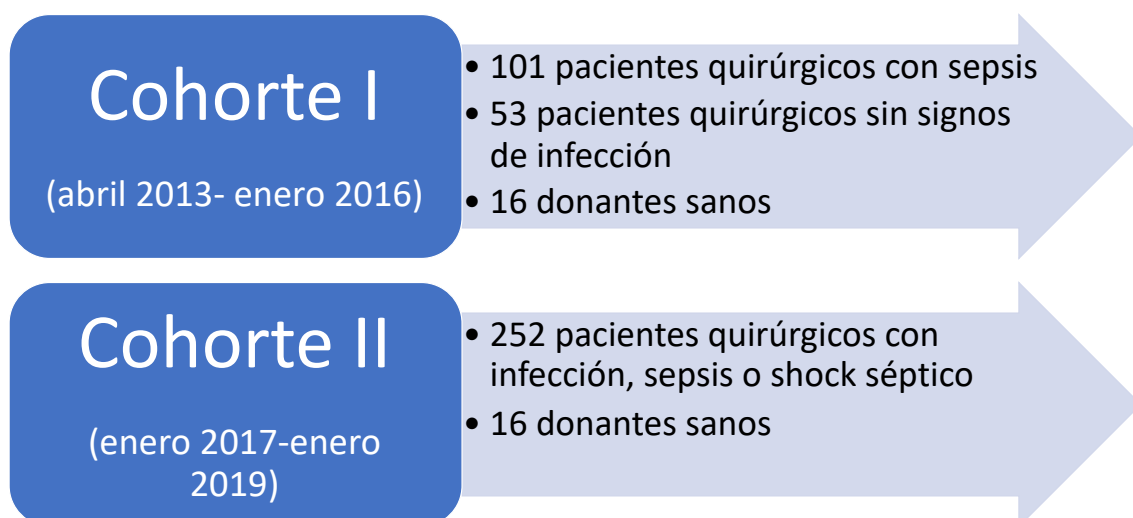


Figura 5. Esquema de las cohortes de pacientes reclutadas.

- **Comite ético y Consentimiento informado:**

Los estudios fueron aprobados por los respectivos Comités de Ética para la Investigación Clínica de los tres hospitales participantes (Hospital Universitario Río Hortega, Hospital Clínico Universitario de Valladolid y Hospital Clínico Universitario de Salamanca). Los métodos empleados se han llevado a cabo de acuerdo a la legislación española para la Investigación Biomédica del 2007, cumpliendo con los estándares de la Declaración de Helsinki. El consentimiento informado escrito fue obtenido de todos los pacientes participantes o bien de sus familiares o representantes legales, previamente a su reclutamiento.

Selección de Biomarcadores

Se seleccionaron biomarcadores de rutas biológicas involucradas en la fisiopatología de la sepsis, como son la granulopoyesis de emergencia, la degranulación del neutrófilo y el daño endotelial.

GEN	CÉLULA	LOCALIZACIÓN PROTEÍNA
STOM BPI MPO ELANE AZU1 PRTN3 CTSG CEACAM6 DEFA4	Promielocito	Gránulos azurófilos
STOM TCN1 LTF CHIT1 MMP8 LCN2 MMP9 OLFM4 CD177	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos
MMP9 CEACAM8 CD177	Células banda	Gránulos terciarios
STOM MMP25	Células neutrofilicas segmentadas	Vesículas secretoras
STOM CD24 IL1R2 IL18R1	Mielocito y metamielocito	Membrana plásmatica

Tabla 6. Localización de los biomarcadores de granulopoyesis de emergencia y degranulación del neutrófilo

GEN	CÉLULA	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN DE PROTEÍNA
Metaloproteinasa de matriz 8 (MMP8)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Coordinación del tráfico leucocitario durante la inflamación. Degradación de moléculas extracelulares y moléculas bioactivas. Degradación de colágenos tipo I, II y III.
Lactoferrina (LTF)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Regulación de la homeostasis del hierro, la defensa del huésped contra un amplio abanico de infecciones microbianas, actividad antiinflamatoria.
Proteinasa 3 (PRTN3)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Induce la activación de células epiteliales y endoteliales, macrófagos, linfocitos y plaquetas. Actividad antimicrobiana. Degrada elastina, fibronectina, laminina, vitronectina y colágenos tipo I, III y IV. Mediante la unión y activación de F2RL1/PAR-2 mejora la función de barrera endotelial y la integridad vascular durante la trans migración de neutrófilos.
Lipocalina 2 (LCN2)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Juega un papel en la inmunidad innata mediante la limitación del crecimiento bacteriano como resultado del secuestro de sideróforos de hierro.
Olfactomedina 4 (OLFM4)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Glicoproteína de matriz extracelular que facilita la adhesión celular.
Elastasa (ELANE)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Hidroliza proteínas en lisosomas especializados del neutrófilo, llamados gránulos azurófilos, así como proteínas de la matriz extracelular. Modifica las funciones de células NK, monocitos y granulocitos. Inhibe la liberación de enzima del neutrófilo dependiente de C5a y la quimiotaxis.
Mieloperoxidasa (MPO)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Responsable de actividad microbicida contra un amplio espectro de microorganismos. Produce ácidos hipohalosos, esenciales en la actividad microbicida de los neutrófilos.
Catepsina G (CTSG)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Participa en la muerte y digestión de patógenos endocitados, y en la remodelación del tejido conectivo en lugares donde se produce inflamación.
Azurocidina 1 (AZU1)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Tiene actividad antimicrobiana y quimiotáctica. Mediador inflamatorio multifuncional
Defensina alfa 4 (DEFA4)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Actividad citotóxica y antimicrobiana. Actividad corticoestática e inhibición de la producción de corticoesterona estimulada por corticotropina.
Proteína aumento permeabilidad bactericida (BPI)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Actividad antimicrobiana contra microorganismos gram negativo.
Receptor 1 de IL18 (IL18R1)	Mielocito y metamielocito	Membrana plasmática	Esencial para la transducción de señal mediada por IL-18. Involucrado en la degranulación del neutrófilo.
Molécula de adhesión celular CEA 8 (CEACAM8)	Células banda	Gránulos terciarios	Funciones inmunorreguladoras. Media adhesiones celulares heterofílicas con otras moléculas como CEACAM6. La interacción heterofílica con CEACAM8 se produce en neutrófilos activados.

Molécula de adhesión celular CEA 6 (CEACAM6)	Promielocito	Gránulos azurófilos	Juega un papel en la adhesión celular.
Molécula CD24 (CD24)	Mielocito y metamielocito	Membrana plasmática	Modula el desarrollo y señales de diferenciación en granulocitos maduros y células B.
Transcobalamina (TCN1)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Facilita el transporte de cobalamina dentro de las células.
Estomatina (STOM)	Promielocito, Mielocito y metamielocito y Células neutrofilicas segmentadas	Gránulos azurófilos, específicos, vesículas secretoras y membrana plasmática	Regulación de la actividad de canales iónicos y transporte de iones transmembrana.
Receptor tipo 2 de IL1 (IL1R2)	Mielocito y metamielocito	Membrana plasmática	Se une a IL1A, IL1B e IL1R1/IL1RA y actúa como un receptor señuelo que inhibe la actividad de sus ligandos.
Molécula CD177 (CD177)	Células banda	Gránulos terciarios	Participa en la activación del neutrófilo. Puede unirse a la molécula de adhesión celular plaquetar 1 (PECAM-1) y participar en la trans migración de neutrófilos.
Chitinasa 1 (CHIT1)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Degrada quitina, quitotriosa y quitobiosa. Puede participar en la defensa contra nematodos y otros patógenos.
Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9)	Mielocito y metamielocito	Gránulos específicos	Degrada colágeno tipo IV y V. Puede jugar un papel esencial en la proteólisis local de la matriz extracelular y en la migración leucocitaria.
Metaloproteinasa de matriz 25 (MMP25)	Células neutrofilicas segmentadas	Vesículas secretoras	En respuesta a infección bacteriana o inflamación, inactiva el inhibidor proteinasa alfa 1, protector contra las enzimas proteolíticas liberadas por neutrófilos activados, facilitando así la migración transendotelial de los neutrófilos a los lugares de inflamación.

Tabla 7. Biomarcadores de granulopoyesis de emergencia y degranulación del neutrófilo.

GEN	TIPO DE PROTEÍNA	FUNCIÓN DE PROTEÍNA
Angiopoyetina-1 (ANGPT1)	Glicoproteína secretada	Inhibición de la permeabilidad endotelial
Endocan (ESM1)	Proteína secretada	Promueve el desarrollo angiogénico
Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1)	Glicoproteína superficie celular	Su acoplamiento promueve el ensamblaje de las copas apicales del endotelio durante la migración transendotelial de los leucocitos
Selectina-E (SEL-E)	Glicoproteína superficie celular	Media en la adhesión de neutrófilos en el endotelio activado por citoquinas.
Selectina-P (SEL-P)	Receptor Ca ²⁺ dependiente	Media el rodaje rápido de leucocitos sobre las superficies vasculares durante las primeras etapas de la inflamación.
Sindecán-1 (SDC1)	Proteoglicano transmembrana	Proliferación celular, migración celular e interacciones célula-matriz
Molécula de Adhesión de Células Vasculares 1 (VCAM-1)	Sialoglicoproteína superficie celular	Adhesión celular leucocito-endotelio y transducción de la señal
Angiopoyetina-2 (ANGPT2)	Glicoproteína secretada	Disrupción de la capacidad de ANGPT1 de remodelado vascular e inducción de apoptosis celular endotelial
Trombomodulina (THBD)	Receptor de membrana tipo I específico de endotelio	Reducción de la cantidad de trombina generada
Fragmento Medio de la Proadrenomedulina (MR-ProADM)	Proteína secretada	Actividad vasodilatadora, antiinflamatoria y antimicrobiana

Tabla 8. Biomarcadores de daño endotelial.

Recogida de muestras:

Todas las muestras se recogieron dentro de las primeras 12h tras el diagnóstico. Se tomaron de cada paciente y de cada control sano dos tubos PaxGene para el análisis de expresión génica y un tubo EDTA para cuantificación de procalcitonina, PCR y biomarcadores en plasma. Todas las muestras, tanto las destinadas a la cuantificación de expresión génica, como a la de biomarcadores en plasma, PCT y PCR, fueron

almacenadas a -80°C para ser procesadas en el mismo momento y con las mismas plataformas, evitando así, sesgos debidos al análisis en diferentes plataformas.

Además, se realizaron las siguientes peticiones de rutina en los laboratorios de análisis clínicos de cada hospital (Figuras 6 y 7):

- Laboratorio de urgencia: Hemograma completo más el perfil de Urgencias al que se añade la medición de bilirrubina total, ácido láctico, GOT. Coagulación: Tiempo de Protrombina, TTPA.
- Microbiología: Cultivo guiado por foco de sospecha de infección, y/o dos hemocultivos periféricos de accesos diferentes (en los pacientes con sospecha o diagnóstico de infección).

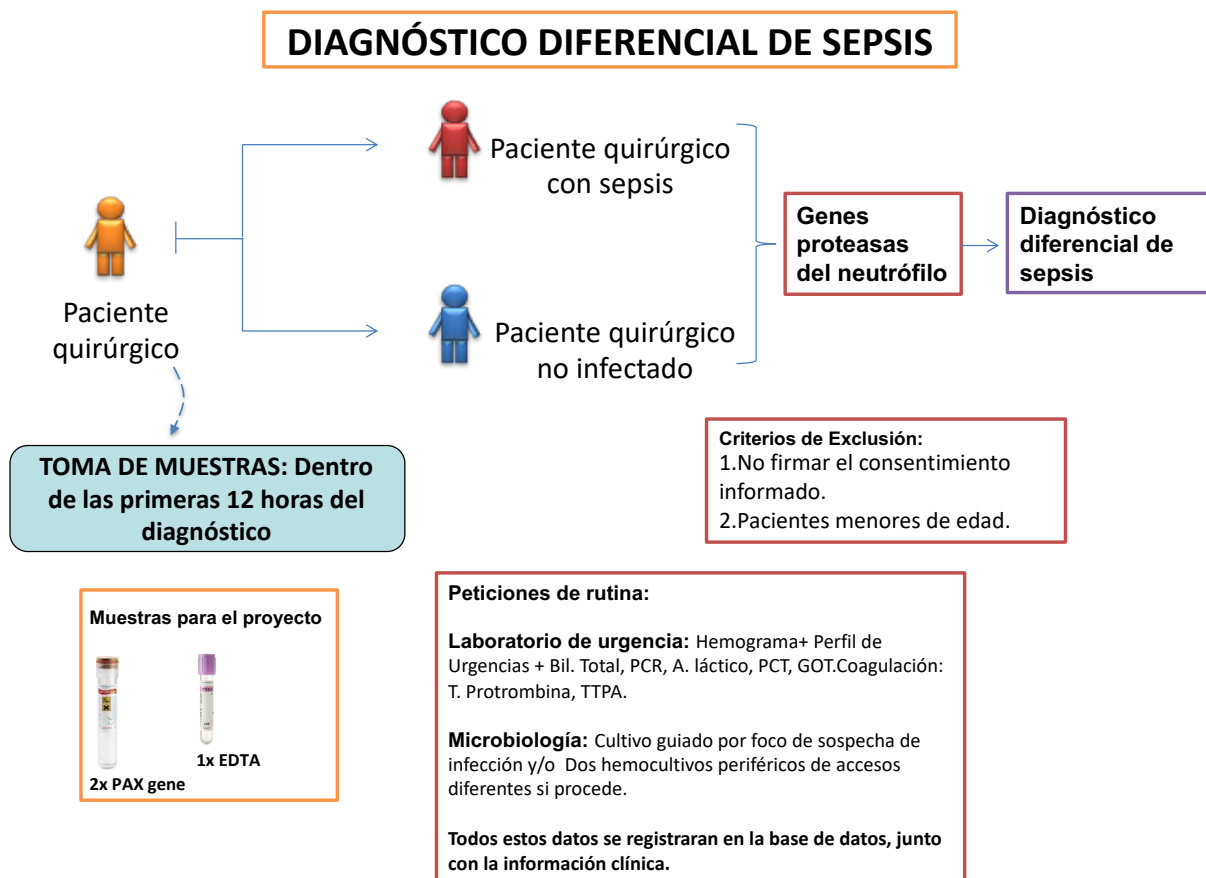


Figura 6. Esquema del reclutamiento de pacientes y muestras de la cohorte I.

ESTRATIFICACIÓN DE GRAVEDAD Y PRONÓSTICO

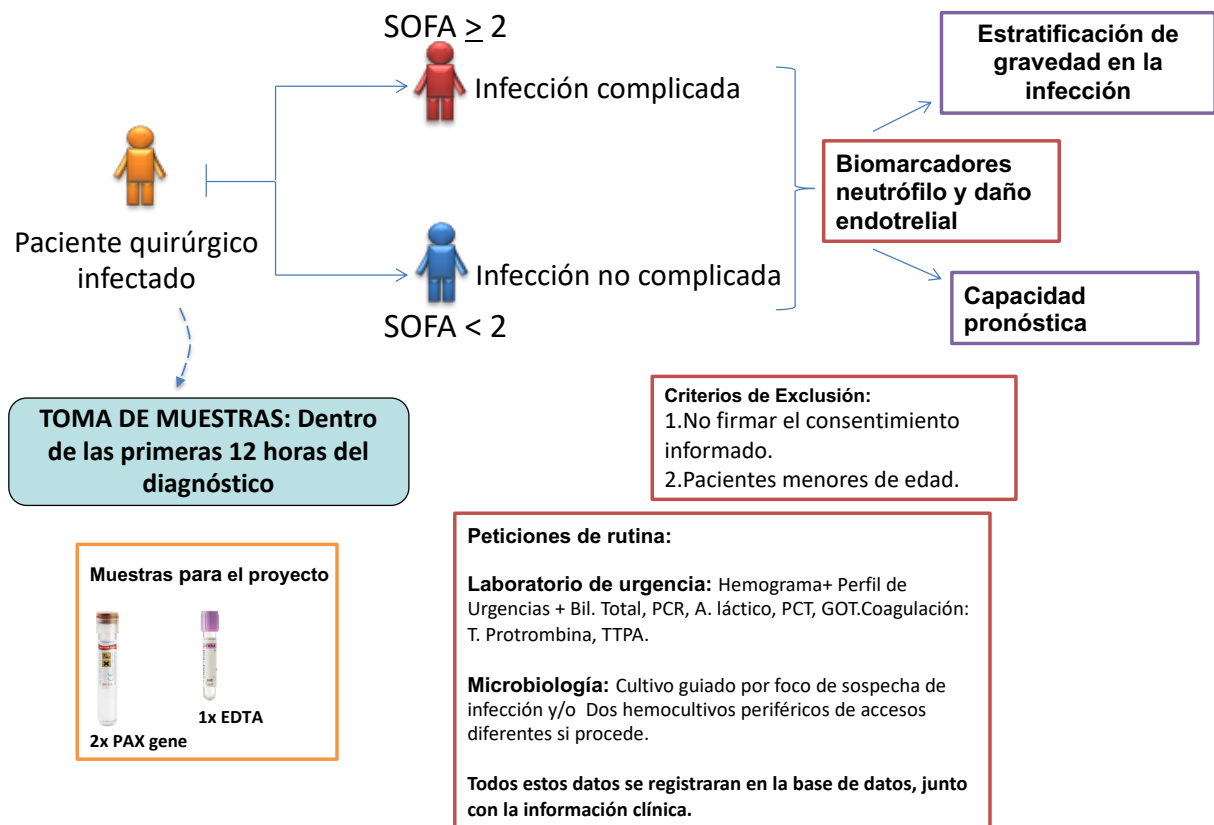


Figura 7. Esquema del reclutamiento de pacientes y muestras de la cohorte II.

Cuantificación de procalcitonina y Proteína C-

Reactiva en plasma:

La medición de procalcitonina (PCT) en plasma, se realizó mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia en un analizador químico (Cobas 6000, Roche Diagnostics Meylan, France) en las muestras recogidas, con un límite de detección de 0,02 ng/mL.

Los niveles de Proteína C Reactiva (PCR) fueron cuantificados mediante un método inmunturbidimétrico (e501 Module Analyzer, Roche Diagnostics), con un límite de detección de 0,15 mg/dL.

Cuantificación de biomarcadores transcriptómicos de granulopoyesis de emergencia:

Se recogieron muestras de 2,5 mL de sangre usando los tubos especiales de colección de sangre PaxGene, en las primeras 12 horas del diagnóstico. Las muestras de los donantes sanos fueron recogidas en el momento de la donación de sangre. Para la cuantificación de la expresión de los genes de la granulopoyesis de emergencia se realizaron los siguientes pasos:

- Extracción del ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de los tubos PaxGene empleando el equipo “PAXgene blood RNA kit” (PreAnalytix, Hombrechtikon, Suiza). El fundamento de este kit se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales. En condiciones normales, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en soluciones acuosas. Con la adición de sales a los ácidos nucleicos, se destruye esta ordenada estructura de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales crean un entorno hidrofóbico alrededor de los ácidos nucleicos. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, al pasar los ácidos nucleicos a través de una columna con membrana de sílice, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a ella, mientras que las proteínas, metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.

Para eliminar el ADN de la muestra y obtener únicamente ARN purificado se añade DNasa a la muestra. Posteriormente, el ARN se eluye de la membrana de sílice mediante tampones de elución con baja concentración en sales (ligeramente alcalinos) que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, produciendo así la liberación del ARN. Con este proceso de purificación, se obtiene ARN altamente purificado y listo para usar en procesos posteriores (figura 8).

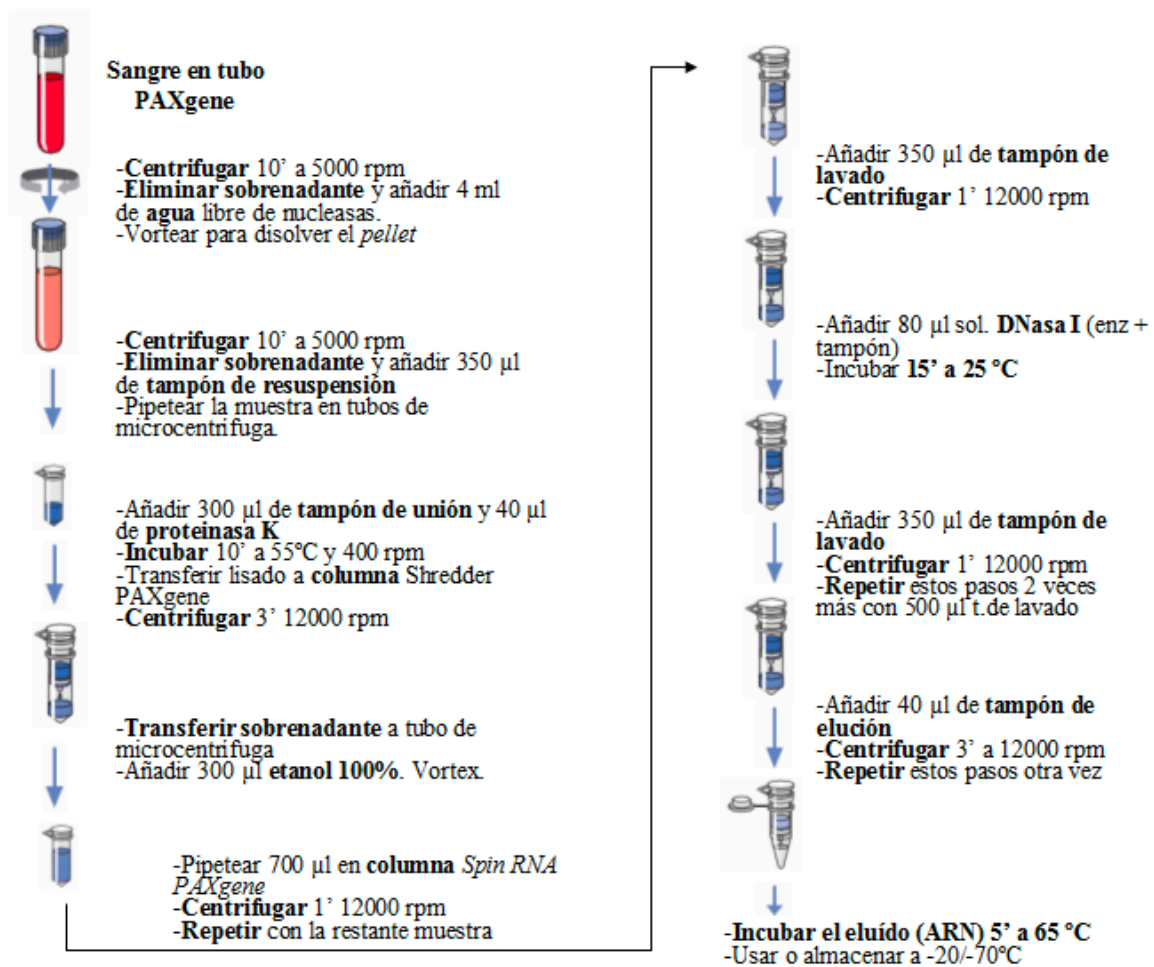


Figura 8. Pasos en la extracción de ARN desde tubo PaxGene.

- Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN se basa, al igual que para ADN, en medidas de absorbancia mediante electrofotometría, utilizando el rango de luz ultravioleta (UV). El método espectrofotométrico está basado en la medida directa de la absorción de la radiación electromagnética por parte de la muestra, siendo ésta cuantificable mediante la correlación de la Absorbancia (OD) con la concentración del ácido nucleico a determinar. En el caso del ARN, 1 OD corresponde aproximadamente a 40 µg/ml de ARN. Por tanto, el cálculo de la concentración de una muestra de ARN se estima como: $A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$ x Factor de dilución.

La cuantificación de la cantidad de ARN obtenido tras la purificación, se realizó en el espectrofotómetro de amplio espectro (220-270 nm) Nano-Drop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), a partir de 1µl de muestra.

- Evaluación de la calidad del ARN

Las reacciones de amplificación de ARN pueden variar considerablemente en función de la integridad y la pureza del ARN de partida. El ARN no debe estar degradado ni contaminado con proteínas o ADN. La pureza e integridad del ARN se estimó mediante una espectrofotometría. Mediante el mismo Nano-Drop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), se evaluó la pureza del ARN midiendo la relación existente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Este valor debe estar comprendido entre 1,8 y 2; lo que indicaría que el ARN está libre de impurezas. Si el valor es menor de 1,8 significaría que el ARN tiene algún contaminante (proteínas, fenol, etano, etc). Cuanto más bajo sea este valor, más contaminada estará la muestra.

- **RT-PCR para la generación de ADNc a partir del ARN**

El objetivo de esta técnica es generar 20 µl de ADNc de cada muestra. También se generarán 20 µl de muestra Control No-RT. Se generó ADNc de cada muestra usando el kit “iScript Advanced cDNA Synthesis Kit” de BioRad, estableciendo como cantidad de ARN de partida, 1.000 ng de ARNm, y siguiendo las indicaciones del fabricante. El volumen máximo de muestra es de 15 µl, que contengan los 1000 ng de ARN que hemos establecido.

Se introducen las muestras en el termociclador Techne TC512 (Bibby-Scientific, Staffordshire, OSA, UK) y se selecciona el programa: RT – BIORAD. Así, se obtiene finalmente el ADNc, con el que podremos seguir trabajando o bien podremos almacenarlo congelado a -80°C.

El volumen obtenido de ADNc (20 µL) se diluyó utilizando un factor de dilución 1/25, y se utilizaron 2,5 µL, es decir, 5ng de ARNm total para la cuantificación de la expresión de cada gen, según las especificaciones del fabricante.

- **PCR DIGITAL**

La expresión de los genes fue cuantificada por PCR digital mediante la plataforma BioRad QX200 ddPCR system, usando las sondas TaqMan Assay marcadas en FAM o VIC con MGB como “quencher” (Thermo Fisher/Scientific-Life Technologies, Waltham, MA) (Tabla 9), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Gen	Sonda
Metaloproteinasa de matriz 8 (MMP8)	Hs01029057_m1
Lactoferrina (LTF)	Hs00914334_m1
Proteinasa 3 (PRTN3)	Hs01597752_m1
Lipocalina 2 (LCN2)	Hs01008571_m1
Olfactomedina 4 (OLFM4)	Hs00197437_m1
Elastasa (ELANE)	Hs00236952_m1
Mieloperoxidasa (MPO)	Hs00924296_m1
Catepsina G (CTSG)	Hs00175195_m1
Azurocidina 1 (AZU1)	Hs00156049_m1
Defensina alfa 4 (DEFA4)	Hs00157252_m1
Proteína aumento permeabilidad bactericida (BPI)	Hs01552756_m1
Receptor 1 de IL18 (IL18R1)	Hs00977691_m1
Molécula de adhesión celular CEA 8 (CEACAM8)	Hs00266198_m1
Molécula de adhesión celular CEA 6 (CEACAM6)	Hs03645554_m1
Molécula CD24 (CD24)	Hs02379687_s1
Transcobalamina (TCN1)	Hs01055542_m1
Estomatina (STOM)	Hs00925242_m1
Receptor tipo 2 de IL1 (ILR2)	Hs00174759_m1
Molécula CD177 (CD177)	Hs00360669_m1
Chitinasa 1 (CHIT1)	Hs00185753_m1
Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9)	Hs00957562_m1
Metaloproteinasa de matriz 25 (MMP25)	Hs00360861_m1

Tabla 9. Referencias de las sondas utilizadas para la realización de la PCR digital.

Una vez realizada la extracción, purificación y cuantificación del ARN, así como la RT-PCR, se puede proceder a realizar la PCR. La PCR digital se llevó a cabo utilizando Supermix ddPCR para muestras (no dUTP) y reactivos estándar de BioRad. A continuación, se tiene que continuar con la generación de particiones, la amplificación y marcaje, la lectura de las particiones y la interpretación de los resultados (Figura 9):

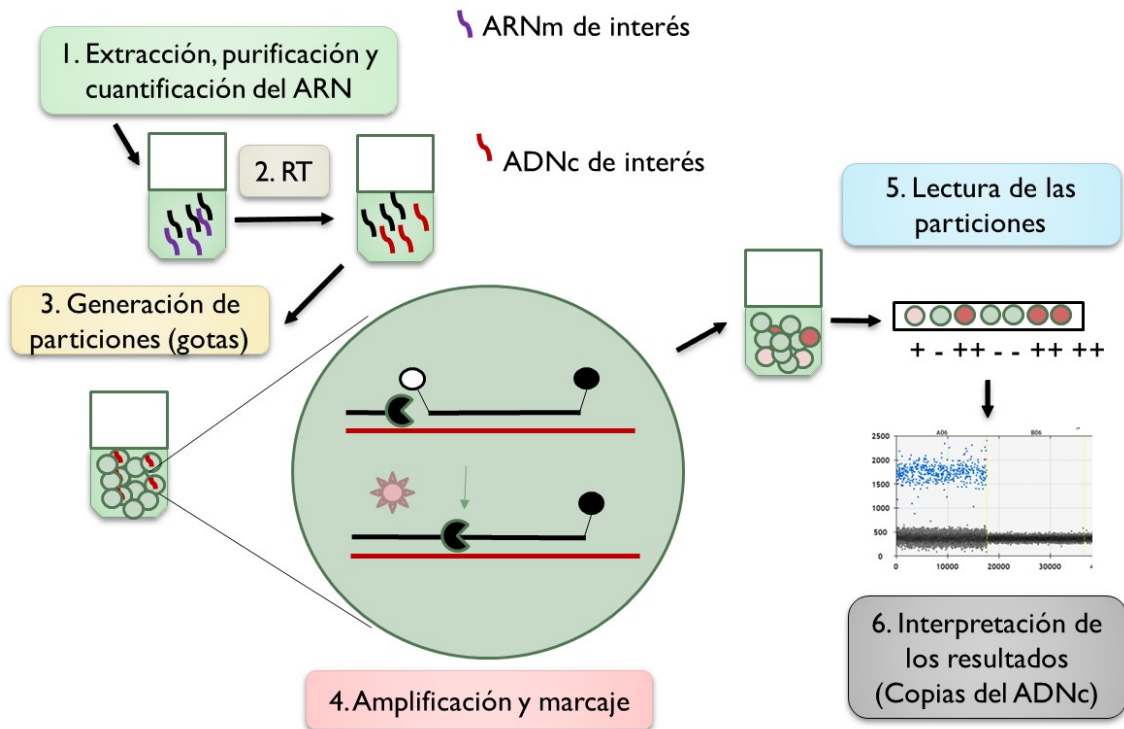


Figura 9. Pasos a seguir para realizar la técnica de PCR digital.

-Generación de particiones: esta técnica consiste en distribuir la muestra de manera aleatoria en un número elevado de particiones. Las muestras se introducen en el generador de gotas, que combinando reactivos estándar de BioRad, especialmente diseñados, y microfluídica, es capaz de dividir la muestra en 20.000 gotas, distribuyendo de forma aleatoria en las mismas el transcrito de interés, de manera que cada partición contenga cero, una o varias moléculas de ADNc (Figura 10).

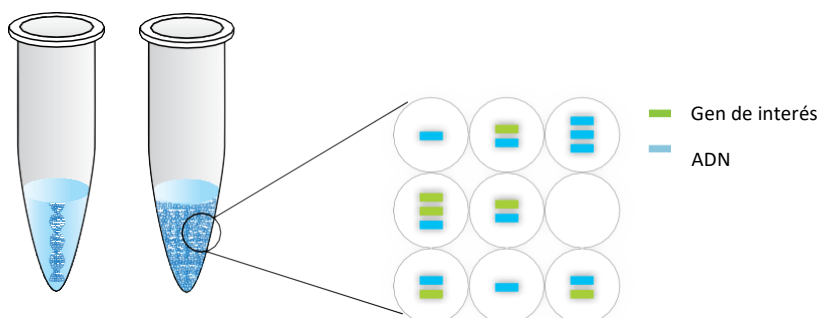


Figura 10. Generación de particiones en PCR digital (Fuente: <https://www.bio-rad.com>).

-Amplificación y marcaje: Cada partición es sometida a una reacción de amplificación de 40 ciclos en un termociclador C1000Touch Thermal Cycler (BioRad), utilizando cebadores y sondas específicas para el transcrito a amplificar y a la temperatura de anillamiento que corresponda, que en este caso fue de 56,8°C.

-Lectura de las particiones: la placa que contiene las particiones se pasa a un lector de gotas QX200 que adquiere las gotas de cada pocillo de la placa y las separa (Figura 11) para medir de forma individual cada partición por un sistema de detección de fluorescencia de doble color (FAM y VIC) (Figura 12). Las particiones positivas, que contienen al menos una copia del transcrito de interés, mostrarán más fluorescencia que aquellas particiones que sean negativas. La cantidad de moléculas de ADNc que contienen las particiones positivas se ajusta según el modelo matemático de Poisson. El lector de gotas usa al menos 10.000 de las particiones para determinar el porcentaje de gotas positivas y calcular así el número de copias de ADNc por nanogramo de ARNm inicial.

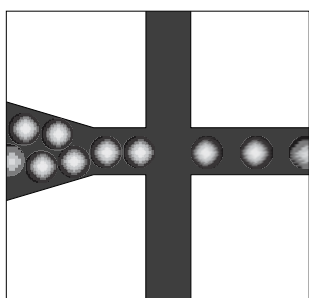


Figura 11. Separación individual de las particiones en el lector de gotas QX200 (Fuente: <https://www.bio-rad.com>).

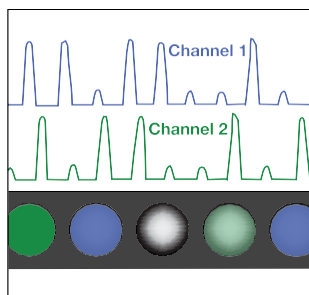


Figura 12. Lectura de fluorescencia para cada partición en dos canales en el lector de gotas (Fuente: <https://www.bio-rad.com>).

-Interpretación de resultados:

Finalmente, siguiendo todo este proceso (Figura 13), se llega a obtener una cuantificación absoluta del transcrito de interés en el volumen que se ha introducido para cada muestra en el experimento (en este caso 20 μL). Así, sin necesidad de curva patrón, con un sencillo paso que consiste en dividir el resultado de la cuantificación obtenida por el aparato entre la concentración a la que se encuentra el volumen de la muestra que se ha introducido (normalmente es una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$), se obtiene un valor absoluto en copias de ADNc por cada ng de ARNm inicial analizado.

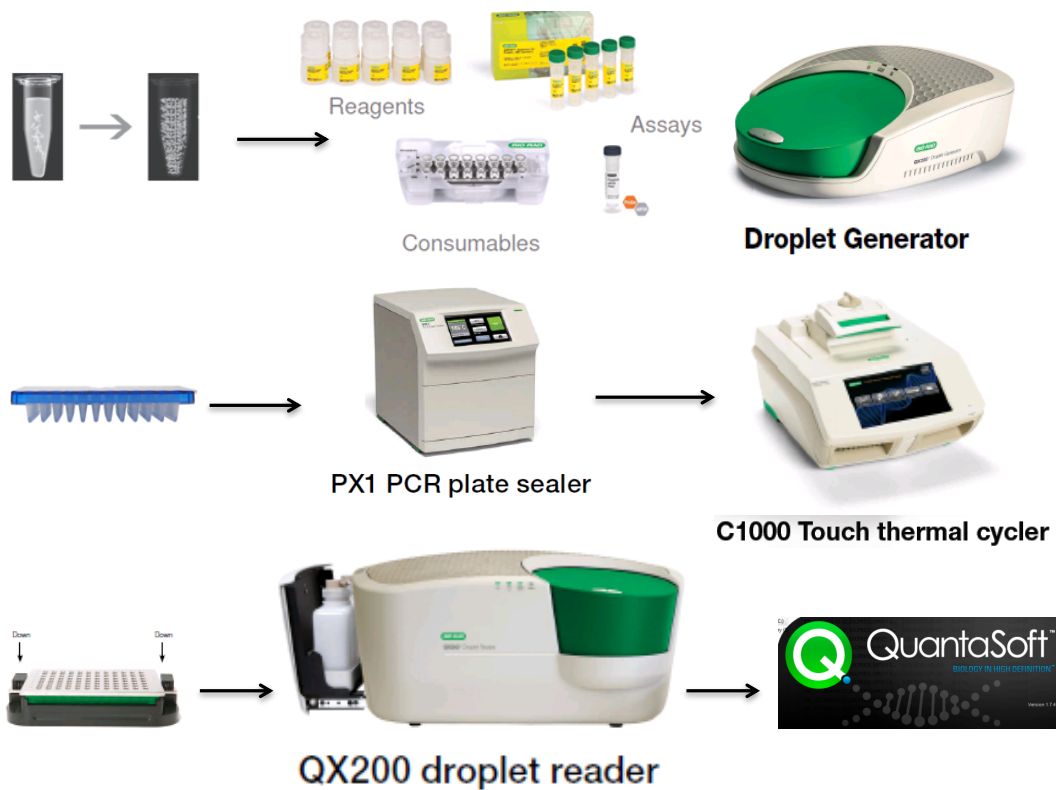


Figura 13. Flujo de trabajo en PCR digital (Fuente: <https://www.bio-rad.com>).

Cuantificación de biomarcadores proteicos de daño endotelial y degranulación del neutrófilo en plasma:

La MR-ProADM (fragmento medio de la proadrenomedulina) se cuantificó por tecnología TRACE (“Time Resolved Amplified Cryptate Emission”) usando un inmunoensayo tipo sandwich (Kryptor Compact Plus Analyser, BRAHMS, Hennigsdorf, Germany).

La cuantificación de los niveles de Angiopoyetina 1 (ANGPT1), Angiopoyetina 2 (ANGPT2), Endocan (ESM1), Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1), Selectina E (SEL-E), Selectina P (SEL-P), Sindecán 1 (SDC1), Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 (VCAM-1) y Trombomodulina (THBD) se realizó mediante tecnología multiplex, utilizando una plataforma Luminex 200 de BioRad con reactivos de R&D y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de Lipocalina 2 (LCN2), Metaloproteinasa de Matriz 8 (MMP8), Lactoferrina (LTF), Proteinasa 3 (PRTN3), Mieloperoxidasa (MPO) y Metaloproteinasa de Matriz 9 (MMP9) en plasma, se midieron mediante tecnología multiplex, utilizando una plataforma Luminex 200 de BioRad con reactivos de R&D y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Existe un gran número de técnicas útiles para el estudio de las proteínas. Hoy en día, las más aplicadas para la investigación biomédica traslacional, son técnicas convencionales como el Western Blot y el ELISA, y técnicas avanzadas como el Luminex.

- **LUMINEX:**

El desarrollo de las tecnologías de alto rendimiento ha conseguido que se pongan a punto técnicas proteómicas más avanzadas. La principal ventaja de este tipo de técnicas es que suplen el inconveniente de que en las técnicas convencionales sólo se puede estudiar un

determinado antígeno, proteína, etc. Este tipo de tecnologías, sin embargo, permiten el estudio de varias moléculas de forma simultánea en una misma muestra, lo cual supone un ahorro de tiempo, material y la posibilidad de generar un mayor volumen de datos en un único experimento.

La tecnología Luminex Bio-Plex, consiste en llevar a cabo múltiples ensayos con microesferas magnéticas, diseñadas para medir un gran número de proteínas en un volumen mínimo de muestra y en un corto período de tiempo (3-4 horas).



Imagen 1. Plataforma Luminex 200 (Fuente: <https://www.bio-rad.com>).

Esta técnica permite cuantificar numerosas proteínas y moléculas que pueden estar involucradas en multitud de respuestas fisiológicas y asociadas con una gran variedad de enfermedades, como por ejemplo, las infecciones graves.

El principio de esta técnica es similar al de un ELISA tipo sándwich, donde se produce la siguiente reacción: cada microesfera magnética con su código de color, lleva unido un anticuerpo de captura que se unirá al biomarcador de interés. Luego se añadirá un segundo anticuerpo de detección biotinilado. El compuesto que finalmente será detectado se genera con la adición de un conjugado estreptavidina-ficoeritrina, que se unirá al anticuerpo secundario, y que reportará fluorescencia que podremos cuantificar. (Figura 14).

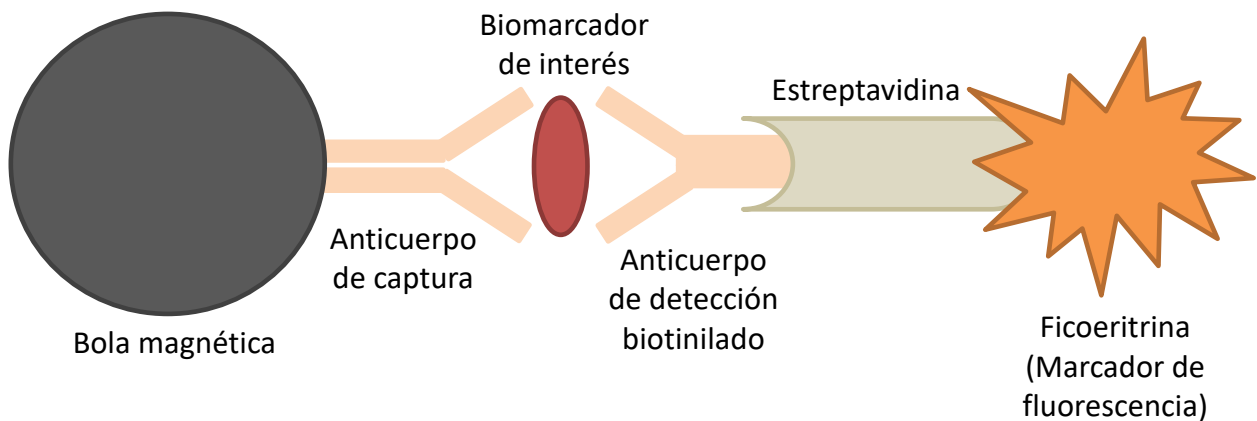


Figura 14. Principio de la técnica de Luminex. Adaptado del capítulo de Almansa R., Martín-Fernández M. y Bermejo-Martín J.F. “Metodología básica de investigación biomédica” para Editorial Médica Panamericana.

Análisis Estadístico:

-Diagnóstico diferencial de sepsis:

Para la comparación de variables cuantitativas continuas se empleó el test de Mann Whitney. Para la comparación de proporciones en variables categóricas se empleó el test de Chi Cuadrado, χ^2 .

Para calcular la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores para distinguir entre presencia / ausencia de sepsis, se utilizó el test del área bajo la curva. Se calculó el punto del área bajo la curva con el mejor balance entre sensibilidad y especificidad (“optimal operating point”) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Optimal Operating Point (OOP)} = \sqrt{(1 - \text{sensibilidad})^2 + (1 - \text{especificidad})^2}$$

Para evaluar la capacidad de los genes del neutrófilo y de la procalcitonina (PCT) para identificar presencia o ausencia de sepsis, se utilizaron modelos de regresión logística

multivariante. Las variables de confusión se eligieron mediante regresión logística univariante, seleccionando aquellas con una $p \leq 0,1$. Para estos modelos se crearon variables categóricas en base a los OOPs calculados en las áreas bajo la curva de cada biomarcador.

-Estratificación de riesgo en la infección:

Para la comparación de variables cuantitativas continuas se empleó el test de Kruskal-Wallis corregido por test post-hoc para comparaciones múltiples. Para la comparación de proporciones en variables categóricas se empleó el test de Chi Cuadrado, χ^2 .

Para evaluar la capacidad de los biomarcadores para estratificar el riesgo a lo largo de todo el espectro de la infección, se utilizaron modelos de regresión logística multivariante para diferenciar bien entre infección y sepsis o entre sepsis y shock séptico. Las variables de confusión de los dos modelos se eligieron mediante regresión logística univariante, seleccionando aquellas con una $p \leq 0,1$.

Para calcular la sensibilidad y especificidad de aquellos biomarcadores que fueron significativos en los modelos de regresión, se utilizó el test del área bajo la curva para distinguir entre infección y sepsis y entre sepsis y shock séptico.

-Pronóstico de mortalidad:

Para la comparación de variables cuantitativas continuas se empleó el test de Mann Whitney. Para la comparación de proporciones en variables categóricas se empleó el test de Chi Cuadrado, χ^2 .

Para calcular la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores para distinguir supervivientes de no supervivientes, se utilizó el test del área bajo la curva. Se seleccionaron así 11 genes con un área bajo la curva $> 0,7$. Se calculó para cada uno de estos genes el punto del área bajo la curva con el mejor balance entre sensibilidad y especificidad, “optimal operating point”, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Optimal Operating Point (OOP)} = \sqrt{(1 - \text{sensibilidad})^2 + (1 - \text{especificidad})^2}$$

Se construyó así un escore aditivo utilizando los OOPs de los 11 genes seleccionados. Esto se llevó a cabo construyendo variables categóricas utilizando los OOPs de cada gen, de tal manera que, a cada paciente con niveles de expresión de cada gen por encima del OOP correspondiente se le otorga un 1, de forma que en el escore aditivo, cada paciente podrá tener una puntuación de 0 a 11 puntos.

Para evaluar la asociación entre este escore aditivo y el riesgo de mortalidad se utilizó un modelo de regresión logística multivariante. Las variables de confusión se eligieron mediante regresión logística univariante, seleccionando aquellas con una $p \leq 0,1$.

Para calcular la existencia de diferencias entre las áreas bajo la curva se utilizó el test de Hanley & McNeil.

VI. RESULTADOS

Resultados

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE SEPSIS.

Características clínicas de los pacientes:

Para este propósito, se emplearon los pacientes reclutados en la cohorte I, pacientes quirúrgicos sépticos y pacientes quirúrgicos no infectados.

El perfil de varón de edad avanzada fue el predominante tanto en el grupo de sepsis como en el grupo de controles quirúrgicos, siendo los pacientes con sepsis mayores que los del otro grupo. En cuanto a las comorbilidades, su prevalencia fue similar en ambos grupos, a excepción de la diabetes mellitus, que fue más frecuente en el grupo de sepsis (Tabla 10).

		Sepsis (n=101)	Controles Quirúrgicos (n=53)	p valor
Características	Edad [años, mediana (IQR)]	72,00 (15)	64,00 (18)	0,006
	Hombres [% (n)]	65,35 (66)	71,70 (38)	n.s.
Comorbilidades, % (n)	Hipertensión arterial	55,45 (56)	60 (30)	n.s.
	Enfermedad cardiovascular crónica	47 (47)	32,65 (16)	n.s.
	Enfermedad respiratoria crónica	14,85 (15)	21,15 (11)	n.s.
	Enfermedad renal crónica	14,85 (15)	2 (1)	n.s.
	Enfermedad hepática crónica	2,97 (3)	5,88 (3)	n.s.
	Enfermedad neurológica	4,95 (5)	3,77 (2)	n.s.
	Enfermedad cerebrovascular	3,96 (4)	5,66 (3)	n.s.
	Diabetes mellitus	33,66 (34)	18,87 (10)	0,005
	Cáncer	29,70 (30)	43,14 (22)	0,050
	Inmunosupresión	17,84 (17)	13,89 (5)	n.s.

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes de la cohorte I. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); n.s: no significativo.

Los pacientes con sepsis se sometieron más frecuentemente a una cirugía urgente en comparación con el grupo de controles quirúrgicos, en los que esto fue un evento inusual. El tipo de cirugía fue similar en ambos grupos, siendo la de tipo abdominal la más frecuente. Como cabría esperar, los pacientes con sepsis permanecieron más tiempo ingresados en el hospital / UCI. Ninguno de los pacientes del grupo de controles quirúrgicos falleció, mientras que casi el 25% de los pacientes con sepsis no sobrevivieron a la enfermedad (Tabla 11).

		Sepsis (n=101)	Controles Quirúrgicos (n=53)	p valor
Tipo de cirugía, % (n)	Cirugía urgente	63,36 (64)	4,76 (2)	< 0,001
	Cirugía cardio-torácica	30 (30)	39,62 (21)	n.s.
	Cirugía abdominal	62 (62)	43,40 (23)	n.s.
	Neurocirugía	1 (1)	1,89 (1)	n.s.
	Cirugía vascular	3 (3)	3,77 (2)	n.s.
	Cirugía urológica/renal	1 (1)	9,43 (5)	0,011
	Otras cirugías	3 (3)	1,89 (1)	n.s.
Evolución y pronóstico	Estancia hospitalaria [días, mediana (IQR)]	26,5 (23,5)	10,0 (7,0)	< 0,001
	Estancia en UCI [días ,mediana (IQR)]	14,0 (17,0)	4,0 (3,0)	< 0,001
	SIRS, % (n)	100 (101)	56,60 (30)	< 0,001
	Shock séptico, % (n)	61,39 (62)	n,a	n.a.
	Mortalidad a 28 días, % (n)	19,80 (20)	0	< 0,001
	Mortalidad hospitalaria, % (n)	24,75 (25)	0	< 0,001

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes de la cohorte I. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n) UCI: unidad de cuidados críticos; SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; n.a.: no aplicable; n.s: no significativo.

Los focos más comunes de infección fueron el abdominal y el respiratorio. Con respecto al origen de la sepsis, en 60 de los casos fue de origen nosocomial, y en 41 de los casos se originó en la comunidad. Los pacientes con sepsis presentaron un mayor grado de disfunción orgánica, evaluado por la puntuación en la escala SOFA y mostraron niveles más altos tanto de Proteína C Reactiva (PCR) como de Procalcitonina (PCT), así como recuentos más altos en sangre de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Tanto

los casos como los controles quirúrgicos presentaron niveles linfocitarios que oscilaban en torno a la linfopenia (<1000 linfocitos / mm³) (Tabla 12).

		Sepsis (n=101)	Controles Quirúrgicos (n=53)	p valor
Origen de la infección, % (n)	Desconocido	14,85 (15)	n.a.	n.a.
	Tracto respiratorio	18,81 (19)	n.a.	n.a.
	Abdomen	45,55 (46)	n.a.	n.a.
	Tracto urinario	4,95 (5)	n.a.	n.a.
	Herida quirúrgica	5,94 (6)	n.a.	n.a.
	Bacteriemia	4,95 (5)	n.a.	n.a.
	Otros	4,95 (5)	n.a.	n.a.
Microbiología, % (n)	Gram +	46,5 (47)	n.a.	n.a.
	Gram -	58,4 (59)	n.a.	n.a.
	Hongos	6,9 (7)	n.a.	n.a.
	Virus	2 (2)	n.a.	n.a.
	Polimicrobiano	40,6 (41)	n.a.	n.a.
Medidas al diagnóstico, [mediana (IQR)]	Escala SOFA	8 (6)	1 (3)	< 0,001
	Bilirrubina total (mg/dl)	0,75 (1,30)	0,77 (0,53)	n.s.
	Glucosa (mg/dl)	152,0 (78,0)	135,0 (55,0)	n.s.
	Plaquetas (cél/mm ³)	180000 (194,75)	155000 (740000)	n.s.
	INR	1,30 (0,42)	1,23 (0,41)	n.s.
	ScvO ₂ (%)	73,10 (19,00)	68,80 (80,00)	n.s.
	PCR (mg/L)	232,30 (169,25)	57,70 (77,70)	< 0,001
	Procalcitonina (ng/mL)	5,57 (17,51)	0,50 (0,97)	< 0,001
	Leucocitos (cél/mm ³)	14465 (10257,50)	12290 (4875,0)	0,023
	Linfocitos (cél/mm ³)	944,32 (818,64)	1008 (894,32)	n.s.
	Monocitos (cél/mm ³)	1068,48 (51887,66)	781,88 (1327,86)	n.s.
	Neutrófilos (cél/mm ³)	12337 (9220,50)	10016 (4704,5)	0,017
	Eosinófilos (cél/mm ³)	49,00 (2052,65)	12,30 (70,47)	0,019
Basófilos (cél/mm ³)	78,44 (1593,24)	28,80 (68,93)	0,006	

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes de la cohorte I. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); INR, ratio internacional normalizado; ScvO₂: saturación central venosa de oxígeno; n.a.: no aplicable; n.s.: no significativo.

En el 84% de los pacientes con sepsis (n=85) se consiguió, al menos, una identificación microbiológica positiva. En el 39,5% de los casos positivos, los cultivos correspondieron a bacilos anaerobios facultativos Gram negativo de la familia de los Enterobacteriaceae, siendo *Escherichia coli* el microorganismo más frecuente (n=31). En el 32,9% de los

casos se detectó la presencia de cocos aerobios o facultativos anaerobios Gram positivo, siendo *Staphylococcus epidermidis* (n=10) y *Enterococcus faecium* (n=10) los microorganismos más comunes. En cuanto a los hongos, éstos representaron el 6,0% de los cultivos positivos, siendo el aislamiento más frecuente *Candida albicans* (n=6). Del resto de las muestras positivas, el 21,6%, pertenecieron a otras especies microbiológicas (Tabla 13).

TIPO DE MICROORGANISMO	% (n)
GRAM NEGATIVO	39,5%
<i>Escherichia coli</i>	(31)
GRAM POSITIVO	32,9%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(10)
<i>Enterococcus faecium</i>	(10)
HONGOS	5,99%
<i>Candida albicans</i>	(6)
OTROS MICROORGANISMOS	21,6%
TOTAL AISLAMIENTOS POSITIVOS	84,2%

Tabla 13. Caracterización de la microbiología de los pacientes de la cohorte I.

Niveles de expresión de los genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo a lo largo de los diferentes grupos:

Como se puede apreciar en la figura 15, los niveles de expresión de los genes que codifican proteasas del neutrófilo, siguieron una tendencia generalizada a aumentar con la gravedad. Como se observa en la tabla 14, las concentraciones en plasma, tanto de la

PCT como de MMP8, fueron más elevadas en el grupo de controles quirúrgicos que en los controles sanos, reflejando la existencia de un proceso inflamatorio activo a nivel sistémico en los pacientes postoperados no infectados.

En la comparación contra los controles sanos, los pacientes sépticos mostraron niveles aún más elevados de todos los genes excepto de MPO, que sólo mostró diferencias significativas en el caso de los pacientes sépticos con una puntuación en la escala SOFA ≥ 8 .

Con respecto a los controles quirúrgicos, todos los genes mostraron una elevación significativa de sus niveles de expresión en los pacientes con sepsis, salvo MPO, que sólo mostró diferencias significativas en el caso de los pacientes sépticos con una puntuación en la escala SOFA ≥ 8 .

Dentro de los pacientes con sepsis, todos los genes se elevaron de forma significativa en paralelo a un aumento de la disfunción orgánica, medida por la escala SOFA.

El gen que mostró una mejor capacidad para diferenciar entre los diferentes grupos a través de sus niveles de expresión en sangre fue MMP8, mostrando diferencias significativas en todas las comparaciones entre grupos.

	Controles Sanos (0)	Controles Quirúrgicos (1)	Sepsis SOFA<8 (2)	Sepsis SOFA ≥ 8 (3)	<i>p</i> (0 vs 1)	<i>p</i> (0 vs 2)	<i>p</i> (0 vs 3)	<i>p</i> (1 vs 2)	<i>p</i> (1 vs 3)	<i>p</i> (2 vs 3)
MMP8 (c/ng)	23 [68]	125 [302]	856 [4169]	5116 [12636]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
LCN2 (c/ng)	202 [201]	316 [424]	1410 [4259]	5944 [17854]	n,s	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002
OLFM4 (c/ng)	13 [26]	28 [63]	130 [719]	816 [3231]	n,s	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003
LTF (c/ng)	115 [352]	125 [165]	448 [1260]	2464 [12835]	n,s	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001
PRTN3 (c/ng)	9 [10]	8 [15]	25 [90]	69 [293]	n,s	0,004	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,011
MPO (c/ng)	25 [15]	30 [29]	46 [97]	70 [212]	n,s	n,s	< 0,001	n,s	< 0,001	0,044
PCT (ng/mL)	0,03 [0,02]	0,50 [0,97]	1,63 [5,25]	12,09 [50,46]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabla 14. Niveles de expresión de los genes del neutrófilo en los diferentes grupos de pacientes. Mediana [Rango Intercuartil]; n.s.: no significativo.

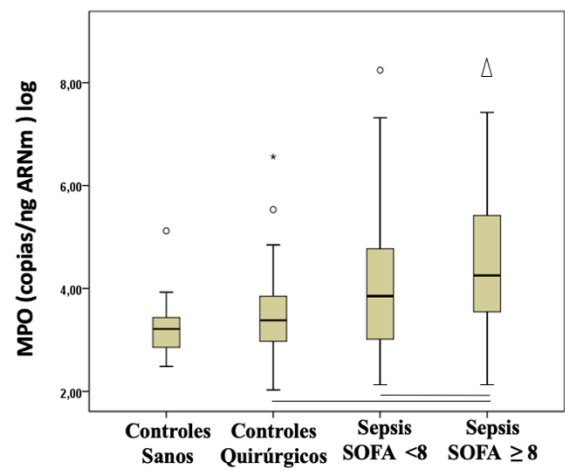
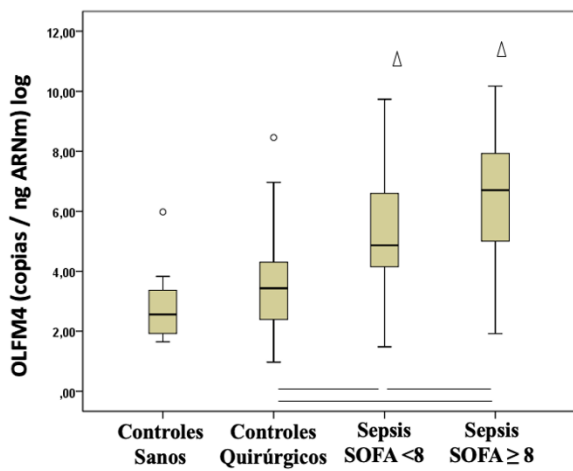
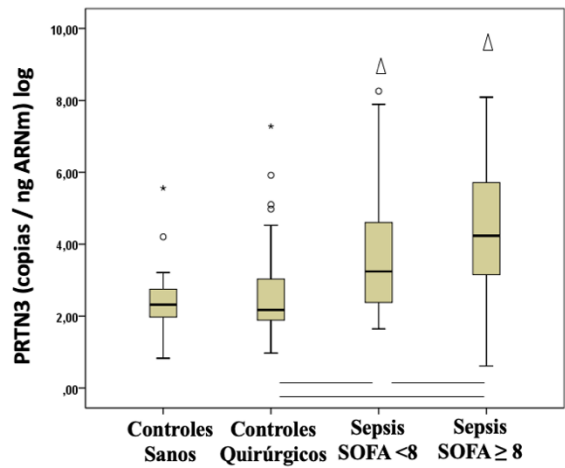
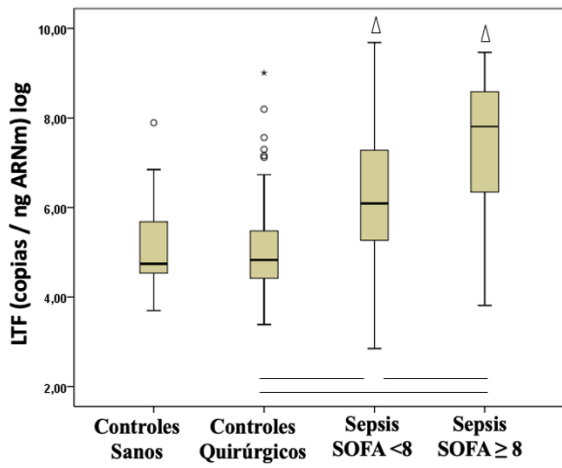
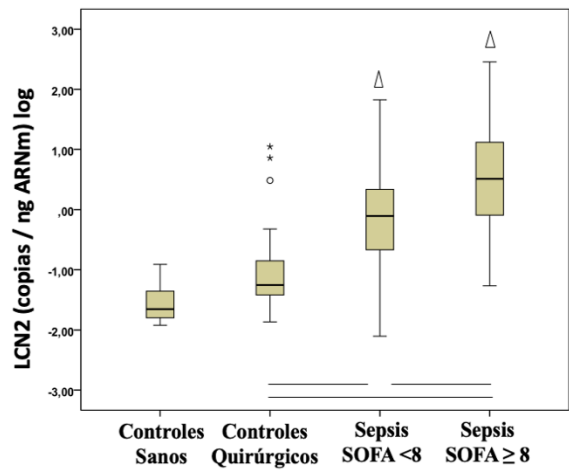
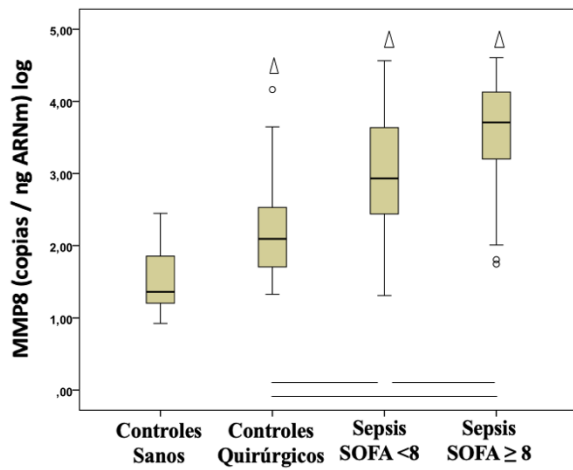


Figura 15. Diagramas de caja representando los niveles de expresión de los genes del neutrófilo en los diferentes grupos de pacientes. Δ representa la existencia de diferencias significativas con respecto al control sano. Las líneas representan diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes. Log: logaritmo; ARNm: ARN mensajero.

Sensibilidad y especificidad para la detección de sepsis:

A continuación, se evaluó la capacidad de la expresión de los genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo para realizar el diagnóstico diferencial de sepsis mediante análisis de área bajo la curva (ABC) (Figura 16).

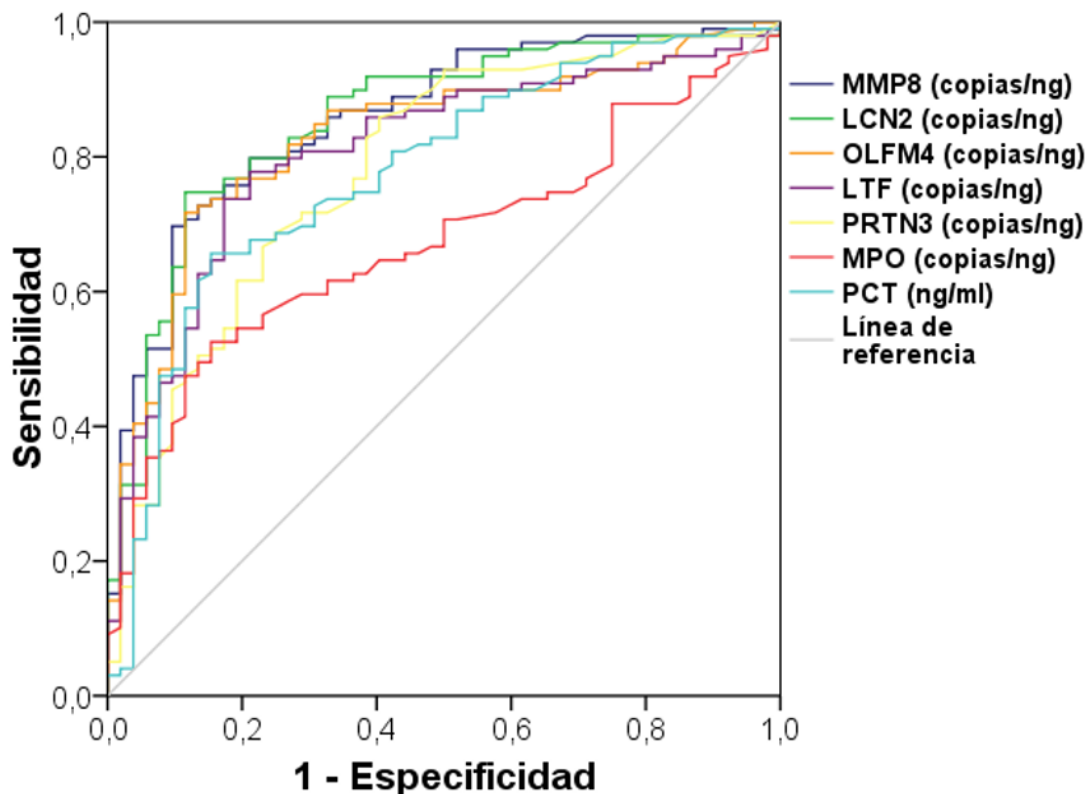


Figura 16. Análisis del área bajo la curva de los genes del neutrófilo para evaluar su poder de diagnóstico de sepsis.

Como se puede apreciar en la tabla 15, todos los genes evaluados, así como la Procalcitonina, mostraron áreas bajo la curva significativas para el diagnóstico diferencial de pacientes quirúrgicos con sepsis.

Los genes que mejor diferenciaron entre pacientes quirúrgicos con sepsis y controles quirúrgicos no infectados fueron MMP8 y LCN2, con un área bajo la curva de 0,86, superior a la alcanzada por la PCT. Tanto estos dos genes como OLFM4 y LTF mostraron un área bajo la curva superior al alcanzado por la PCT, por lo que podrían ser buenos candidatos para el diagnóstico de sepsis. Por otra parte, PRTN3 y MPO no alcanzaron un área bajo la curva de 0,80.

Se calcularon, además, los puntos de corte (OOP) tanto para los diferentes genes como para la PCT. MMP8, LCN2, OLFM4 y LTF mostraron mejores sensibilidades y especificidades que la PCT para el diagnóstico diferencial entre pacientes quirúrgicos sépticos y no sépticos, siendo MMP8 el gen con un mejor balance entre sensibilidad (80,2%) y especificidad (79,2%) para la detección de sepsis en pacientes quirúrgicos.

	Área Bajo la Curva						
	ABC	[IC 95%]		<i>p</i>	<i>OOP</i>	<i>Se</i>	<i>Es</i>
MMP8 (c/ng)	0,86	0,80	0,92	< 0,001	386	80,2	79,2
LCN2 (c/ng)	0,86	0,80	0,92	< 0,001	946	74,3	88,8
OLFM4 (c/ng)	0,83	0,77	0,90	< 0,001	86,4	77,2	81,1
LTF (c/ng)	0,81	0,74	0,88	< 0,001	259	76,2	79,2
PCT (ng/mL)	0,80	0,73	0,88	< 0,001	1,11	73,3	75,5
PRTN3 (c/ng)	0,78	0,70	0,85	< 0,001	1,308	68,0	74,5
MPO (c/ng)	0,67	0,58	0,75	0,001	48,2	55,4	76,9

Tabla 15. Áreas bajo la curva tanto de los genes como de la PCT para el diagnóstico diferencial entre pacientes con sepsis y controles quirúrgicos. OOP: punto de corte; Se: sensibilidad; Es: especificidad.

Asociación entre niveles de expresión génica y riesgo de sepsis:

A la hora de evaluar el poder de asociación de los genes con el riesgo de sepsis se realizó un análisis de regresión logística multivariante. Las variables de ajuste que se emplearon para realizar el modelo fueron: la escala SOFA, la edad, cirugía urgente, antecedente personal de padecer enfermedad renal crónica, cáncer, diabetes mellitus, la concentración de neutrófilos en sangre y de Proteína C Reactiva (PCR). Así pues, se evaluaron los puntos de corte de los genes, previamente calculados, a través de este modelo. Como se puede apreciar, tener niveles tanto de PCT como de todos los genes por encima de los puntos de corte correspondientes, se asocia de forma directa y significativa a un mayor riesgo de sepsis. En este contexto, de todos los biomarcadores evaluados fue LCN2 el gen que mostró un odds ratio superior, y, por tanto, una mayor fuerza de asociación con el riesgo de sepsis, aunque MMP8 mostró un mejor balance entre sensibilidad y especificidad a la hora de detectar sepsis (Tabla 16).

	Análisis multivariante para riesgo de sepsis					
	OR	[IC 95%]		<i>p</i>	<i>Se</i>	<i>Es</i>
MMP8 > 386 c/ng	5,4	1,47	20,03	0,011	80,2	79,2
LCN2 > 946 c/ng	12,2	2,57	57,98	0,002	74,3	88,8
OLFM4 > 86,4 c/ng	4,7	1,27	17,50	0,020	77,2	81,1
LTF > 259 c/ng	6,7	1,76	25,28	0,005	76,2	79,2
PCT > 1,11 ng/mL	4,2	1,15	15,43	0,030	73,3	75,5

Tabla 16. Análisis multivariante para evaluar el riesgo de sepsis en función de los niveles de expresión génica o de PCT. OR: odds ratio; Se: sensibilidad; Es: especificidad.

En base a estos resultados se decidió evaluar el papel de estos genes en la estratificación de la gravedad en la infección y el pronóstico de mortalidad. Aparte de estos genes, teniendo en cuenta los antecedentes encontrados en la literatura, también se decidió evaluar el papel de las proteínas relacionadas con la disfunción endotelial y la degranulación del neutrófilo en la estratificación de gravedad en la infección.

ESTRATIFICACIÓN DE GRAVEDAD EN LA INFECCIÓN

Características clínicas de los pacientes:

Para este propósito, se emplearon los pacientes reclutados en la cohorte II, pacientes con infección, sepsis y shock séptico.

El grupo de pacientes con infección era más joven que los grupos de sepsis y shock séptico. En cuanto al género, todos los grupos tenían una composición similar. En cuanto a las comorbilidades, los pacientes con sepsis y shock séptico presentaban de forma más frecuente antecedentes de hipertensión o patología crónica cardiovascular, respiratoria o renal (Tabla 17).

		Infección (1) (n=100)	Sepsis (2) (n=95)	Shock Séptico (3) (n=57)	p valor (1 vs 2)	p valor (1 vs 3)	p valor (2 vs 3)
Características	Edad [años, mediana (IQR)]	56,00 (32)	73,00 (21)	74,00 (11)	< 0,001	< 0,001	n,s
	Hombres [% (n)]	60,00 (60)	65,30 (62)	54,40 (31)	n.s.	n.s.	n.s.
Comorbilidades, [% (n)]	Enfermedad cardiovascular crónica	13,00 (13)	29,50 (28)	36,80 (21)	0,005	0,001	n.s.
	Enfermedad respiratoria crónica	2,00 (2)	13,70 (13)	10,50 (6)	0,002	0,020	n.s.
	Hipertensión	30,00 (30)	49,50 (47)	59,60 (34)	0,006	< 0,001	n.s.
	Enfermedad renal crónica	2,00 (2)	9,50 (9)	12,30 (7)	0,024	0,003	n.s.
	Enfermedad hepática crónica	4,00 (4)	2,10 (2)	1,80 (1)	n.s.	n.s.	n.s.
	Diabetes mellitus	14,00 (14)	21,10 (20)	29,80 (17)	n.s.	0,017	n.s.
	Cáncer	13,00 (13)	19,00 (18)	22,80 (13)	n.s.	n.s.	n.s.
	Inmunosupresión	5,00 (5)	13,70 (13)	10,50 (6)	0,037	n.s.	n.s.

Tabla 17. Características clínicas de los pacientes de la cohorte II. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); n.s: no significativo.

La proporción de pacientes que necesitaron someterse a una cirugía urgente fue similar en los tres grupos. La cirugía más frecuente fue la abdominal y el foco abdominal fue el predominante en los tres grupos de estudio. Los pacientes con sepsis o shock séptico presentaron más frecuentemente infecciones respiratorias que los pacientes con infección.

La bacteriemia fue más prevalente en aquellos pacientes con shock séptico. Los pacientes con sepsis o shock séptico presentaron más infecciones por bacterias Gram positivo que los pacientes con infección. Las infecciones por bacterias Gram negativo fueron más prevalentes en el grupo de shock séptico que en el resto de grupos (Tabla 18).

		Infección (1) (n=100)	Sepsis (2) (n=95)	Shock Séptico (3) (n=57)	p valor (1 vs 2)	p valor (1 vs 3)	p valor (2 vs 3)
Tipo de cirugía, [% (n)]	Cirugía urgente	70,00 (70)	77,90 (74)	71,90 (41)	n.s.	n.s.	n.s.
	Abdominal	65,00 (65)	56,80 (54)	42,10 (24)	n.s.	0,006	n.s.
	Cardio-torácica	0,00 (0)	14,70 (14)	24,60 (14)	< 0,001	< 0,001	n.s.
	Vascular	1,00 (1)	3,20 (3)	1,80 (1)	n.s.	n.s.	n.s.
	Urológica/Renal	0,00 (0)	0,00 (0)	1,80 (1)	n.s.	n.s.	n.s.
	Otras	13,00 (13)	4,20 (4)	7,00 (4)	0,030	n.s.	n.s.
Origen de la infección, [% (n)]	Tracto respiratorio	4,00 (4)	15,80 (15)	24,60 (14)	0,006	< 0,001	n.s.
	Abdomen	67,00 (67)	50,50 (48)	33,30 (19)	0,020	< 0,001	0,039
	Tracto urinario	0,00 (0)	4,20 (4)	10,50 (6)	0,039	0,001	n.s.
	Herida quirúrgica	12,00 (12)	16,80 (16)	22,80 (13)	n.s.	n.s.	n.s.
	Bacteriemia	0,00 (0)	6,30 (6)	21,10 (12)	0,011	< 0,001	0,007
	Otros	13,00 (13)	16,80 (16)	7,00 (4)	n.s.	n.s.	n.s.
Microbiología, [% (n)]	Cultivo positivo	29,00 (29)	56,84 (54)	77,44 (43)	< 0,001	< 0,001	0,021
	Gram +	13,00 (13)	30,50 (29)	36,80 (21)	0,003	0,001	n.s.
	Gram -	23,00 (23)	32,60 (31)	59,70 (34)	n.s.	< 0,001	0,001
	Hongos	4,00 (4)	8,40 (8)	14,00 (8)	n.s.	0,023	n.s.

Tabla 18. Características clínicas de los pacientes de la cohorte II. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); n.s.: no significativo.

Como cabría esperar, los pacientes con shock séptico mostraron mayor grado de disfunción orgánica, medido a través de la escala SOFA. La estancia hospitalaria estaba directamente asociada a la gravedad de los pacientes. En cuanto a la mortalidad, el mayor porcentaje de fallecidos se produjo en el grupo de shock séptico, con un 38%, seguido del grupo de sepsis, con un 7%, mientras que en el grupo de infección no se produjeron muertes. La alteración de la coagulación, representada por el Ratio Normalizado Internacional (INR), también se asoció con la gravedad de los pacientes. En cuanto al leucograma, el conteo de linfocitos disminuyó a medida que aumentó la gravedad de los pacientes. Los monocitos fueron más bajos en los grupos de sepsis y shock séptico que en el grupo de infección (Tabla 19).

		Infección (1) (n=100)	Sepsis (2) (n=95)	Shock Séptico (3) (n=57)	p valor (1 vs 2)	p valor (1 vs 3)	p valor (2 vs 3)
Evolución y pronóstico	Estancia hospitalaria [días, mediana (IQR)]	5 (10)	15 (21,50)	31 (30,25)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	Estancia en UCI [días, mediana (IQR)]	0,50 (2)	3 (5,75)	7 (10)	< 0,001	< 0,001	0,001
	Mortalidad hospitalaria, [% (n)]	0,00 (0)	7,40 (7)	38,60 (22)	0,006	< 0,001	< 0,001
Medidas al diagnóstico, [mediana (IQR)]	Escala SOFA	0 (1)	6 (5)	9 (4)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	Bilirrubina total (mg/dl)	0,70 (0,63)	0,70 (1,35)	1,00 (1,34)	n.s.	0,013	n.s.
	Glucosa (mg/dl)	118 (44)	158 (67)	163 (105)	< 0,001	< 0,001	n.s.
	Na (mmol/L)	139,00 (5,25)	138,00 (8,00)	129,00 (136,50)	0,008	< 0,001	0,001
	K (mmol/L)	3,90 (1,10)	4,00 (0,70)	3,85 (1,13)	n.s.	n.s.	n.s.
	Plaquetas (cell/mm3)	221500 (113000)	184000 (170750)	123000 (169500)	0,023	0,001	n.s.
	INR	1,15 (0,23)	1,27 (0,20)	1,44 (0,54)	0,002	< 0,001	< 0,001
	Albúmina (mg/dl)	3480 (1397,5)	2445 (997,5)	2340 (915)	< 0,001	< 0,001	n.s.
	Lactato (mmol/L)	1,50 (0,79)	1,50 (0,77)	3,55 (2,73)	n.s.	< 0,001	< 0,001
	Leucocitos (cél/mm3)	13070 (7160)	14050 (8880)	14550 (12355)	n.s.	n.s.	n.s.
	Linfocitos (cél/mm3)	1383,50 (894,60)	940 (853,76)	592 (693,31)	0,021	< 0,001	0,004
	Monocitos (cél/mm3)	795,52 (632,94)	632 (617)	411,25 (546,56)	0,049	0,002	n.s.
	Neutrófilos (cél/mm3)	10144 (7536,78)	12100 (7338)	12240 (12530)	n.s.	n.s.	n.s.
	Eosinófilos (cél/mm3)	43 (104,91)	19 (57,52)	10,92 (47,53)	n.s.	n.s.	n.s.
Basófilos (cél/mm3)	33,60 (41,73)	26,90 (43,04)	20 (39,39)	n.s.	0,042	n.s.	

Tabla 19. Características clínicas de los pacientes de la cohorte II. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); UCI: unidad de cuidados críticos; INR, ratio internacional normalizado n.s.: no significativo.

Niveles de biomarcadores a lo largo de los grupos de estudio:

-Granulopoyesis de emergencia y reactantes de fase aguda:

Como se puede apreciar en la tabla 20 y en los gráficos de cajas de la Figura 17, hay una tendencia generalizada de aumento de los niveles de los biomarcadores de granulopoyesis de emergencia y fase aguda a lo largo del espectro de gravedad, siendo los más robustos en cuanto a la existencia de diferencias significativas a medida que aumenta la gravedad OLFM4, IL18R1, STOM, IL1R2, CD177, MMP9 y PCT.

	Controles Sanos (0)	Infección (1)	Sepsis (2)	Shock Séptico (3)	<i>p</i> (0 vs 1)	<i>p</i> (0 vs 2)	<i>p</i> (0 vs 3)	<i>p</i> (1 vs 2)	<i>p</i> (1 vs 3)	<i>p</i> (2 vs 3)
MMP8 (c/ng)	18 [53]	383 [1001]	824 [2 689]	10 280 [19 432]	0,001	< 0,001	< 0,001	n.s.	< 0,001	< 0,001
LTF (c/ng)	38 [169]	126 [209]	476 [1 408]	3 184 [4 730]	n.s.	0,008	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
PRTN3 (c/ng)	3 [4]	9 [25]	28 [104]	77 [294]	n.s.	0,046	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,026
LCN2 (c/ng)	173 [354]	321 [806]	1676 [4 814]	13 400 [22 307]	n.s.	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
OLFM4 (c/ng)	11 [15]	29 [106]	170 [825]	1 600 [3 138]	0,010	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
ELANE (c/ng)	10 [10]	31 [49]	56 [123]	103 [308]	0,043	0,008	< 0,001	< 0,001	< 0,001	n.s.
MPO (c/ng)	14 [12]	26 [31]	37 [107]	94 [186]	n.s.	0,046	0,001	0,012	< 0,001	0,001
CTSG (c/ng)	15 [17]	17 [24]	37 [102]	55 [215]	n.s.	0,008	0,005	0,001	< 0,001	n.s.
AZU1 (c/ng)	9 [6]	17 [19]	31 [111]	56 [151]	n.s.	0,014	0,001	< 0,001	< 0,001	n.s.
DEFA4 (c/ng)	74 [112]	70 [151]	142 [537]	310 [984]	n.s.	n.s.	< 0,001	0,012	< 0,001	n.s.
BPI (c/ng)	48 [75]	95 [222]	292 [516]	752 [872]	n.s.	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
IL18R1 (c/ng)	85 [21]	177 [366]	356 [712]	1 036 [658]	0,001	< 0,001	< 0,001	0,031	< 0,001	< 0,001
CEACAM8 (c/ng)	23 [69]	38 [62]	85 [289]	314 [697]	n.s.	n.s.	0,001	0,002	< 0,001	< 0,001
CEACAM6 (c/ng)	8 [13]	12 [14]	24 [88]	70 [107]	n.s.	0,046	0,001	0,008	< 0,001	0,009
CD24 (c/ng)	114 [77]	105 [123]	201 [424]	750 [782]	n.s.	0,046	0,001	0,005	< 0,001	< 0,001
TCN1 (c/ng)	49 [32]	62 [87]	148 [332]	588 [869]	n.s.	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
STOM (c/ng)	372 [118]	718 [1175]	1 688 [2 236]	3 416 [2 520]	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
IL1R2 (c/ng)	326 [195]	940 [2 157]	2 860 [4 820]	8 628 [6 388]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CD177 (c/ng)	15 [27]	1 286 [5 228]	4 460 [9 864]	10 156 [10 122]	0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	< 0,001	0,009
CHIT1 (c/ng)	8 [7]	13 [16]	36 [83]	152 [250]	n.s.	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
MMP9 (c/ng)	662 [681]	2 508 [5 552]	7 356 [9 808]	14 960 [15 366]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	0,026
MMP25 (c/ng)	37 [25]	132 [299]	380 [681]	464 [675]	0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	< 0,001	n.s.
PCT (ng/mL)	0,03 [0,02]	0,16 [0,57]	2,00 [6,32]	12,09 [34,84]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
PCR (mg/L)	1,82 [3,04]	117,00 [176,26]	217,20 [194,97]	273,53 [160,05]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	n.s.

Tabla 20. Niveles de los biomarcadores de granulopoyesis de emergencia y de fase aguda a lo largo del espectro de gravedad.

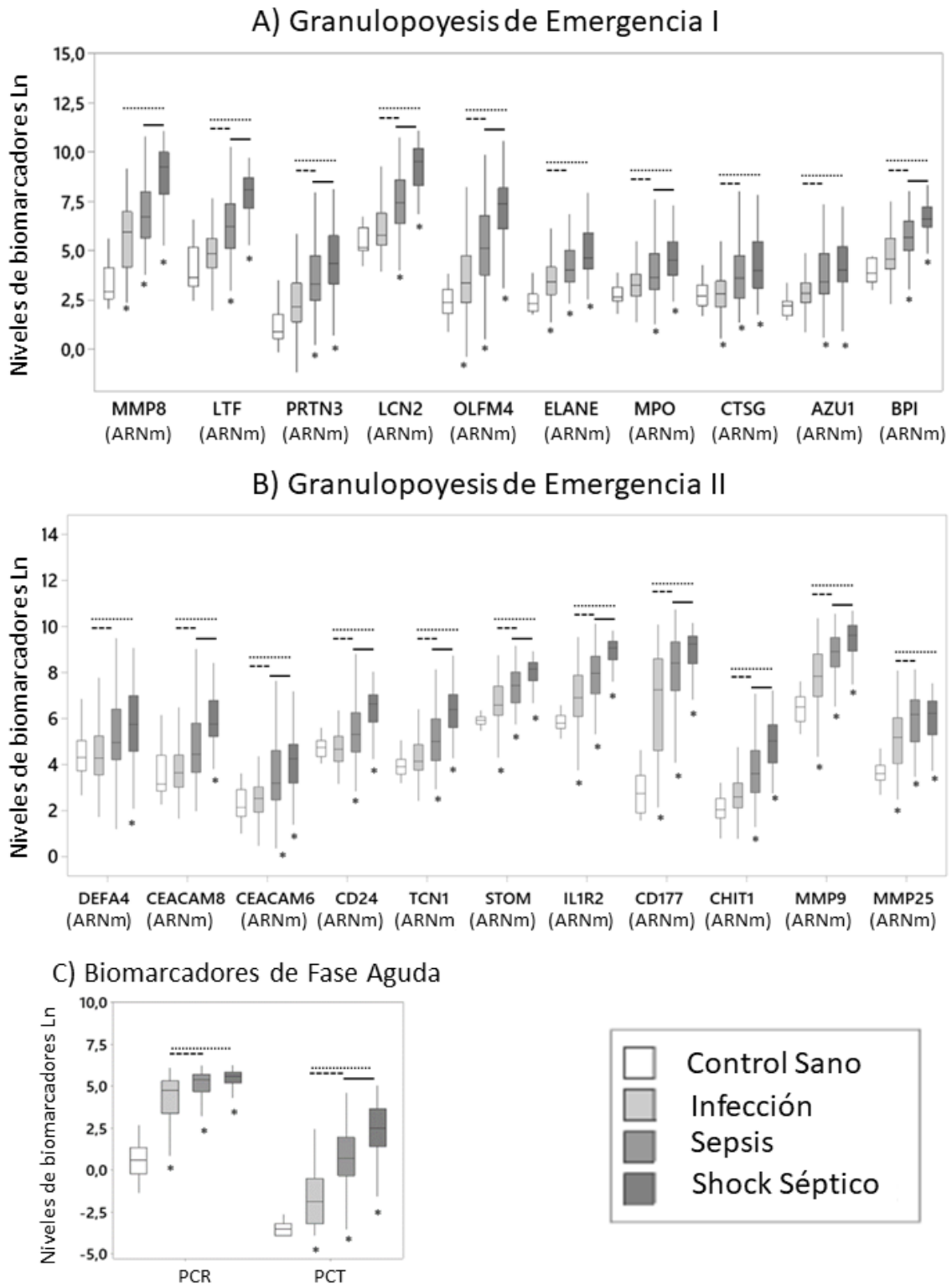


Figura 17. Diagrama de cajas representando los niveles de los biomarcadores de granulopoyesis de emergencia en los distintos grupos de pacientes. El asterisco representa la existencia de diferencias significativas con respecto al control sano. Las líneas representan diferencias significativas entre los grupos de pacientes. Ln: logaritmo neperiano; ARNm: ARN mensajero.

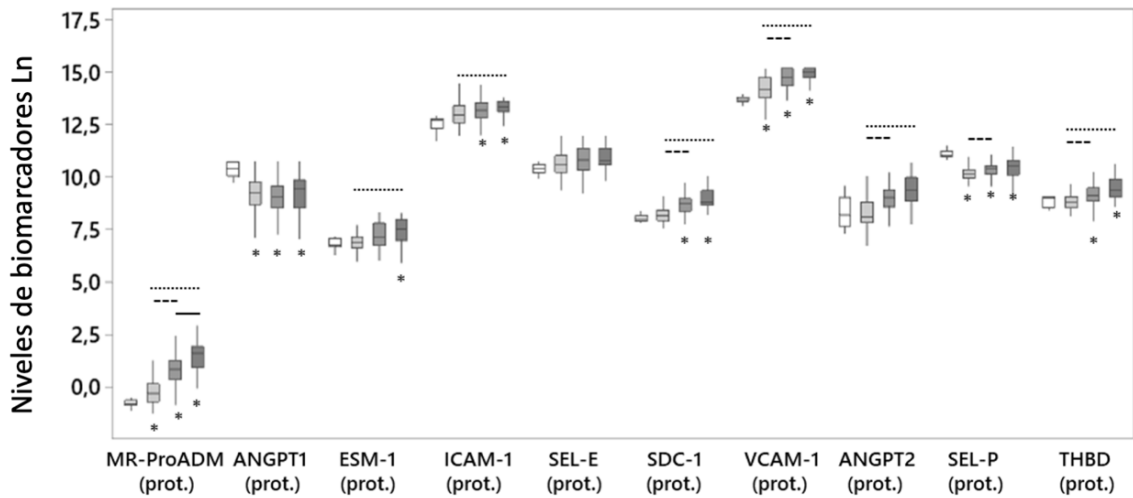
-Disfunción endotelial y degranulación del neutrófilo:

Como se puede apreciar en la tabla 21 y en los gráficos de cajas de la Figura 18, hay una tendencia generalizada de aumento de los niveles de los biomarcadores de daño endotelial y degranulación del neutrófilo a lo largo del espectro de gravedad, salvo en el caso de la SEL-E, MMP9 y MPO, siendo la MR-ProADM la que muestra una significación más robusta a medida que aumenta la gravedad del paciente.

	Controles Sanos (0)	Infección (1)	Sepsis (2)	Shock Séptico (3)	<i>p</i> (0 vs 1)	<i>p</i> (0 vs 2)	<i>p</i> (0 vs 3)	<i>p</i> (1 vs 2)	<i>p</i> (1 vs 3)	<i>p</i> (2 vs 3)
MR-ProADM (nmol/L)	0,46 [0,11]	0,73 [0,66]	2,32 [2,16]	5,01 [4,44]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,016
ANGPT1 (pg/mL)	33 755 [22 623]	10 621 [11 941]	8 898 [9 321]	12 548 [14 264]	0,005	0,005	0,021	n.s.	n.s.	n.s.
ESM1 (pg/mL)	858 [348]	1 006 [522]	1 241 [1 656]	1 868 [1 904]	n.s.	n.s.	0,002	n.s.	0,005	n.s.
ICAM-1 (pg/mL)	327 374 [127 446]	428 988 [368 494]	540 875 [392 835]	635 785 [330 915]	n.s.	0,043	0,021	n.s.	0,005	n.s.
SEL-E (pg/mL)	33 762 [13 322]	41 472 [34 520]	50 577 [58 245]	49 529 [49 539]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SDC1 (pg/mL)	3 014 [829]	3 513 [1 812]	6 120 [3 638]	6 743 [5 877]	n.s.	0,005	0,002	< 0,001	< 0,001	n.s.
VCAM-1 (pg/mL)	898 138 [197 691]	1 491 250 [1 578 423]	2 638 300 [2 232 050]	3 412 550 [1 430 300]	0,048	0,005	0,002	< 0,001	< 0,001	n.s.
ANGPT2 (pg/mL)	3 636 [6 719]	3 296 [4 140]	8 418 [6 689]	12 063 [14 661]	n.s.	n.s.	n.s.	< 0,001	< 0,001	n.s.
SEL-P (pg/mL)	64 218 [17 822]	26 376 [10 681]	32 493 [12 373]	38 663 [25 477]	0,005	0,005	0,002	0,039	n.s.	n.s.
THBD (pg/mL)	7 947 [3 254]	6 584 [3 627]	9 144 [6 290]	12 214 [11 893]	n.s.	0,043	0,002	< 0,001	0,001	n.s.
MMP8 (pg/mL)	3 494 [6 115]	3 519 [8 726]	10 589 [16 273]	29 003 [30 652]	n.s.	n.s.	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001
LTF (pg/mL)	143 137 [197 587]	69 638 [133 645]	137 668 [210 631]	349 465 [578 538]	n.s.	n.s.	n.s.	0,039	< 0,001	0,004
PRTN3 (pg/mL)	27 001 [26 638]	40 433 [32 985]	57 355 [32 694]	76 000 [11 819]	n.s.	0,043	0,002	0,002	< 0,001	0,004
LCN2 (pg/mL)	75 706 [24 713]	83 571 [58 129]	200 834 [161 095]	437 898 [410 121]	n.s.	0,005	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001
MMP9 (pg/mL)	90 675 [77 230]	162 389 [185 533]	151 520 [178 528]	95 723 [152 227]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MPO (pg/mL)	136 305 [197 837]	64 873 [68 125]	81 790 [70 588]	127 514 [313 150]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 21. Niveles de los biomarcadores de daño endotelial y degranulación del neutrófilo a lo largo del espectro de gravedad.

D) Disfunción endotelial



E) Degranulación del neutrófilo

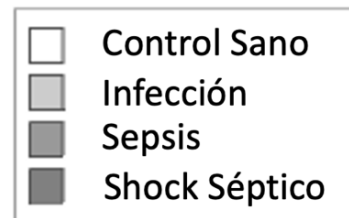
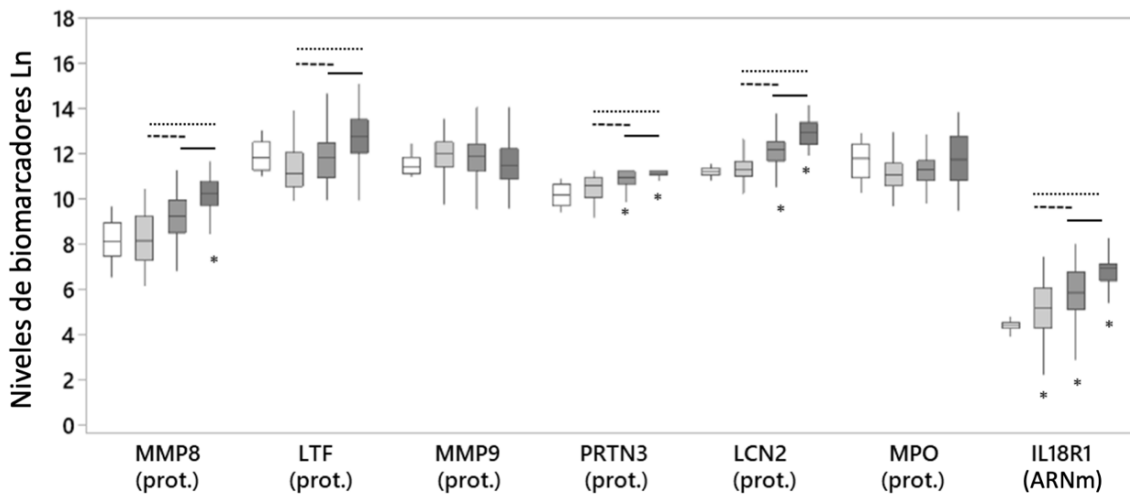


Figura 18. Diagrama de cajas representando los niveles de los biomarcadores de daño endotelial y degranulación del neutrófilo en los distintos grupos de pacientes. El asterisco representa la existencia de diferencias significativas con respecto al control sano. Las líneas representan diferencias significativas entre los grupos de pacientes. Ln: logaritmo neperiano; ARNm: ARN mensajero; Prot.: proteína.

Análisis de regresión multivariante para evaluar el riesgo de sepsis vs infección en función de los niveles de biomarcadores:

Mediante este análisis, se identificaron siete biomarcadores de daño endotelial, dos de degranulación del neutrófilo y trece de granulopoyesis de emergencia como factores de riesgo independiente de sepsis (Tabla 22). Las variables de ajuste seleccionadas para los biomarcadores de expresión génica fueron: la edad, antecedentes de enfermedad cardiovascular, inmunosupresión, hipertensión, enfermedad respiratoria crónica, enfermedad renal crónica, cirugía abdominal, otros tipos de cirugía, foco de infección respiratorio y foco de infección abdominal. Las variables de ajuste seleccionadas para los biomarcadores a nivel de proteína fueron: la edad, antecedentes de inmunosupresión, hipertensión, enfermedad respiratoria crónica, enfermedad renal crónica, cirugía urgente, cirugía abdominal, otros tipos de cirugía, foco de infección respiratorio y foco de infección abdominal. En la figura 19 se puede apreciar la fuerza de asociación de cada biomarcador con el desarrollo de sepsis a través de los valores del odds ratio.

	Análisis multivariante			
	OR	[IC 95%]		p
MR-ProADM (nmol/L) Ln	11,53	4,15	32,08	< 0,001
SDC1 (pg/ml) Ln	9,48	2,86	31,38	< 0,001
THBD (pg/ml) Ln	4,14	1,28	13,39	0,018
ANGPT2 (pg/ml) Ln	3,70	1,80	7,59	< 0,001
ESM-1 (pg/ml) Ln	3,58	1,45	8,83	0,006
VCAM-1 (pg/ml) Ln	2,72	1,10	6,76	0,031
SEL-E (pg/ml) Ln	2,32	1,12	4,81	0,023
LCN2 (pg/ml) Ln	2,27	1,16	4,44	0,016
MMP8 (pg/ml) Ln	1,90	1,23	2,96	0,004
PCT (ng/mL) Ln	1,83	1,41	2,37	< 0,001
CHIT1 (copias/ng) Ln	1,81	1,24	2,64	0,002
STOM (copias/ng) Ln	1,68	1,09	2,60	0,020
MMP9 (copias/ng) Ln	1,67	1,14	2,44	0,008
IL1R2 (copias/ng) Ln	1,64	1,12	2,42	0,011
MMP8 (copias/ng) Ln	1,64	1,23	2,19	0,001
LCN2 (copias/ng) Ln	1,62	1,23	2,15	0,001
TCN1 (copias/ng) Ln	1,56	1,07	2,27	0,021
LTF (copias/ng) Ln	1,55	1,16	2,06	0,002
BPI (copias/ng) Ln	1,52	1,07	2,17	0,020
CD24 (copias/ng) Ln	1,51	1,05	2,17	0,026
PCR (mg/L) Ln	1,51	1,05	2,18	0,028
MMP25 (copias/ng) Ln	1,46	1,05	2,05	0,026
CD177 (copias/ng) Ln	1,31	1,05	1,65	0,020
OLFM4 (copias/ng) Ln	1,28	1,05	1,55	0,012

Tabla 22. Análisis multivariante para evaluar riesgo de sepsis vs infección. Ln: logaritmo neperiano

SEPSIS vs INFECCIÓN

MR-ProADM (prot)	SDC1 (prot)	THBD (prot)	ESM-1 (prot)	SEL-E (prot)	PCT (prot)	MMP9 (ARNm)	LCN2 (ARNm)	TCN1 (ARNm)	LTF (ARNm)
				LCN2 (prot)	CHIT1 (ARNm)	IL1R2 (ARNm)	BPI (ARNm)	PCR (prot)	MMP25 (ARNm)
		ANGPT2 (prot)	VCAM-1 (prot)	MMP8 (prot)	STOM (ARNm)	MMP8 (ARNm)	CD24 (ARNm)	CD177 (ARNm)	OLFM4 (ARNm)

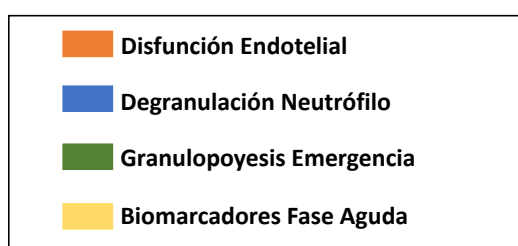


Figura 19. Mapa de árbol representando de forma jerárquica los odds ratio derivados del análisis multivariante de riesgo de sepsis vs infección. ARNm: ARN mensajero; Prot.: proteína.

Análisis de regresión multivariante para evaluar el riesgo de shock séptico vs sepsis en función de los niveles de biomarcadores:

Este análisis identificó cuatro biomarcadores de daño endotelial, seis de degranulación del neutrófilo y catorce de la granulopoyesis de emergencia como marcadores independientes de shock séptico (Tabla 23). Las variables de ajuste seleccionadas para los biomarcadores de expresión génica fueron: la edad, cirugía abdominal, foco de infección abdominal, bacteriemia, otros focos de infección, presencia de microorganismos Gram negativo y presencia de infección polimicrobiana. Las variables de ajuste seleccionadas para los biomarcadores a nivel de proteína fueron: foco de infección quirúrgico, bacteriemia, presencia de microorganismos Gram negativo y presencia de infección polimicrobiana. En la figura 20, se puede observar el poder de asociación de cada biomarcador con el desarrollo de shock séptico en función de los valores de odds ratio.

	Análisis multivariante			
	OR	[IC 95%]		<i>p</i>
PRTN3 (pg/ml) Ln	8,09	1,34	48,91	0,023
LCN2 (pg/ml) Ln	6,62	2,47	17,77	< 0,001
SDC1(pg/ml) Ln	6,10	1,77	21,06	0,004
MR-ProADM (nmol/L) Ln	4,58	1,99	10,58	< 0,001
THBD (pg/ml) Ln	4,52	1,42	14,34	0,011
IL18R1 (copias/ng) Ln	4,22	2,26	7,85	< 0,001
STOM (copias/ng) Ln	3,74	1,87	7,45	< 0,001
IL1R2 (copias/ng) Ln	3,72	2,10	6,58	< 0,001
ANGPT2 (pg/ml) Ln	3,02	1,29	7,10	0,011
MMP8 (pg/ml) Ln	2,97	1,55	5,67	0,001
MMP9 (copias/ng) Ln	2,67	1,55	4,59	< 0,001
LCN2 (copias/ng) Ln	2,45	1,71	3,50	< 0,001
MMP8 (copias/ng) Ln	2,43	1,74	3,38	< 0,001
TCN1 (copias/ng) Ln	2,36	1,62	3,44	< 0,001
LTF (pg/ml) Ln	2,30	1,38	3,84	0,001
MPO (pg/ml) Ln	2,26	1,20	4,25	0,011
LTF (copias/ng) Ln	2,24	1,59	3,15	< 0,001
BPI (copias/ng) Ln	2,23	1,49	3,36	< 0,001
CD24 (copias/ng) Ln	2,15	1,47	3,16	< 0,001
CHIT1 (copias/ng) Ln	2,01	1,42	2,83	< 0,001
CD177 (copias/ng) Ln	1,97	1,30	2,99	0,001
OLFM4 (copias/ng) Ln	1,85	1,42	2,40	< 0,001
CEACAM8 (copias/ng) Ln	1,78	1,31	2,41	< 0,001
PCT (ng/ml) Ln	1,73	1,31	2,29	< 0,001
MPO (copias/ng) Ln	1,36	1,02	1,81	0,038

Tabla 23. Análisis multivariante para evaluar riesgo de shock séptico vs sepsis. Ln: logaritmo neperiano.

SHOCK SÉPTICO vs SEPSIS

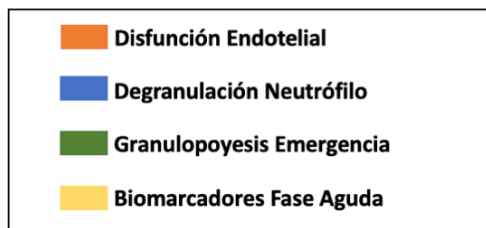
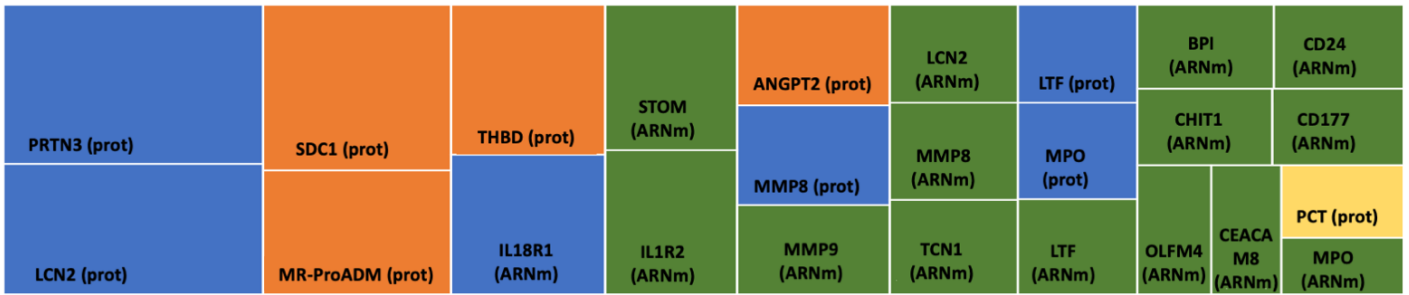


Figura 20. Mapa de árbol representando de forma jerárquica los odds ratio derivados del análisis multivariante de riesgo de shock séptico vs sepsis. ARNm: ARN mensajero; Prot.: proteína

En la siguiente figura (Figura 21) se puede ver representada la asociación de cada biomarcador, en las comparaciones sepsis vs infección y shock séptico vs sepsis, a través del odds ratio de cada biomarcador.

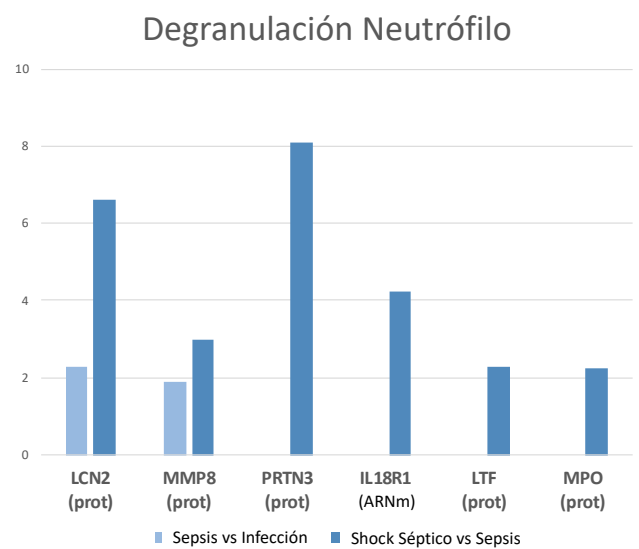
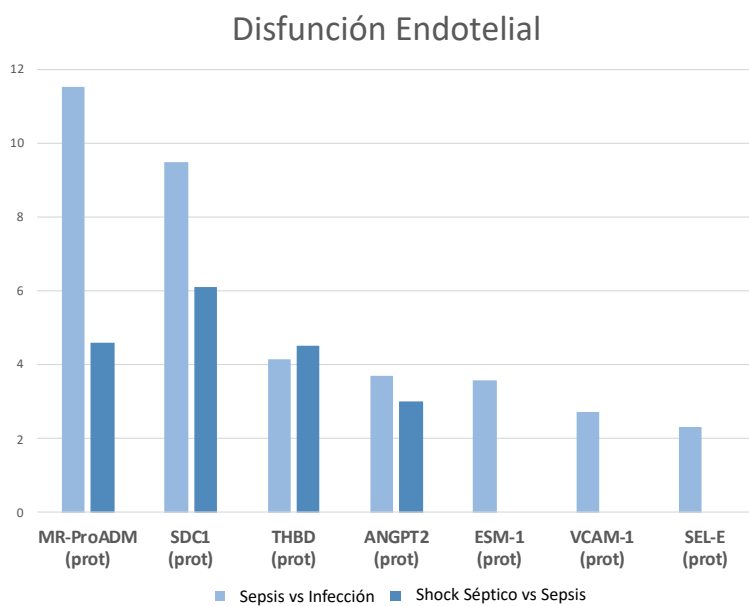
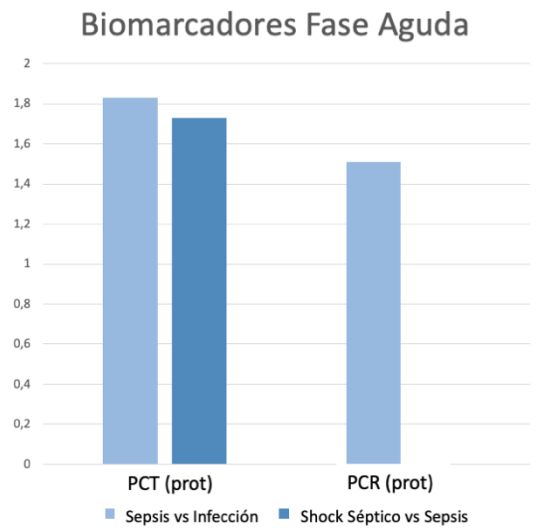
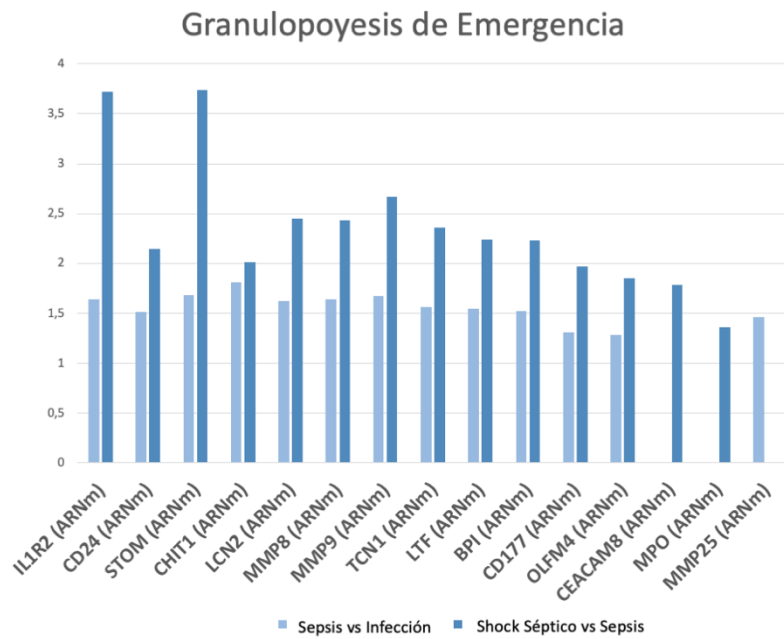


Figura 21. Histogramas representando de forma simultánea el odds ratio de los biomarcadores seleccionados por el análisis multivariante en cada comparación (sepsis vs infección y shock séptico vs sepsis). ARNm: ARN mensajero; Prot.: proteína.

Análisis de área bajo la curva (ABC) para evaluar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores:

En este análisis, la MR-ProADM fue el mejor biomarcador para distinguir sepsis de infección, mientras que la lipocalina-2 fue el mejor biomarcador para diferenciar shock séptico de sepsis, obteniendo ambos los mejores balances entre sensibilidad y especificidad en cada comparación (figura 22).

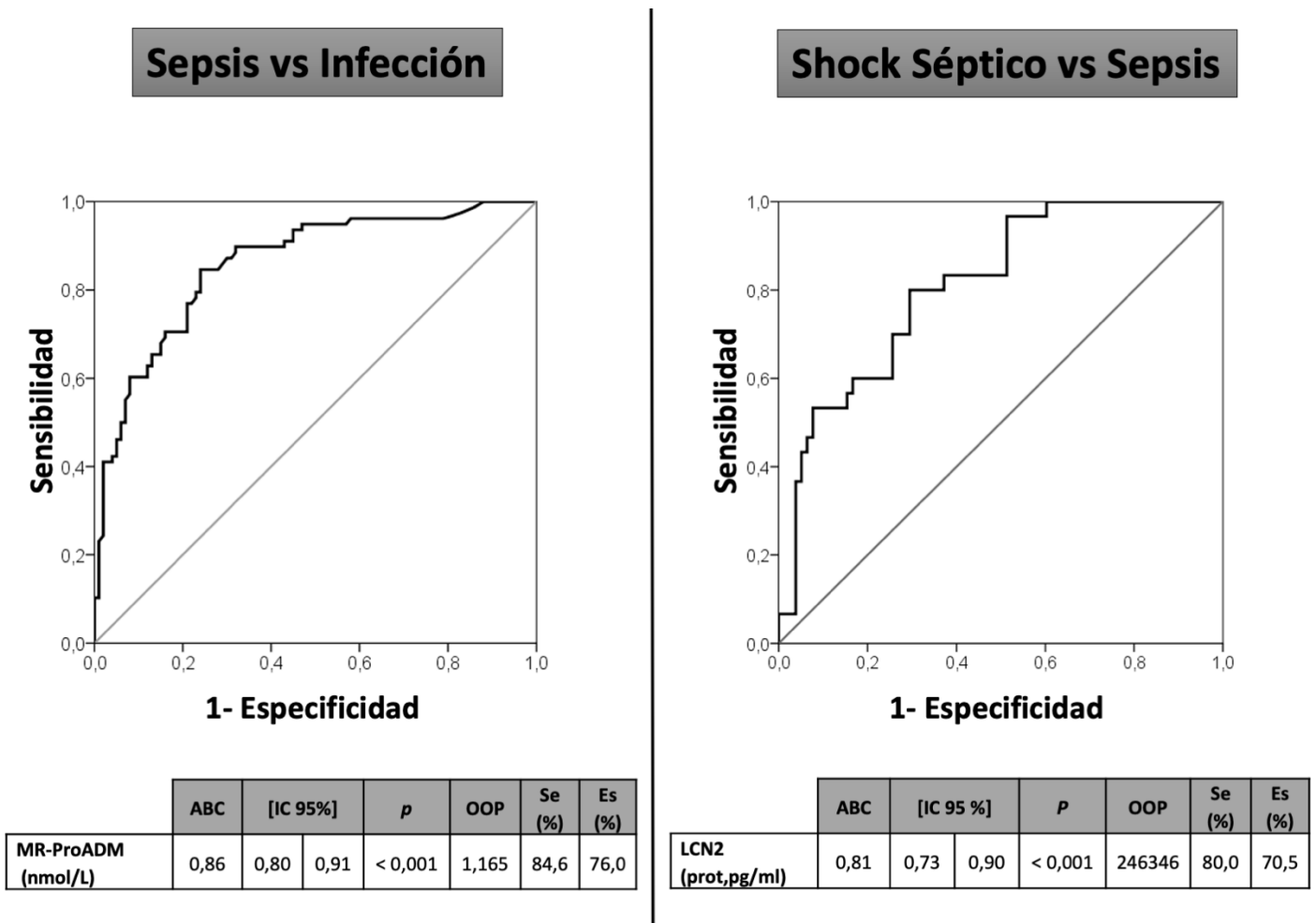


Figura 22. Análisis de área bajo la curva para evaluar la fiabilidad de la MR-ProADM y la lipocalina 2 para diferenciar entre sepsis e infección o entre shock séptico y sepsis, respectivamente.

PRONÓSTICO DE MORTALIDAD EN LA INFECCIÓN CON FALLO DE ÓRGANO.

Características clínicas de los pacientes:

En esta ocasión, se han empleado los mismos pacientes de la cohorte II, pero eliminando aquellos pacientes con infección y una puntuación de 0 en la escala SOFA. Así, contamos con pacientes con infección y fallo de órgano en todos los casos. Posteriormente, se les agrupó en función de la mortalidad.

El grupo de pacientes fallecidos presentó mayor edad que el grupo de supervivientes. En cuanto a la composición de género, los dos grupos fueron similares. El perfil de comorbilidades es similar en los dos grupos, con la excepción de la diabetes mellitus, que fue más frecuente en el grupo de no supervivientes (Tabla 24).

		Supervivientes (1) (n=150)	No Supervivientes (2) (n=29)	p valor (1 vs 2)
Características	Edad [años, mediana (IQR)]	70 [21]	76 [13]	0,007
	Hombres [%,(n)]	59,3 (89)	65,5 (19)	n.s.
Comorbilidades, [% (n)]	Enfermedad cardiovascular crónica	28,0 (42)	41,4 (12)	n.s.
	Enfermedad respiratoria crónica	10,7 (16)	10,3 (3)	n.s.
	Hipertensión	48,0 (72)	55,2 (16)	n.s.
	Enfermedad renal crónica	8,7 (13)	17,2 (5)	n.s.
	Enfermedad hepática crónica	2,7 (4)	0 (0)	n.s.
	Diabetes mellitus	18 (27)	44,8 (13)	0,001
	Cáncer	20 (30)	20,7 (6)	n.s.
	Inmunosupresión	12 (18)	13,8 (4)	n.s.

Tabla 24. Características clínicas de los pacientes de la cohorte II. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); n.s: no significativo.

Los pacientes de ambos grupos fueron similares en términos de tipo de cirugía, foco de la infección y hallazgos microbiológicos (Tabla 25).

		Supervivientes (1) (n=150)	No Supervivientes (2) (n=29)	p valor (1 vs 2)
Tipo de cirugía, [% (n)]	Cirugía urgente	77,3 (116)	75,9 (22)	n.s.
	Abdominal	58 (87)	41,4 (12)	n.s.
	Cardio-torácica	14 (21)	24,1 (7)	n.s.
	Vascular	1,3 (2)	6,9 (2)	n.s.
	Urológica/Renal	0,7 (1)	0 (0)	n.s.
	Otras	8 (12)	6,9 (2)	n.s.
Origen de la infección, [% (n)]	Tracto respiratorio	15,3 (23)	31,0 (9)	n.s.
	Abdomen	44 (66)	41,4 (12)	n.s.
	Tracto urinario	6 (9)	3,4 (1)	n.s.
	Herida quirúrgica	20 (30)	17,2 (5)	n.s.
	Bacteriemia	10 (15)	10,3 (3)	n.s.
	Otros	15,3 (23)	6,9 (2)	n.s.
Microbiología, [% (n)]	Cultivo positivo	58,7 (88)	69 (20)	n.s.
	Gram +	33,3 (50)	24,1 (7)	n.s.
	Gram -	38,7 (58)	51,7 (15)	n.s.
	Hongos	9,3 (14)	13,8 (4)	n.s.

Tabla 25. Características de los pacientes de la cohorte II. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); n.s.: no significativo.

Los pacientes que no sobrevivieron presentaron con mayor frecuencia shock séptico, mientras que los pacientes supervivientes presentaron más frecuentemente sepsis. Los pacientes fallecidos permanecieron más días ingresados en la UCI que los pacientes supervivientes. Como cabría esperar, los fallecidos mostraron mayor grado de disfunción orgánica, representado por la escala SOFA. Las alteraciones en la coagulación fueron más notorias en aquellos pacientes no supervivientes, que mostraron un INR más prolongado y menor contejo de plaquetas. En contraste, este grupo de pacientes mostró contejos de linfocitos y monocitos más bajos (Tabla 26).

		Supervivientes (1) (n=150)	No Supervivientes (2) (n=29)	p valor (1 vs 2)
Evolución y pronóstico	Estancia hospitalaria [días, mediana (IQR)]	18 [25]	23 [19]	n.s.
	Estancia en UCI [días, mediana (IQR)]	3 [6]	12 [18]	< 0,001
	Sepsis, [% (n)]	58,7 (88)	24,1 (7)	0,001
	Shock séptico, [% (n)]	23,3 (35)	75,9 (22)	< 0,001
Medidas al diagnóstico, [mediana (IQR)]	Escala SOFA	5 [6]	9 [3]	< 0,001
	Bilirrubina total (mg/dl)	0,80 [1,17]	1 [1,01]	n.s.
	Glucosa (mg/dl)	156,5 [64]	149 [117]	n.s.
	Na (mmol/L)	138 [6,5]	137,7 [9,55]	n.s.
	K (mmol/L)	4 [1,1]	3,8 [0,93]	n.s.
	Plaquetas (cell/mm3)	191000 [163750]	115000 [153500]	0,032
	INR	1,27 [0,27]	1,34 [0,72]	0,032
	Albúmina (mg/dl)	2555 [1127,5]	2350 [1130]	n.s.
	Lactato (mmol/L)	1,8 [1,33]	2,96 [2,86]	< 0,001
	Leucocitos (cél/mm3)	14775 [8723]	12920 [13145]	n.s.
	Linfocitos (cél/mm3)	906,82 [857,56]	570,18 [691,03]	0,030
	Monocitos (cél/mm3)	631 [688,95]	383 [549,44]	0,027
	Neutrófilos (cél/mm3)	12569,5 [8131,75]	11262 [11755]	n.s.
	Eosinófilos (cél/mm3)	17,37 [53,09]	13,29 [40,37]	n.s.
Basófilos (cél/mm3)	24,46 [42,78]	26,58 [46,79]	n.s.	

Tabla 26. Características de los pacientes de la cohorte II. Variables continuas representadas en mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas en %, (n); UCI: unidad de cuidados críticos; INR, ratio internacional normalizado n.s: no significativo.

Niveles de expresión de los genes de la granulopoyesis de emergencia entre los diferentes grupos:

Como se puede apreciar en la siguiente tabla, los niveles de todos los genes de la granulopoyesis de emergencia fueron más elevados en los grupos de supervivientes y no supervivientes con respecto a los controles sanos. Además, se observa que los niveles de todos los genes de la granulopoyesis de emergencia, salvo DEFA4, MMP9 y MMP25, están más elevados en el grupo de no supervivientes en comparación con el grupo de supervivientes (Tabla 27). Esto apoyaría que la expresión elevada de genes de la granulopoyesis se asocia con una mayor gravedad y un peor pronóstico en la infección con fallo de órgano.

	Controles Sanos (0)	Supervivientes (1)	No supervivientes (2)	<i>p</i> (0 vs 1)	<i>p</i> (0 vs 2)	<i>p</i> (1 vs 2)
MMP8 (c/ng)	18 [53]	1144 [6478]	5376 [17772]	< 0,001	< 0,001	0,001
LTF (c/ng)	38 [169]	590 [2025]	2844 [3354]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
PRTN3 (c/ng)	3 [4]	30 [99]	124 [338]	< 0,001	< 0,001	0,001
LCN2 (c/ng)	173 [354]	1764 [9244]	10208 [22588]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
OLFM4 (c/ng)	11 [15]	195 [1451]	1488 [2566]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
ELANE (c/ng)	10 [10]	62 [121]	174 [519]	< 0,001	< 0,001	0,007
MPO (c/ng)	14 [12]	43 [104]	114 [265]	< 0,001	< 0,001	0,006
CTSG (c/ng)	15 [17]	36 [100]	123 [386]	0,006	0,001	0,015
AZU1 (c/ng)	9 [6]	33 [95]	96 [204]	< 0,001	< 0,001	0,008
DEFA4 (c/ng)	74 [112]	214 [612]	352 [1658]	0,011	0,002	n.s.
BPI (c/ng)	48 [75]	304 [565]	1028 [1074]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
IL18R1 (c/ng)	85 [21]	446 [710]	984 [708]	< 0,001	< 0,001	0,001
CEACAM8 (c/ng)	23 [69]	105 [355]	324 [655]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CEACAM6 (c/ng)	8 [13]	26 [82]	89 [213]	0,001	< 0,001	0,005
CD24 (c/ng)	114 [77]	226 [544]	656 [770]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
TCN1 (c/ng)	49 [32]	171 [467]	688 [900]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
STOM (c/ng)	372 [118]	1802 [2546]	3516 [2548]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
IL1R2 (c/ng)	326 [195]	2990 [6689]	8244 [6832]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CD177 (c/ng)	15 [27]	5010 [8832]	10680 [10616]	< 0,001	< 0,001	0,004
CHIT1 (c/ng)	8 [7]	40,8 [135]	108 [144]	< 0,001	< 0,001	0,002
MMP9 (c/ng)	662 [681]	8012 [11420]	11000 [12628]	< 0,001	< 0,001	n.s.
MMP25 (c/ng)	37 [25]	339 [722]	436 [451]	< 0,001	< 0,001	n.s.

Tabla 27. Niveles de expresión de los genes de la granulopoyesis de emergencia en los diferentes grupos de pacientes. Mediana [Rango Intercuartil]; n.s.: no significativo.

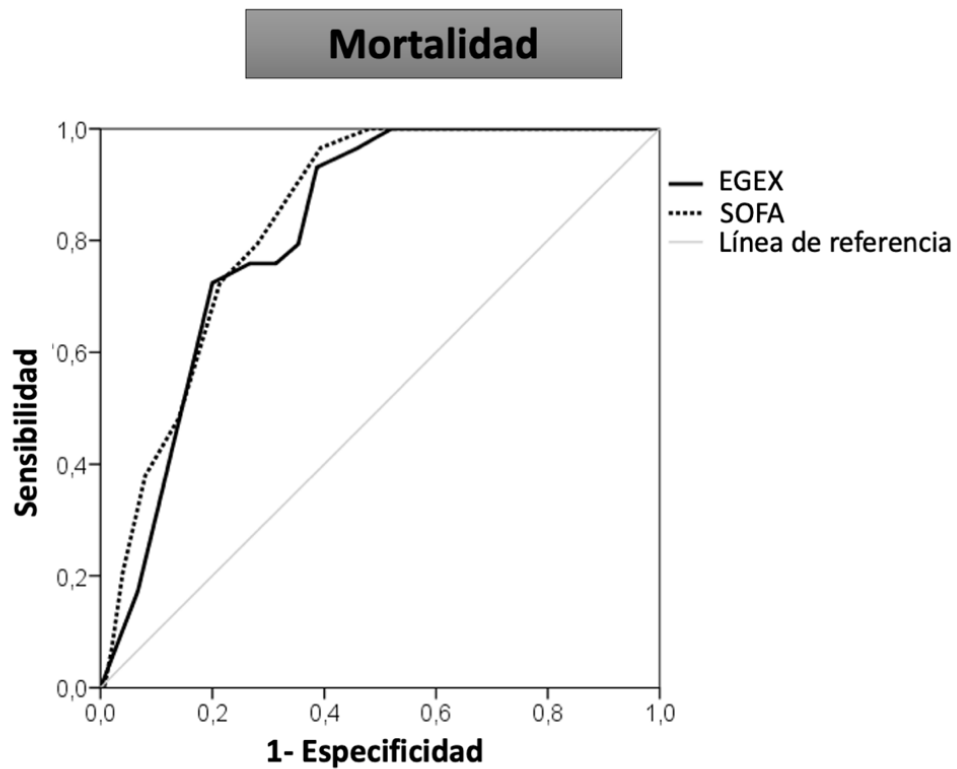
Niveles de expresión de genes de la granulopoyesis de emergencia para predicción de mortalidad:

Como se puede observar en la siguiente tabla (Tabla 28), mediante un análisis de área bajo la curva, se seleccionaron once genes con un área bajo la curva de al menos 0,7. Se calcularon los puntos de corte (OOP) para cada uno de estos genes con el propósito de combinarlos en forma de una escala aditiva (EGEX) para predecir mortalidad hospitalaria.

	ABC mortalidad hospitalaria						
	ABC	[IC 95%]		<i>p</i>	OOP	Se (%)	Es (%)
BPI (c/ng)	0,77	0,68	0,85	< 0,001	598	72,4	72,7
TCN1 (c/ng)	0,76	0,68	0,84	< 0,001	358	79,3	68,0
CD24 (c/ng)	0,75	0,68	0,82	< 0,001	342	82,8	64,4
CEACAM8 (c/ng)	0,74	0,66	0,81	< 0,001	203	86,2	62,7
LCN2 (c/ng)	0,73	0,65	0,82	< 0,001	3314	82,8	59,1
IL1R2 (c/ng)	0,72	0,63	0,81	< 0,001	6996	69,0	73,3
LTF (c/ng)	0,71	0,62	0,81	< 0,001	1500	75,9	70,0
OLFM4 (c/ng)	0,71	0,61	0,80	< 0,001	840	72,4	68,7
STOM (c/ng)	0,71	0,61	0,80	< 0,001	2688	69,0	65,3
MMP8 (c/ng)	0,70	0,60	0,80	0,001	2240	79,3	62,0
PRTN3 (c/ng)	0,70	0,61	0,79	0,001	94,2	62,1	73,3

Tabla 28. Áreas bajo la curva de los genes de la granulopoyesis de emergencia para predicción de mortalidad. OOP: punto de corte; Se: sensibilidad; Es: especificidad.

En la Figura 23, se muestra un nuevo análisis de área bajo la curva, mediante el cual, se comprobó que la capacidad de la escala EGEX para predecir mortalidad era muy similar a la de la escala SOFA, como se puede apreciar por la ausencia de significación en el test de Hanley & McNeil.



	ABC	[IC 95%]		<i>p</i>	Test de Hanley & McNeil
EGEX	0,82	0,75	0,88	< 0,001	n.s.
SOFA	0,84	0,78	0,90	< 0,001	

Figura 23. Área bajo la curva de la escala EGEX para evaluar su capacidad de predicción en comparación con la de la escala SOFA (cohorte de derivación).

Como se comentó previamente en los datos reflejados en la tabla 27, se puede apreciar en los diagramas de caja que se muestran a continuación que tanto la escala EGEX (Figura 24) como los once genes que conforman la misma (Figuras 25 y 26) mostraron niveles más elevados de forma significativa tanto entre el grupo de no supervivientes con respecto al grupo de supervivientes, como entre ambos grupos y el grupo de controles sanos.

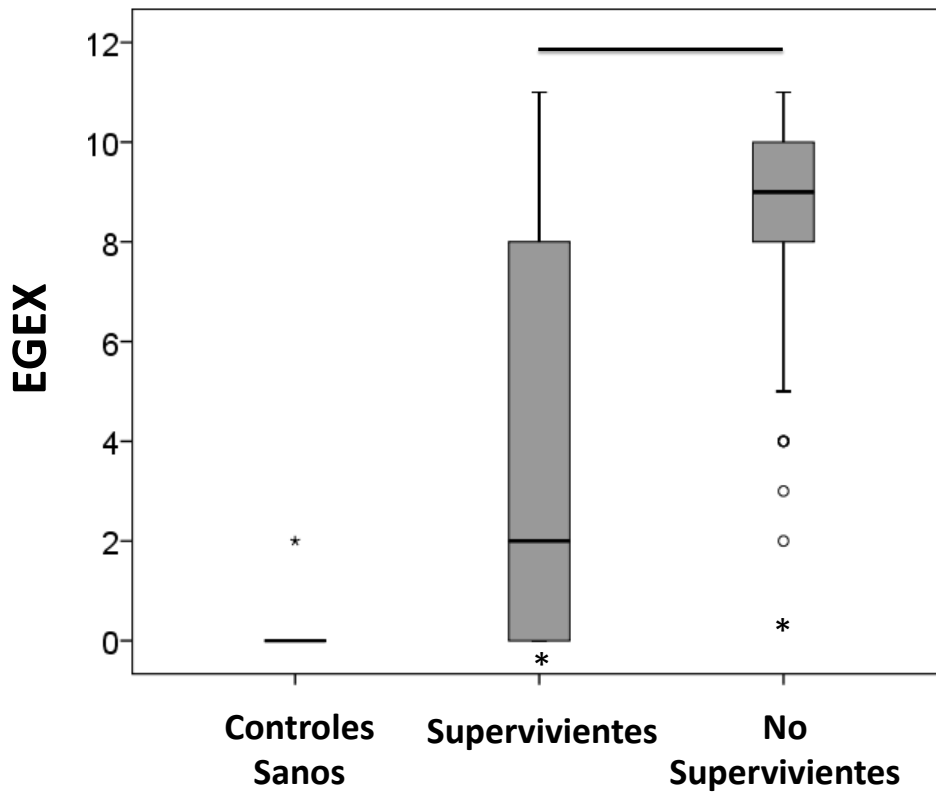


Figura 24. Diagrama de cajas representando los niveles de la escala EGEX. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al control sano y las líneas diferencias significativas entre el grupo de supervivientes y no supervivientes.

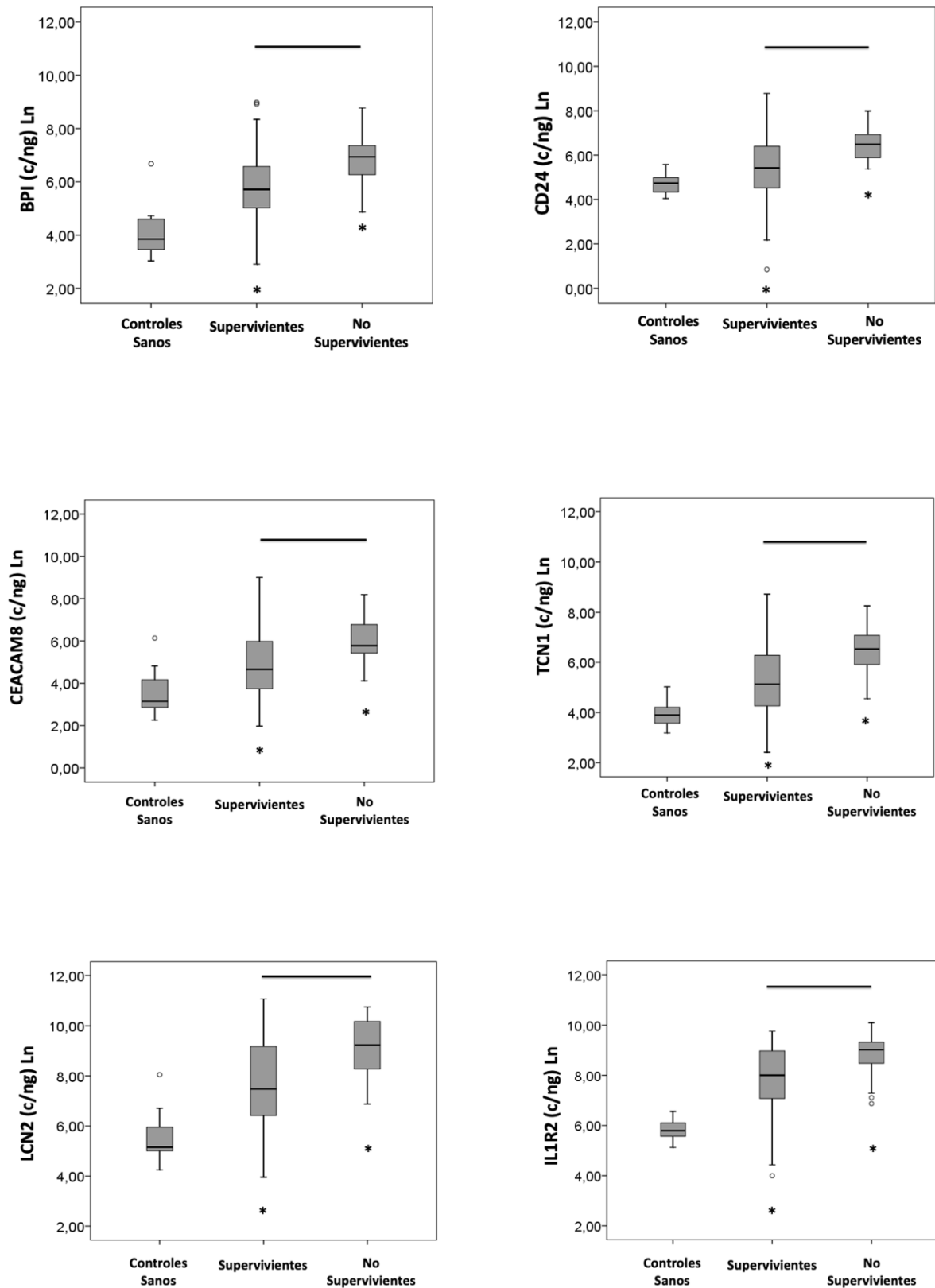


Figura 25. Diagrama de cajas representando los niveles de los genes que conforman la escala EGEX. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al control sano y las líneas diferencias significativas entre el grupo de supervivientes y no supervivientes.

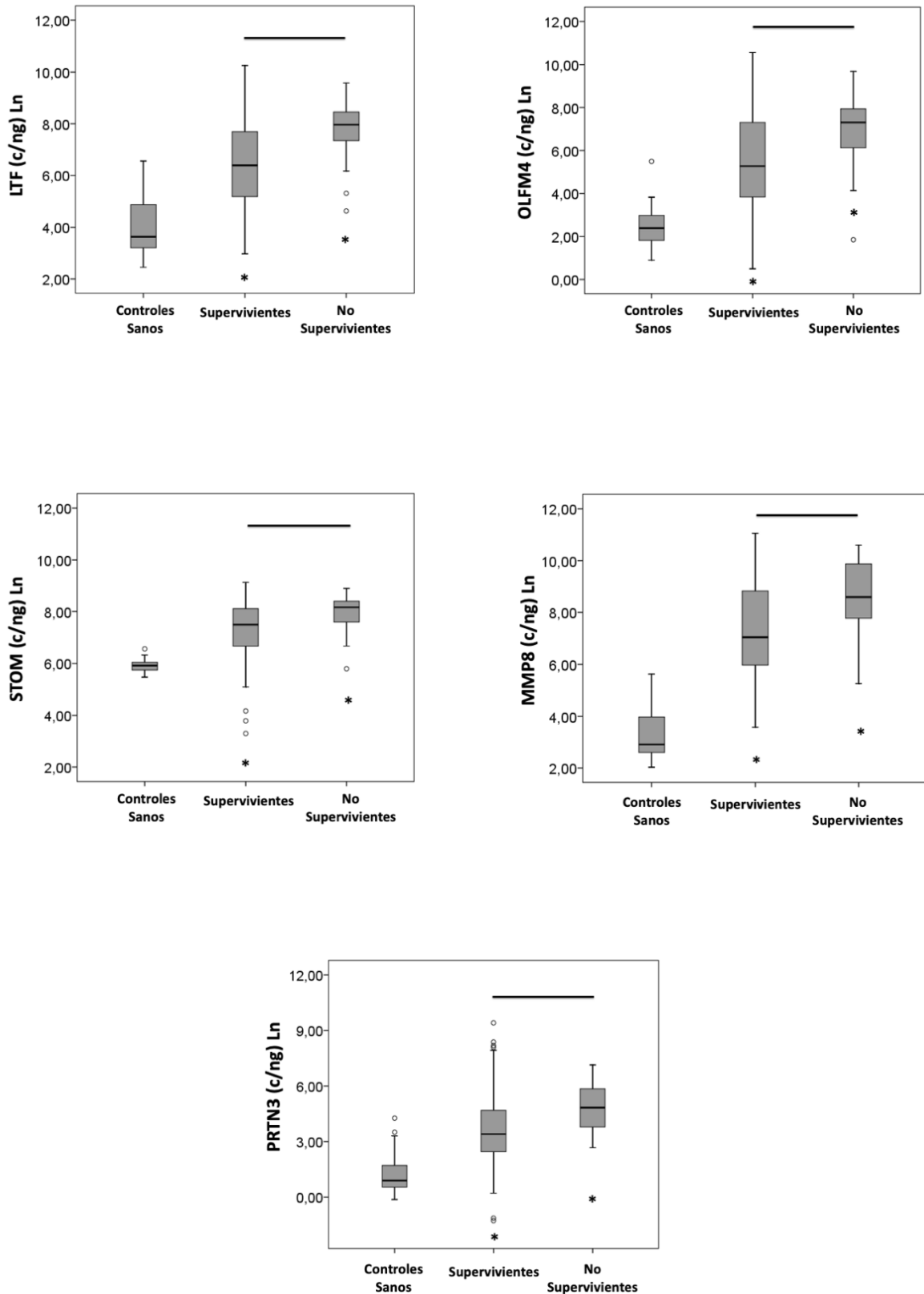


Figura 26. Diagrama de cajas representando los niveles de los genes que conforman la escala EGEX. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al control sano y las líneas diferencias significativas entre el grupo de supervivientes y no supervivientes.

Análisis de regresión multivariante para evaluar el riesgo de mortalidad en función de los niveles de EGEX:

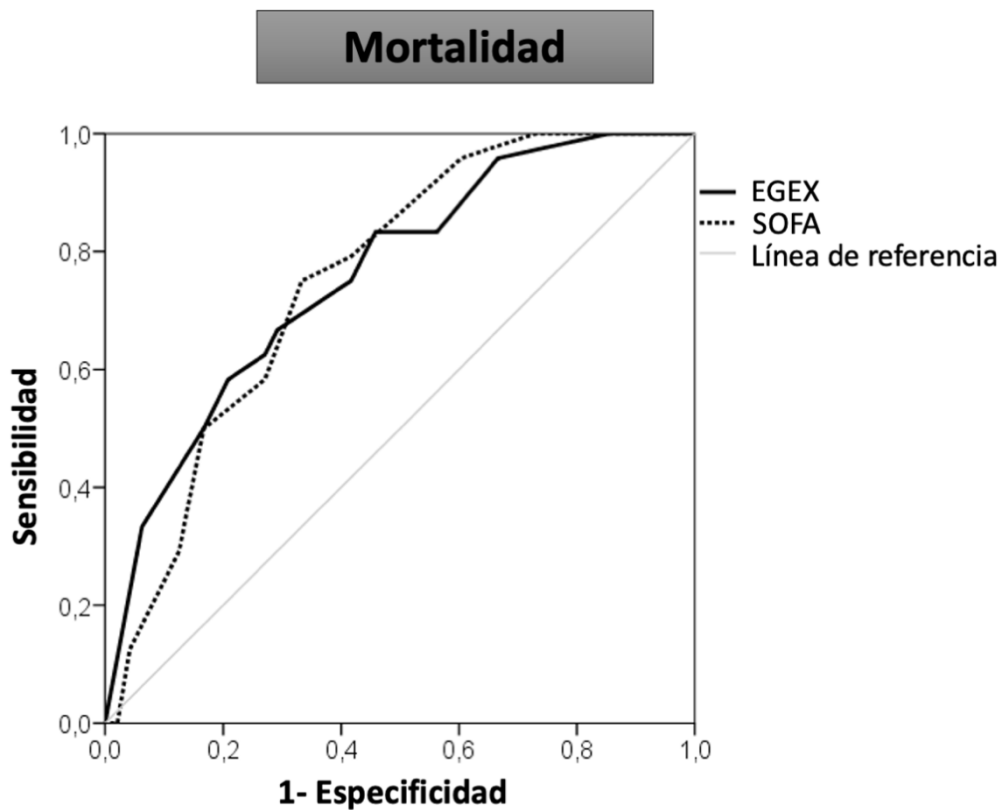
En el análisis de regresión multivariante para evaluar riesgo de mortalidad hospitalaria (tabla 29) se puede objetivar que la escala EGEX es un marcador independiente de riesgo de mortalidad en pacientes con infección y fallo de órgano. Asimismo, se calculó el OOP de la escala EGEX, que resultó ser de 8 puntos. Se puede apreciar en este mismo análisis que aquellos pacientes que mostraban más de 8 puntos en la escala EGEX tenían un riesgo cuatro veces superior de mortalidad.

	Análisis multivariante				Análisis multivariante para el OOP			
	OR	[IC 95%]		<i>p</i>	OR	[IC 95%]		<i>p</i>
Edad	1,06	0,99	1,13	0,104	1,05	0,98	1,11	0,170
Diabetes mellitus	2,18	0,68	6,94	0,190	2,32	0,72	7,50	0,159
Cirugía abdominal	1,94	0,51	7,38	0,334	1,83	0,48	7,05	0,378
Cirugía vascular	4,28	0,27	66,93	0,300	4,19	0,25	70,59	0,320
Foco de infección respiratorio	3,25	0,84	12,59	0,088	3,45	0,88	13,54	0,076
PCT (ng/mL) Ln	1,34	0,95	1,90	0,098	1,38	0,97	1,96	0,076
SOFA	1,25	0,99	1,60	0,066	1,23	0,96	1,57	0,098
Shock Séptico	2,31	0,63	8,42	0,205	2,66	0,73	9,70	0,139
EGEX	1,22	1,03	1,44	0,022	-	-	-	-
OOP EGEX (>8)	-	-	-	-	4,02	1,27	12,7	0,018

Tabla 29. Análisis multivariante para evaluar el riesgo de mortalidad. Ln: logaritmo neperiano; OOP: punto de corte.

Validación de estos resultados mediante datos de microarrays:

Se ha empleado una cohorte de 72 pacientes con infección y fallo de órgano para validar estos resultados. En dicha cohorte se han utilizado los niveles de expresión de los genes que forman la escala EGEX para construir la misma escala, pero en esta ocasión utilizando datos de microarrays de un estudio previo (Estudio EXPRESS)⁸³. Como se puede apreciar en la Figura 27, al igual que lo observado previamente mediante PCR digital, los datos de microarrays también confirmaron que la escala EGEX predice mortalidad hospitalaria con la misma precisión que la escala SOFA.



	ABC	[IC 95%]		p	Test de Hanley & McNeil
EGEX	0,76	0,64	0,87	< 0,001	n.s.
SOFA	0,76	0,64	0,87	< 0,001	

Figura 27. Área bajo la curva de la escala EGEX para evaluar su capacidad de predicción en comparación con la de la escala SOFA (cohorte de validación).

VII. DISCUSIÓN

Discusión

A lo largo de esta tesis doctoral se ha descrito que la sepsis es una patología en la que el diagnóstico precoz es esencial para poder realizar un tratamiento exitoso y mejorar la evolución y pronóstico de los pacientes.

Esto es particularmente difícil en el caso de la sepsis quirúrgica, en la que algunos síntomas pueden verse enmascarados por la propia cirugía o por el manejo postquirúrgico. En este contexto, parece clave contar con todas las herramientas posibles para solventar estas adversidades. En este sentido, los biomarcadores pueden jugar un papel clave a la hora de aportar información a los clínicos que les ayude en el momento del diagnóstico de esta patología, en la toma de decisiones terapéuticas, etc.

Durante la sepsis se promueve un estado proinflamatorio, prooxidativo y procoagulador en los vasos sanguíneos, favoreciendo la aparición de alteraciones en el tono vasomotor, la activación de plaquetas y la adhesión leucocitaria al endotelio y la transmigración⁵⁰. Por tanto, emplear una estrategia multimarcador, podría ser una herramienta de gran utilidad para valorar los diferentes aspectos que caracterizan esta patología.

En la sepsis se ha observado la existencia de una desregulación en la función del neutrófilo, desembocando en una alteración de la migración dirigida de los neutrófilos al foco de infección, donde se produce una respuesta antimicrobiana inadecuada⁷⁵. También, se han descrito alteraciones cuantitativas del neutrófilo en las formas graves de sepsis.

Una pérdida del balance entre formas maduras e inmaduras puede provocar respuestas ineficaces de los neutrófilos durante la sepsis⁷⁴. Se ha descrito la asociación entre la presencia de un mayor número de formas inmaduras del neutrófilo en sangre de pacientes sépticos y mal pronóstico⁷⁸. Estas formas inmaduras del neutrófilo contienen proteasas, que contribuyen a la protección del huésped contra los patógenos invasores, mediada por el sistema independiente del oxígeno del neutrófilo⁸⁰. Estas proteasas son eficaces en su

tarea de destruir patógenos, pero también pueden ocasionar daño celular y tisular^{81 82}, pudiendo provocar la pérdida de la integridad de la barrera endotelial⁶². En este contexto, se ha relacionado la presencia de altos niveles de expresión de marcadores del neutrófilo inmaduro como la elastasa, la mieloperoxidasa y la catepsina G con un mayor fallo de órgano y mortalidad⁸³.

Las evidencias presentes en la literatura revelan que la sepsis y sus factores de riesgo (envejecimiento y enfermedades crónicas) comparten huellas de disfunción endotelial, caracterizadas por la pérdida del equilibrio firmemente regulado del endotelio y por la activación sostenida de células endoteliales. Por tanto, el envejecimiento y la disfunción endotelial crónica contribuyen a generar un grado basal de fallo de órgano. Esto abre las puertas a un escenario de “fragilidad endotelial” que precede al desarrollo de la sepsis. La presencia de disfunción endotelial previa puede representar un factor predisponente para el desarrollo de nueva disfunción endotelial cuando el paciente sufre una infección, un fenómeno de “Disfunción endotelial aguda sobre crónica”, contribuyendo a desarrollar nueva disfunción orgánica en estos pacientes, o lo que es lo mismo, sepsis⁵⁰.

En base a lo previamente descrito, parece plausible pensar que monitorizar la disfunción endotelial puede ser de gran ayuda a la hora de predecir o detectar sepsis cuando un individuo de edad avanzada y con comorbilidades presenta signos de infección. Se han evaluado numerosos biomarcadores de disfunción endotelial^{137 138 139 140}, incluyendo como marcadores más relevantes aquellos de activación de células endoteliales (Angiopoyetina 2¹³⁹, Endocan¹⁴¹), marcadores de degradación del glicocáliz (Sindecán 1, ácido hialurónico, heparansulfato, condroitinsulfato¹⁴²), péptidos vasoactivos (MR-ProADM¹⁴³), moléculas de adhesión celular (Selectinas¹³⁹, ICAM1 y VCAM1¹⁴¹), inhibidores de la coagulación (THBD)¹³⁸, moléculas con actividad vasoconstrictora y vasopresora (Endotelina¹³⁹), entre otros.

Esta tesis pretende poner de manifiesto cuál es el papel que juegan los biomarcadores del neutrófilo y de daño endotelial en el diagnóstico, estratificación de gravedad y pronóstico de mortalidad en la infección, en el contexto de pacientes quirúrgicos, utilizando aproximaciones tanto transcriptómicas mediante PCR de última generación como proteómicas mediante tecnología multiplex.

UTILIDAD DE LA PCR DIGITAL:

Uno de los puntos fuertes de este trabajo, es la utilización de una tecnología novedosa como es la PCR de tercera generación, la PCR digital (ddPCR), para la cuantificación de expresión génica en sepsis. Además, para este trabajo se desarrolló un nuevo método para reportar los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión génica, el cual consistió en referir los mismos como copias de ADNc por nanogramo de ARNm de partida. Esto permitió obviar la utilización de genes de referencia.

Ventajas de la PCR digital frente a la PCR en tiempo real y la citometría de flujo:

A la hora de identificar potenciales biomarcadores en sepsis, las técnicas de cuantificación de la expresión génica más ampliamente utilizadas han sido los microarrays^{83 144} o la PCR de segunda generación, la PCR en tiempo real¹⁴⁵. Sin embargo, el empleo de la PCR digital para este fin es algo novedoso.

La PCR en tiempo real es una tecnología que requiere de la utilización de un gen de referencia, a partir del cual se elabora una curva patrón, lo que en numerosas ocasiones puede ocasionar problemas en la estandarización. Es una técnica que ofrece una medición de tipo semicuantitativo.

La PCR digital, por su parte, ofrece una cuantificación de ARNm absoluta en un tiempo inferior a las cuatro horas y con un coste de aproximadamente veintiséis euros por determinación. En contraste con la PCR en tiempo real, la PCR digital no requiere de la utilización de curvas patrón, por lo que evita problemas existentes con otras generaciones anteriores de PCR¹³⁵. Es una técnica exacta, rápida y fácilmente reproducible, por lo que parece una buena opción de cara a la aplicación clínica.

A diferencia de otras estrategias, la cuantificación de expresión génica por PCR digital es más fácil de estandarizar, por ejemplo, para la detección de precursores inmaduros del granulocito en sangre. En este contexto se emplean técnicas basadas en la evaluación por parte de un hematólogo de la morfología y características de las células en un frotis de

sangre. En otros casos, se puede emplear la citometría de flujo, cuya desventaja principal es la necesidad de preservar las células vivas para poder medir la unión de anticuerpos a la superficie de la célula. La PCR digital, sin embargo, no es esclava del tiempo, puesto que permite analizar la muestra tras haberla congelado en un tubo PaxGene, incluso meses después, siendo la cuantificación de la expresión génica igualmente fácil de estandarizar.

Existen ya antecedentes del uso de la PCR digital en otras patologías¹⁴⁶. Destaca, por ejemplo, su uso en la leucemia para la detección de moléculas tumorales en las muestras biológicas¹⁴⁷ o de enfermedad mínima residual tras la realización del trasplante de médula ósea. Sin embargo, en el caso de la sepsis apenas existen estudios en los que se emplee esta técnica. En este trabajo se remarca, además, su potencial aplicación en la clínica, ya que, no sólo se propone su utilización para detección o diagnóstico sino que se brinda la posibilidad de emplearla también tanto en el seguimiento y evolución de los pacientes como en el pronóstico.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE SEPSIS:

En cuanto al diagnóstico de sepsis, la elevación de los niveles de expresión de genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo se ha postulado como una huella de sepsis. Los hallazgos encontrados en este trabajo confirman resultados previos de diversos estudios. Así, en un estudio de microarrays (estudio EXPRESS) se identificaron, entre otros, los principales genes relacionados con las proteasas del neutrófilo y cuyos niveles de expresión se veían elevados en los pacientes con sepsis en comparación con el grupo de pacientes no infectados⁸³.

En coherencia con esto, este trabajo ha demostrado que la cuantificación en sangre de la expresión de genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo mediante PCR digital mejora la capacidad de la Procalcitonina (PCT) a la hora de diagnosticar sepsis en el paciente quirúrgico, siendo ésta el biomarcador más ampliamente utilizado para detectar la presencia de sepsis bacteriana, la forma más común de sepsis en el paciente quirúrgico^{107 148}.

En esta tesis se han evaluado ARNm correspondientes a genes que codifican proteasas del neutrófilo. Estas proteasas participan en la protección del huésped contra patógenos, mediada por el sistema independiente de oxígeno del neutrófilo⁸⁰. A pesar de ser muy eficaces en su capacidad de destruir patógenos, también son capaces de inducir daño celular y tisular^{81 82}. En este sentido, Fox *et al* han mostrado que los neutrófilos procedentes de pacientes con sepsis median una profunda pérdida de la integridad de la barrera endotelial⁶². Además, las proteasas serina del neutrófilo junto con los nucleosomas externalizados, promueven la formación de trombos en el interior de los vasos sanguíneos⁸⁶, contribuyendo de forma importante a la fisiopatología de la coagulación intravascular diseminada (CID) en la sepsis.

En este trabajo se puede observar como los niveles de expresión de MMP8, LCN2, OLFM4, LTF, PRTN3 y MPO aumentaban en los pacientes con sepsis y de forma paralela al aumento de la gravedad de los mismos. Estos niveles de expresión demostraron asociarse de forma significativa con la presencia de sepsis. Sin embargo, de todo ellos,

los genes que demostraron tener mejor capacidad que la PCT para diferenciar sepsis, superando un área bajo la curva de 0,80 fueron MMP8, LCN2, OLFM4 y LTF, siendo MMP8 y LCN2 los genes que presentaron un mejor balance entre sensibilidad y especificidad y una mayor asociación con la presencia de sepsis.

En consonancia con estos resultados, existe literatura al respecto que apoya los mismos. En un análisis de microarrays de Shen *et al*, MMP8 fue el gen que mejor distinguía entre presencia/ausencia de sepsis de entre todos los genes sobre-expresados en pacientes con traumatismo¹⁴⁴. Yazdan-Ashoori *et al* demostraron que los niveles de la proteína MMP8 aumentaban en pacientes con sepsis grave¹⁴⁹. MMP8 forma parte de PERSEVERE (Modelo de Riesgo de Biomarcadores en Sepsis Pediátrica), un modelo de riesgo para estimar la probabilidad de mortalidad en niños con shock séptico¹⁵⁰. Solan *et al* identificaron a MMP8 como un novedoso modulador de la inflamación durante la sepsis y como una potencial diana terapéutica en esta enfermedad¹⁵¹. Kangelaris *et al* evidenciaron la presencia de una sobreexpresión de MMP8 y OLFM4 en pacientes con distrés respiratorio inducido por sepsis¹⁵². MMP8, OLFM4 y PRTN3 forman parte de una huella de expresión de ARNm de veintinueve genes con capacidad predictiva de fallo renal agudo por sepsis¹⁵³. Alder *et al* han demostrado que la OLFM4 es un marcador candidato de un subtipo de neutrófilos patogénicos en el shock séptico¹⁵⁴.

Wang *et al* demostraron que los niveles de la proteína LCN2 en plasma eran una valiosa herramienta para el diagnóstico precoz de la sepsis en Urgencias¹⁵⁵. En un reciente meta-análisis, Zhang *et al* evidenciaron que la LCN2 es un factor predictivo eficaz de daño renal agudo durante la sepsis, mostrando un potencial valor en la predicción de mortalidad¹⁵⁶. En otro estudio empleando microarrays, Parnell *et al* descubrieron que la sobre-expresión de MPO y LTF era una huella característica de la sepsis¹⁵⁷.

Una fortaleza de este trabajo es que los resultados obtenidos con los genes de las proteasas del neutrófilo para el diagnóstico de sepsis se han confirmado tanto por análisis de área bajo la curva como a través de un robusto análisis multivariante, incluyendo variables representativas del grado de fallo de órgano, de la inflamación basal, la edad y las comorbilidades. Además, este estudio es pionero en poner en valor la cuantificación de ARNm por PCR digital para la detección de pacientes con sepsis. La PCR a tiempo real o los microarrays son estrategias ampliamente utilizadas para identificar la presencia de

sepsis^{83 144 145 157}. Sin embargo, el empleo de la PCR digital para evaluar la presencia de sepsis en el paciente quirúrgico, obteniendo puntos de corte de los genes evaluados, es algo totalmente novedoso y que puede ser de gran utilidad, ya que, la obtención de resultados de cuantificación de ARNm mediante esta técnica se produce en menos de cuatro horas, con un coste medio de 30 USD por determinación.

En resumen, estos resultados elucidan que la cuantificación de la expresión génica de genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo por PCR digital es una estrategia prometedora para mejorar el diagnóstico de sepsis en el paciente quirúrgico. MMP8 y LCN2 representan dos potenciales biomarcadores para el diagnóstico de sepsis, habiendo mejorado la capacidad de la procalcitonina para este fin.

En base a estos resultados, se decidió evaluar en todo el espectro de gravedad de la infección (infección, sepsis y shock séptico) y en el pronóstico de mortalidad el papel del neutrófilo, a través de la cuantificación de genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo y que son representativos de la granulopoyesis de emergencia y de las proteasas del neutrófilo a nivel de proteína, así como de daño endotelial a través de la cuantificación de proteínas representativas del mismo.

ESTRATIFICACIÓN DE GRAVEDAD:

Esta tesis ha puesto de manifiesto la existencia de una asociación entre un panel de siete biomarcadores relacionados con la disfunción endotelial [Fragmento Medio de la Proadrenomedulina (MR-ProADM), Sindecán 1 (SDC1), Trombomodulina (THBD), Angiopoyetina 2 (ANGPT2), Endocan (ESM1), Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 (VCAM-1) y Selectina E (SEL-E)] y la presencia de sepsis en pacientes con infección. Este hecho sugiere que la inducción de daño endotelial es un evento temprano en el desarrollo de disfunción orgánica.

Los biomarcadores que mostraron una mayor fuerza de asociación con la presencia de sepsis fueron SDC1 y MR-ProADM. SDC1 es un glucosaminoglucano desprendido del glicocáliz durante la sepsis, y sus niveles en plasma correlacionan con la escala SOFA¹⁵⁸¹⁵⁹. En este trabajo, fue la MR-ProADM la que demostró ser el biomarcador de daño endotelial con la asociación más fuerte y el mejor balance sensibilidad-especificidad para la detección de sepsis, con un área bajo la curva de 0,86. La Adrenomedulina, que se secreta desde diferentes órganos y tejidos, incluidas las células endoteliales vasculares, regula el tono vascular y la permeabilidad endotelial¹¹³. MR-ProADM, que es el fragmento medio de la proadrenomedulina, es más estable y refleja de forma directa los niveles de adrenomedulina activa, péptido que se degrada rápidamente¹⁶⁰. Cada vez hay más evidencias del valor de la MR-ProADM como marcador de gravedad en pacientes con infección¹¹⁷ y como predictor de fallo de órgano en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad¹¹⁸.

En la comparación entre sepsis y shock séptico, el número de biomarcadores de daño endotelial independientemente asociados a shock séptico cayó a cuatro (SDC1, MR-ProADM, THBD y ANGPT2). Sin embargo, seis biomarcadores involucrados en la degranulación del neutrófilo demostraron una asociación independiente con el shock séptico: Proteinasa 3 (una serin proteasa), Lipocalina 2 (una gelatinasa del neutrófilo), Receptor tipo 1 de la Interleukina 18 (un inductor de la degranulación del neutrófilo)¹⁶¹, Metaloproteínasa 8 (una colagenasa del neutrófilo), Lactoferrina (una importante proteína de unión a hierro) y Mieloperoxidasa (una proteína hemo). Sólo dos de estos

biomarcadores (Lipocalina 2 y Metaloproteínasa 8) mostraron ser relevantes para diferenciar la sepsis de la infección, sugiriendo un papel importante de la degranulación del neutrófilo en la patogénesis del shock séptico. Las proteínas liberadas por el neutrófilo podrían estar mediando efectos antibacterianos^{162 163 164 165 166} y podrían participar en la remodelación tisular¹⁶⁷, atenuación de la inflamación¹⁶⁸ y prevención de efectos deletéreos de las NETs¹⁶⁹ (trampas extracelulares del neutrófilo). Sin embargo, la presencia de altos niveles intravasculares de proteínas degranuladas por el neutrófilo podría inducir una mayor proteólisis¹⁷⁰, mayor daño endotelial y disfunción de órgano¹⁷¹
172 173 174 151.

La Proteínasa 3 y la Lipocalina 2 han mostrado las asociaciones más fuertes con la presencia de shock séptico. La degranulación del neutrófilo puede ocasionar una mayor permeabilidad endotelial a través de un mecanismo que, en parte, involucra la acción de la Proteínasa 3¹⁷⁵. Un modelo de biomarcadores que contiene la Proteínasa 3 es capaz de predecir el riesgo de fallo renal agudo derivado de la sepsis en pacientes con shock séptico¹⁷⁶. En nuestro trabajo, es la Lipocalina 2 la que muestra un mejor balance sensibilidad-especificidad para la detección de shock séptico. La Lipocalina 2 se ha utilizado en los servicios de urgencias hospitalarias para estratificación de riesgo, diagnóstico temprano y pronóstico en sepsis^{155 177}. Esta proteína se asocia con mortalidad y con el síndrome de disfunción multiorgánica en pacientes con sepsis grave y shock séptico¹⁷⁸. Además, la Lipocalina 2 ha sido propuesta como un predictor relativamente robusto para mortalidad a 28 días en sepsis grave¹⁷⁹.

Esta tesis ha dado a conocer que la granulopoyesis de emergencia es una huella preservada tanto de sepsis como de shock séptico, aunque en mayor grado en el shock séptico. Esto va en consonancia con lo hallado en un estudio previo¹⁸⁰, en el que se demostraba que en la sepsis, una mayor presencia de granulocitos inmaduros está relacionada con el deterioro clínico de los pacientes.

En cuanto a los biomarcadores de fase aguda, la Procalcitonina demostró modestas asociaciones con el riesgo de sepsis y shock séptico mientras que la Proteína C reactiva mostró una débil relación con el riesgo de sepsis. Esto indica que ni la Procalcitonina ni la Proteína C reactiva son adecuadas para la estratificación de gravedad en pacientes con infección.

Evaluar niveles en plasma de MR-ProADM y Lipocalina 2 podría contribuir a la estratificación de la gravedad en la infección, especialmente en aquellos escenarios donde calcular la escala SOFA no es posible. La cuantificación de estos biomarcadores podría ser una alternativa objetiva al cálculo de la escala SOFA, que requiere la recogida de ciertos parámetros que son subjetivos. La medición de biomarcadores proteicos es técnicamente más sencilla que la de aquellos biomarcadores transcriptómicos. El alza en el desarrollo de tecnologías “point of care” puede hacer que la medición de estos biomarcadores como parte de la rutina clínica pueda hacerse en menos de una hora¹³⁰.

PRONÓSTICO DE MORTALIDAD:

Los resultados derivados de este trabajo, obtenidos empleando una plataforma de PCR digital, avalan los hallazgos de estudios previos en los que se evidencia la existencia de una relación directa entre la magnitud de la granulopoyesis de emergencia y el pronóstico de los pacientes con infección grave^{78 180}. Este trabajo pone de manifiesto que la hiperexpresión simultánea de once genes representativos de la granulopoyesis de emergencia (BPI, CD24, TCN1, CEACAM8, LCN2, IL1R2, LTF, OLFM4, STOM, MMP8 y PRTN3), representada en forma de una escala combinada (EGEX), permite predecir mortalidad con una precisión muy similar a la de la escala SOFA. Esta evidencia se ha confirmado de forma retrospectiva mediante el análisis de datos procedentes de un estudio previo de microarrays, el estudio EXPRESS⁸³. La mayor parte de los genes que componen la escala EGEX se expresan en mielocitos y metamielocitos (TCN1, LTF, MMP8, LCN2, OLFM4, CD24, IL1R2). Por otra parte, son los promielocitos los que expresan BPI y PRTN3, y las células banda las que expresan CEACAM8. Finalmente, STOM se expresa en los promielocitos, pero no está claro hasta qué punto es expresado por los demás precursores del neutrófilo^{181 72 70 73 182}.

La existencia de una asociación entre genes de la granulopoyesis de emergencia y la infección grave ya había sido documentada en sepsis (MPO, ELANE, PRTN3, LTF)¹⁵⁷ y en gripe (LCN2, MMP8, MMP9, MPO, AZU1, BPI, CTSG, ELANE, LTF, PRTN3)¹⁸³. Sweeney T *et al*, a través de un análisis de cluster unificado de catorce bases de datos, describieron un subtipo de sepsis llamado “inflamopático” que se asociaba a una mayor mortalidad y que involucraba una mayor expresión en sangre de LCN2, LTF y OLFM4¹²⁶. Este mismo grupo de autores también encontró una mayor expresión de BPI en la sangre de pacientes no supervivientes de sepsis¹²⁵. También, Kangelaris KN *et al* demostraron la presencia de una mayor expresión de MMP8, OLFM4, CD24, LCN2, BPI en el distrés respiratorio secundario a sepsis¹⁵². Solan PD *et al* descubrieron que una elevada expresión de ARNm de MMP8 y de su actividad en el shock séptico, correlacionaba con una menor supervivencia y más fallo de órgano en pacientes pediátricos¹⁵¹. Alder MN *et al* pusieron de manifiesto que los pacientes con shock séptico y un alto porcentaje de neutrófilos

OLFM4+ tenían un mayor riesgo tanto de padecer más disfunción de órgano como de muerte¹⁵⁴.

A diferencia de otras estrategias empleadas para la detección de precursores inmaduros del granulocito en sangre, que se basan en frotis de sangre y en citometría de flujo, la cuantificación de expresión génica por PCR digital es fácil de estandarizar. En este sentido, el método empleado en esta tesis hace referencia al número de copias de ADNc medidas para cada gen sobre el total de ARNm analizado, haciendo posible que no sea necesario emplear genes de referencia^{129 100 184 118}. Esto haría más sencilla la implementación de la PCR digital en la práctica clínica como herramienta para la detección indirecta de la granulopoyesis de emergencia.

Una de las potencias que posee este trabajo es que se han incluido pacientes con infección, sepsis y shock séptico, lo que ha permitido cubrir todo el espectro de gravedad ocasionado por una infección. El empleo de la escala EGEX podría ser útil a la hora de estimar el riesgo de mortalidad de un paciente quirúrgico con infección, de forma fácil y objetiva, sin la necesidad de recoger los datos necesarios para calcular los 6 ítems de la escala SOFA.

En resumen, estos resultados evidencian que la existencia de una hiperexpresión en sangre de genes de la granulopoyesis de emergencia predice mortalidad en pacientes quirúrgicos con infección y fallo de órgano. Detectar mediante PCR digital la expresión elevada de los once genes contenidos en la escala EGEX podría ayudar a identificar a aquellos pacientes con infección que podrían requerir cuidados intensivos. Además, la escala EGEX, podría ser una herramienta de enriquecimiento pronóstico para seleccionar los individuos más graves que habría que reclutar en aquellos ensayos clínicos pensados para evaluar medicamentos destinados a mejorar el pronóstico de pacientes con infección o sepsis.

Limitaciones:

La principal limitación de este trabajo es que los biomarcadores se han comparado exclusivamente en el momento del diagnóstico de la infección, sepsis o shock séptico, es decir, en un corte transversal. Por ello, habría que validar mediante estudios prospectivos, realizando muestras seriadas, los resultados hallados en esta tesis doctoral: el potencial papel de los genes que codifican proteasas del neutrófilo en el diagnóstico diferencial de sepsis, el potencial papel de la MR-ProADM y la Lipocalina 2 en la predicción de gravedad en el paciente con infección o sepsis, y la capacidad de pronóstico de la escala EGEX durante la evolución de un paciente con infección grave.

Por otra parte, este trabajo se ha realizado en el contexto del paciente quirúrgico, por lo que parece lógico también, considerar la validación de estos resultados en pacientes con sepsis en otros escenarios clínicos.

Perspectivas futuras:

Cada vez son más los estudios que ponen de manifiesto la importancia del daño endotelial, la granulopoyesis de emergencia y la degranulación del neutrófilo en el desarrollo de la sepsis, y el papel que puede jugar la evaluación de biomarcadores que monitoricen estos aspectos a la hora de valorar un paciente quirúrgico. Como se ha propuesto en este trabajo, la valoración de niveles elevados de biomarcadores de daño endotelial, granulopoyesis de emergencia y degranulación del neutrófilo puede ser de utilidad tanto en el diagnóstico de la sepsis y el shock séptico, como en el pronóstico y evolución de la enfermedad. Esto abre la puerta a la incorporación de nuevas herramientas, que mediante tecnologías rápidas, fiables y reproducibles a nivel transcriptómico como la PCR digital y proteómico

como el Luminex, permitan evaluar todo el espectro de la enfermedad, así como nuevas oportunidades de tratamiento.

Un ejemplo de esto sería la combinación del tratamiento antibiótico con fármacos que protejan el endotelio en pacientes con infección, lo que podría prevenir el desarrollo de sepsis o mejorar la evolución de la misma. Existen ya numerosos estudios que proponen opciones terapéuticas para prevenir o tratar la disfunción endotelial^{140 185 186 187}, de los cuales, uno de los más prometedores a día de hoy es el de Marik *et al*, los cuales demuestran que la administración de vitamina C, corticoesteroides y tiamina previene la progresión de la disfunción orgánica y reduce la mortalidad en los pacientes con sepsis¹⁸⁸. En otro trabajo, se demuestra también que la hidrocortisona y el ácido ascórbico ejercen un efecto sinérgico, previniendo y reparando la disfunción de la barrera endotelial inducida por Lipopolisacárido¹⁸⁹. El desarrollo de modelos animales y celulares sería de gran ayuda para esclarecer el papel de los fármacos protectores del endotelio en la prevención y tratamiento de la sepsis en pacientes con infección.

Otro ejemplo sería poner el punto de mira en tratamientos orientados hacia el papel que juegan las proteínas contenidas en los gránulos de los neutrófilos. Hasta la fecha, sigue siendo desconocido el verdadero papel que juegan estas proteínas en la sepsis. Por un lado, existen evidencias sobre el papel deletéreo de estas proteínas sobre el endotelio vascular mediante la inducción de cambios en la permeabilidad transendotelial, la adhesión de neutrófilos y plaquetas al endotelio y la pérdida de la integridad del mismo^{190 191 192}. Por otro lado, la elevación de estas proteínas podría suponer un mecanismo reactivo con el objetivo de proteger el endotelio¹⁹³ o de prevenir los efectos deletéreos ocasionados por las NETs, las cuales tienen una función protectora contra patógenos, pero también se las ha relacionado con el desarrollo de trombosis y de una inflamación excesiva¹⁶⁹. Por tanto, una posible estrategia a seguir podría ser la modulación a la baja o el bloqueo de la expresión de proteínas de los gránulos del neutrófilo, que podría prevenir o disminuir la disfunción endotelial y proveer un beneficio clínico en la sepsis^{194 195}. Existe un creciente arsenal de fármacos emergentes que pueden inhibir los efectos ocasionados por las proteínas contenidas en los gránulos de los neutrófilos¹⁹⁶.

Hoy en día, no disponemos de un único biomarcador que por sí mismo haya resultado ser infalible en la sepsis. Por ello, como se ha defendido en este trabajo, recurrir a estrategias

multimarcador, evaluando eventos presentes en la fisiopatología de la sepsis como la disfunción endotelial, la degranulación del neutrófilo y la granulopoyesis de emergencia, es una buena herramienta que mejoraría las opciones disponibles actualmente, y cuya utilización podría tener implicaciones importantes en las diferentes facetas de esta enfermedad.

Se están poniendo a punto numerosas tecnologías “point of care” para mejorar el diagnóstico de la sepsis^{197 198}. Un ejemplo son los dispositivos multiplex para la realización de inmunoensayos proteómicos mediante microfluídica, como la plataforma Simple-Plex. Este tipo de tecnología es capaz de evaluar simultáneamente y con gran fiabilidad y precisión, niveles de varias proteínas en sólo noventa minutos y usando un volumen de plasma mínimo^{199 200}. Este tipo de técnicas suponen un paso más para el acercamiento de estas tecnologías a la rutina clínica. En relación con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, la puesta a punto de un point of care capaz de medir, por ejemplo, MR-ProADM y Lipocalina 2, podría ser una herramienta de gran utilidad para ayudarnos a evaluar la progresión de la gravedad en los pacientes con infección en cualquier escenario sanitario.

En resumen, la sepsis es una patología que supone una de las primeras causas de mortalidad en las UCIs y cuya prevalencia aumenta de forma progresiva. Además, conlleva el consumo de un gran volumen de recursos económicos en los hospitales. Por ello, es clave mejorar la capacidad de diagnóstico mediante herramientas que nos permitan hacerlo de forma más precoz, algo primordial para que el tratamiento tenga éxito y, por tanto, mejore el pronóstico de estos pacientes. En este trabajo se expone una herramienta novedosa, rápida, fiable y aplicable a la clínica, como es la PCR digital, para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes que codifican proteasas del neutrófilo en el paciente quirúrgico. Además, estos resultados demuestran que puede ser una herramienta útil para el seguimiento de la evolución de los pacientes a la hora de valorar su pronóstico y ayudar en la toma de decisiones terapéuticas.

Como traslucen estos resultados, parece que la presencia de daño endotelial es un evento temprano en el desarrollo de la fisiopatología de la sepsis. Parecería interesante, por tanto, realizar una monitorización previa para conocer el estado endotelial de los pacientes que van a someterse a una cirugía y así evaluar el riesgo que podrían tener de desarrollar una sepsis tras la misma. Este trabajo también ha revelado que la presencia de proteínas de los gránulos del neutrófilo se relaciona con la presencia de shock séptico, por lo que también sería útil monitorizar las mismas para evaluar el riesgo de un paciente con sepsis a progresar a un shock séptico. Por último, se ha visto que el incremento de la expresión de genes de la granulopoyesis de emergencia se asocia a un peor pronóstico en los pacientes con infección y fallo de órgano, por lo que monitorizarlas podría ayudarnos a predecir el pronóstico de estos pacientes.

En la actualidad, no se dispone de un biomarcador ideal para la sepsis que guíe en su manejo desde el diagnóstico de la enfermedad, su tratamiento, evolución, hasta su pronóstico. Este trabajo pone de manifiesto la utilidad de emplear estrategias multimarcador que nos permitan evaluar biomarcadores que representen los diferentes eventos que tienen lugar en la fisiopatología de la sepsis. Los resultados derivados de esta tesis doctoral avalan que el daño endotelial juega un papel importante en el paso de infección a sepsis, la degranulación del neutrófilo lo hace en el paso de sepsis a shock séptico, así como la granulopoyesis de emergencia lo hace en el evento último, que es la mortalidad.

VIII. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Comparado con los pacientes quirúrgicos no sépticos, los pacientes quirúrgicos con sepsis presentaron una elevación de los niveles de expresión en sangre de genes que codifican proteínas de degranulación del neutrófilo.
2. Los niveles de expresión de estos genes aumentaron a medida que aumentó la gravedad de la sepsis.
3. Los niveles de expresión génica de MMP8, LCN2, OLFM4 y LTF en sangre mejoraron la capacidad de diagnóstico de sepsis de la Procalcitonina, aunque el resto de genes estudiados presentaron también áreas bajo la curva significativas para la diferenciación entre presencia y ausencia de sepsis.
4. El aumento de los niveles de expresión génica en sangre de MMP8, LCN2, OLFM4 y LTF resultó ser un factor de riesgo independiente para la presencia de sepsis, de los cuales, MMP8 y LCN2 mostraron la mejor capacidad diagnóstica y un mejor balance entre sensibilidad y especificidad.
5. La presencia de niveles de expresión génica de MMP8 por encima de 386 copias/ng y de LCN2 superiores a 946 copias/ng incrementa por cinco y por doce, respectivamente, el riesgo de presentar sepsis en los pacientes quirúrgicos.
6. En los pacientes quirúrgicos con infección, a medida que aumenta la gravedad, existe una elevación de los niveles de biomarcadores representativos de la granulopoyesis de emergencia, la degranulación del neutrófilo y la disfunción endotelial.
7. La elevación de MR-ProADM, SDC1, THBD, ANGPT2, ESM1, VCAM1 y SEL-E en pacientes con sepsis, lleva a pensar que la disfunción endotelial es el evento fisiopatológico más representativo de la sepsis en comparación con la infección sin sepsis.

8. Los niveles plasmáticos elevados de MR-ProADM mostraron la asociación más fuerte y el mejor balance sensibilidad-especificidad para la detección de sepsis en la comparación entre sepsis e infección.
9. La degranulación del neutrófilo, caracterizada por la elevación de los niveles en plasma de Proteinasa 3, Lipocalina 2, Metaloproteinasa 8, Lactoferrina y Mieloperoxidasa, así como por la elevación de los niveles de expresión génica de IL18R1, fue el evento fisiopatológico más representativo que diferenciaba el shock séptico de la sepsis, siendo la Lipocalina 2 la que mostró un mejor balance sensibilidad-especificidad para la detección de shock séptico.
10. La elevación de niveles de expresión de genes relacionados con la granulopoyesis de emergencia es un evento biológico característico tanto de la sepsis como del shock séptico, aunque se observa de forma más evidente en este último, sobre todo, en los pacientes que fallecen.
11. En pacientes quirúrgicos con infección y fallo de órgano, la hiperexpresión simultánea de once genes representativos de la granulopoyesis de emergencia (BPI, CD24, TCN1, CEACAM8, LCN2, IL1R2, LTF, OLFM4, STOM, MMP8 y PRTN3), representada en forma de una escala combinada (EGEX), permite predecir mortalidad con una precisión muy similar a la de la escala SOFA. En estos pacientes, presentar más de 8 puntos en la escala EGEX conlleva un riesgo cuatro veces superior de mortalidad.
12. Los niveles plasmáticos de la Procalcitonina se asociaron de forma modesta con el riesgo de sepsis y shock séptico, mientras que los niveles plasmáticos de la Proteína C Reactiva mostraron una débil relación con el riesgo de sepsis.
13. Los resultados derivados de esta tesis doctoral apoyan la existencia de una desregulación en la función del neutrófilo, así como de disfunción endotelial en el contexto de una infección grave. La combinación de marcadores que reflejen estos fenómenos podrá ser de utilidad para el manejo clínico de pacientes quirúrgicos.

IX. RENDIMIENTO CIENTÍFICO

Título: Quantification of immune dysregulation by next generation Polymerase Chain Reaction to improve Sepsis diagnosis in surgical patients

Almansa R, Ortega A, Ávila-Alonso A, Heredia-Rodríguez M, Martín S, Benavides D, **Martín-Fernandez M**, Rico L, Aldecoa C, Rico J, López de Cenarruzabeitia I, Beltrán de Heredia J, Gomez-Sanchez E, Aragón M, Andrés C, Calvo D, Andaluz-Ojeda D, Liu P, Blanco-Antona F, Blanco L, Gómez-Herrerías JI, Tamayo E, Bermejo-Martin JF.

- **Revista: Annals of surgery. 2019 Mar;269(3):545-553.**

- **Cuartil: 1**

- **Especialidad: Cirugía**

- **Índice de Impacto (JCR 2019): 10,13**

Título: Endothelial dysfunction is an early indicator of sepsis and neutrophil degranulation of septic shock in surgical patients

Martin-Fernandez M, Vaquero-Roncero L.M, Almansa R, Gómez-Sánchez E, Martín S, Tamayo E, Esteban-Velasco M.C, Ruiz-Granado P, Aragón M, Calvo D, Rico-Feijoo J, Ortega A, Gómez-Pesquera E, Lorenzo-López M, López J, Doncel C, González-Sanchez C, Álvarez D, Zarca E, Ríos-Llorente A, Diaz-Alvarez A, Sanchez-Barrado E, Andaluz-Ojeda D, Calvo-Vecino J.M, Muñoz-Bellvís L, Gomez-Herrerías J.I, Abad-Molina C, Bermejo-Martin J.F, Aldecoa C, Heredia-Rodríguez M.

- **Revista: BJS Open. 2020 Jun;4(3):524-534**

- **Especialidad: Cirugía**

Título: Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease)

Bermejo-Martin JF, **Martín-Fernandez M**, López-Mestanza C, Duque P, Almansa R

- **Revista: Journal of Clinical Medicine. 2018 Oct 30;7(11):400.**

- **Cuartil: 1**

- **Especialidad: Medicina General e Interna**

- **Índice de Impacto (JCR 2019): 3,303**

Congresos Internacionales

Título: Lcn2 expression correlates with organ failure in surgical patients with infection.

M Martín-Fernández, R Almansa, S Montero, J Almeida Cristo-Barbosa, A Ortega, A Hernández Valero, E Gómez Sánchez, E Gómez Pesquera, J Rico-Feijoo, MC Esteban-Velasco, JM Calvo-Vecino, M Vaquero, C Aldecoa, E Tamayo, J Bermejo-Martín

39th ISICEM International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels March 19-22, 2019.

Título: LCN2 expression levels correlates with organ failure and septic shock development in infected surgical patients

E Jausoro-Saracho, **M Martín-Fernández**, S Montero, A Ríos-Llorente, C Esteban, J Bermejo-Martín

Euroanaesthesia 2019, The European Anaesthesiology Congress, Vienna June 1.3, 2019.

Título: Depressed expression of FCER1A gene is associated with increased mortality in infected surgical patients

R Almansa, C Andrés, **M Martín-Fernández**, S Montero, C Jambrina, C Doncel, J Sanchez-Crespo, M Heredia, J Rico, C Gonzalez, E Sanchez, M Lorenzo, S Martín, L Muñoz, M Vaquero, E Tamayo, C Aldecoa, J Bermejo

39th ISICEM International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels March 19-22, 2019.

Título: Procalcitonin combined with HLA-DRA improves sepsis detection in surgical patients

M. Martín Fernández, R. Almansa, S. Martín, M. Heredia Rodríguez, E. Gómez Sánchez, M. Aragón, A. Ortega, E. Gómez Pesquera, M. Lorenzo López, C. Aldecoa, E. Tamayo, J. Bermejo-Martin

28th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, April 21 – 24 April, 2018.

Título: Prognostic value of basophils in septic shock patients.

M Martín-Fernández, R Almansa, E Tamayo, D Andaluz-Ojeda, J Blanco, A Muriel, R Herran-Monge, M Heredia-Rodríguez, E Gómez-Sánchez, J F Bermejo-Martín

SEPSIS 2017 PARIS SYMPOSIUM, Paris September 12-13, 2017

Título: Quantification of LCN2/HLA-DRA response by next generation-PCR to improve sepsis diagnosis in surgical patients.

R Almansa, **M Martín-Fernández**, A Ortega, E Tamayo, C Aldecoa, A Ávila-Alonso, D Benavides, M Heredia-Rodríguez, S Martín, J F Bermejo-Martín

SEPSIS 2017 PARIS SYMPOSIUM, Paris September 12-13, 2017

Título: Basophils and mortality in septic shock.

M Martín-Fernández, R Almansa, E Tamayo, D Andaluz-Ojeda, J Blanco, A Muriel, R Herran-Monge, M Heredia-Rodríguez, E Gómez-Sánchez, J F Bermejo-Martín

**30th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, Vienna
September 23-27, 2017.**

Otros Artículos Internacionales

Título: COVID-19: What type of cytokine storm are we dealing with?

Monneret G, Benlyamani I, Gossez M, Bermejo-Martin JF, **Martín-Fernandez M**,
Sesques P, Wallet F, Venet F.

Revista: J Med Virol. 2020 Jul 18:10.1002/jmv.26317.

- Cuartil: 4

- Especialidad: Virología

- Índice de Impacto (JCR 2019): 2,021

Título: MR- proADM to detect specific types of organ failure in infection.

Andrés C, Andaluz-Ojeda D, Cicuendez R, Nogales L, Martín S, **Martin-Fernandez M**, Almansa R, Calvo D, Esteban-Velasco MC, Vaquero-Roncero LM, Ríos-Llorente A, Sanchez-Barrado E, Muñoz-Bellvís L, Aldecoa C, Bermejo-Martin JF.

Revista: Eur J Clin Invest. 2020 Jun;50(6):e13246.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Medicina General e Interna

- Índice de Impacto (JCR 2019): 3,481

Título: Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research.

Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler MS, Lachmann G, La Rosée P, Monneret G, Venet F, Bauer M, Brunkhorst FM, Kox M, Cavaillon JM, Uhle F, Weigand MA, Flohé SB, Wiersinga WJ, **Martin-Fernandez M**, Almansa R, Martin-Loeches I, Torres A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Girardis M, Cossarizza A, Netea MG, van der Poll T, Scherag A, Meisel C, Schefold JC, Bermejo-Martín JF.

Revista: Lancet Infect Dis. 2019 Dec;19(12):e422-e436.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Enfermedades Infecciosas

- Índice de Impacto (JCR 2019): 24,446

Título: Lymphocytopenia as a Predictor of Mortality in Patients with ICU-Acquired Pneumonia.

Ceccato A, Panagiotarakou M, Ranzani OT, **Martin-Fernandez M**, Almansa-Mora R, Gabarrus A, Bueno L, Cilloniz C, Liapikou A, Ferrer M, Bermejo-Martin JF, Torres A.

Revista: J Clin Med. 2019 Jun 13;8(6):843.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Medicina General e Interna

- Índice de Impacto (JCR 2019): 3,303

Título: Impact of Lymphocyte and Neutrophil Counts on Mortality Risk in Severe Community-Acquired Pneumonia with or without Septic Shock.

Güell E, **Martín-Fernandez M**, De la Torre MC, Palomera E, Serra M, Martinez R, Solsona M, Miró G, Vallès J, Fernández S, Cortés E, Ferrer V, Morales M, Yébenes JC, Almirall J, Bermejo-Martin JF.

Revista: J Clin Med. 2019 May 27;8(5):754.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Medicina General e Interna

- Índice de Impacto (JCR 2019): 3,303

Título: Composed endotypes to guide antibiotic discontinuation in sepsis.

Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, **Martin-Fernandez M**, Aldecoa C, Almansa R.

Revista: Crit Care. 2019 Apr 24;23(1):140.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Medicina Crítica

- Índice de Impacto (JCR 2019): 6,407

Título: Transcriptomic depression of immunological synapse as a signature of ventilator-associated pneumonia.

Almansa R, Nogales L, **Martín-Fernández M**, Batlle M, Villareal E, Rico L, Ortega A, López-Campos G, Andaluz-Ojeda D, Ramírez P, Socias L, Tamayo L, Vallés J, Bermejo-Martín JF, Martín-Loeches I.

Revista: Ann Transl Med. 2018 Nov;6(21):415.

- Cuartil: 2

- Especialidad: Medicina, Investigación y Experimental

- Índice de Impacto (JCR 2019): 3,297

Título: Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients.

Almansa R, Martín S, **Martin-Fernandez M**, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Sánchez E, Aragón M, Andrés C, Calvo D, Rico-Feijoo J, Esteban-Velasco MC, Vaquero-Roncero LM, Ortega A, Gómez-Pesquera E, Lorenzo-López M, de Cenarruzabeitia IL, Benavides D, López-Sanchez J, Doncel C, González-Sanchez C, Zarca E, Ríos-Llorente A, Diaz A, Sanchez-Barrado E, de Heredia JB, Calvo-Vecino JM, Muñoz-Bellvís L, Gomez-Herreras JI, Aldecoa C, Tamayo E, Bermejo-Martin JF.

Revista: Sci Rep. 2018 Aug 10;8(1):11999.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Ciencias Multidisciplinares

- Índice de Impacto (JCR 2019): 3,998

Título: Pre-sepsis: A necessary concept to complete the SEPSIS-3 picture?

Bermejo-Martin JF, **Martín-Fernandez M**, Almansa R.

Revista: J Crit Care. 2018 Apr;44:148.

- Cuartil: 3

- Especialidad: Medicina Crítica

- Índice de Impacto (JCR 2019): 2,685

Título: Immunological profiling to assess disease severity and prognosis in community-acquired pneumonia.

Bermejo-Martin JF, Almansa R, **Martin-Fernandez M**, Menendez R, Torres A.

Revista: Lancet Respir Med. 2017 Dec;5(12):e35-e36.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Medicina Respiratoria

- Índice de Impacto (JCR 2019): 25,094

Título: Characterizing Systemic Immune Dysfunction Syndrome to Fill in the Gaps of SEPSIS-2 and SEPSIS-3 Definitions.

Bermejo-Martin JF, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, **Martín-Fernández M**, Almansa R.

Revista: Chest. 2017 Feb;151(2):518-519.

- Cuartil: 1

- Especialidad: Medicina Crítica

- Índice de Impacto (JCR 2019): 8,308

Patentes

Solicitud de la patente europea titulada “IN VITRO METHOD FOR PREDICTING MORTALITY RISK IN PATIENTS SUFFERING FROM INFECTION WITH ORGAN FAILURE”.

Premios

Premio del Público en la III Edición del concurso “Three Minute Thesis (3MT)” de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Valladolid (EsDUVa).

Otros

Reportaje en la Sección Innovadores del periódico “El diario de Castilla y León”, publicado el 17 de mayo de 2020.

Quantification of Immune Dysregulation by Next-generation Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients

Raquel Almansa, PhD,* Alicia Ortega, MLT,* Ana Ávila-Alonso, B.Pharm,* Maria Heredia-Rodríguez, MD, PhD,† Silvia Martín, MD,‡ Diana Benavides, MD,§ Marta Martín-Fernandez, MSc,* Lucia Rico, MLT,* César Aldecoa, MD, PhD,‡ Jesús Rico, MD, PhD,‡ Iñigo López de Cenarruzabeitia, MD, PhD,§ Juan Beltrán de Heredia, MD, PhD,§ Esther Gomez-Sanchez, MD, PhD,† Marta Aragón, MD,† Cristina Andrés, B.Pharm,¶ Dolores Calvo, MD,¶ David Andaluz-Ojeda, MD, PhD,|| Pilar Liu, MD,† Francisco Blanco-Antona, MD,§ Lydia Blanco, MD, PhD,** Jose Ignacio Gómez-Herrerias, MD, PhD,† Eduardo Tamayo, MD, PhD,† and Jesus F. Bermejo-Martin, MD, PhD*

Objectives: To quantify immunological dysfunction in surgical patients with presence/absence of sepsis using a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) transcriptomic analysis. The study also aims to evaluate this approach for improving identification of sepsis in these patients.

Background: Immune dysregulation is a central event in sepsis. Quantification of the expression of immunological genes participating in the pathogenesis of sepsis could represent a new avenue to improve its diagnosis.

Methods: Expression of 6 neutrophil protease genes (*MMP8*, *OLFM4*, *LCN2/NGAL*, *LTF*, *PRTN3*, *MPO*) and also of 5 genes involved in the immunological synapse (*HLA-DRA*, *CD40LG*, *CD3E*, *CD28*, *ICOS*) was quantified in blood from 101 surgical patients with sepsis, 53 uninfected surgical patients, and 16 blood donors by using ddPCR. Areas under receiver operating characteristic curves (AUROC) and multivariate regression analysis were employed to test individual genes and gene ratios to identify sepsis, in comparison with procalcitonin.

Results: Sepsis-induced overexpression of neutrophil protease genes and depressed expression of immunological synapse genes. *MMP8/HLA-DRA*, *LCN2/HLA-DRA* outperformed procalcitonin in differentiating between patients with sepsis and surgical controls in the AUROC analysis: *LCN2/HLA-DRA*: 0.90 (0.85–0.96), *MMP8/HLA-DRA*: 0.89 (0.84–0.95), procalcitonin: 0.80 (0.73–0.88) (AUROC, confidence interval 95%), and also in the multivariate analysis: *LCN2/HLA-DRA*: 8.57 (2.25–32.62); *MMP8/HLA-*

DRA: 8.03 (2.10–30.76), procalcitonin: 4.20 (1.15–15.43) [odds ratio (confidence interval 95%)]. Gene expression levels of *HLA-DRA* were an independent marker of hospital mortality.

Conclusions: Quantifying the transcriptomic ratios *MMP8/HLA-DRA*, *LCN2/HLA-DRA* by ddPCR is a promising approach to improve sepsis diagnosis in surgical patients.

Keywords: droplet digital polymerase chain reaction, diagnosis, expression, gene, sepsis, surgical

(*Ann Surg* 2017;xx:xxx–xxx)

Sepsis has been classically defined as the exuberant, harmful, proinflammatory response to infection. This concept is changing¹ and the presence of a dysregulated host response to infection causing life-threatening organ dysfunction is now considered a central event in the pathogenesis of the disease.² In our view, this emerging conception of sepsis offers new opportunities to improve the diagnosis of this deadly condition.³

A major challenge for identifying the presence of sepsis is characterizing and quantifying immunological dysfunction, to distinguish it from the immunological profile of an uninfected patient. Transcriptomic analysis has demonstrated to be a valuable approach for evaluating immunity in this disease.^{4–6} Microarray studies coming from our group and others have identified the existence of increased expression of neutrophil protease genes and depressed expression of genes codifying for proteins involved in the immunological synapse between antigen presentation cells and T CD4 lymphocytes as 2 major features of immunological dysfunction in sepsis.^{4,6–9}

An important limitation of microarrays is that they are complicated assays that take days to be analyzed, providing just a semiquantitative measurement of gene expression. This makes microarrays a discovery tool, difficult to be applied to clinical practice. Gene expression quantification by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) has been proposed for fast identification of immunosuppression in sepsis patients, but it still provides relative quantification of gene expression.^{10,11} An excellent approach for achieving absolute quantification of gene expression is droplet digital PCR (ddPCR). ddPCR is a next-generation quantitative PCR method, which offers greater precision and reproducibility than currently available qRT-PCR methods.¹² This technique offers thus a new avenue to accurately measure the transcriptomic changes in blood associated to immunological dysfunction in sepsis.¹³

This work had 2 objectives: (1) to quantify immunological dysfunction in surgical patients with presence/absence of sepsis

From the *Group for Biomedical Research in Sepsis (Bio Sepsis), Hospital Clínico Universitario de Valladolid/IECSCYL, Valladolid, Spain; †Anesthesiology and Reanimation Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain; ‡Anesthesiology and Reanimation Service, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain; §General Surgery Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain; ¶Clinical Analysis Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain; ||Intensive Care Medicine Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain; and **Center for Hemodonation and Hemotherapy of Castilla y León (CHEMICYL), León, Spain.

The study was supported by the “Instituto de Salud Carlos III” and “Consejería de Sanidad de Castilla y León” for their financial support, grant numbers (EMER 07/050), (PI13/02110), (PI 15/01451), and (PI16/01156).

The authors report no conflicts of interests.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal’s Web site (www.annalsofsurgery.com).

Reprints: Jesus F. Bermejo-Martin, MD, PhD, Group for Biomedical Research in Sepsis (Bio Sepsis), Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL/IECSCYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain; E-mail: jfbermejo@saludcastillayleon.es.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0003-4932/16/XXXX-0001

DOI: 10.1097/SLA.0000000000002406

using a transcriptomic analysis of neutrophil protease and immunological synapse genes by ddPCR; (2) to evaluate this approach for improving identification of sepsis in these patients.

METHODS

Patients

A total of 101 adult patients (>18 years old) admitted to the Surgery Service or to the Surgical ICU of the participant hospitals with a diagnosis of sepsis (according to the definition proposed by the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference) were prospectively included in the study by the participant physicians from April 2013 to January 2016.¹⁴ Fifty-three surgical patients with no signs of infection neither at admission nor during hospitalization were recruited as control group with no sepsis. In addition, 16 blood donors of similar age of the patients were recruited as healthy controls. A specific standard survey was employed to collect the clinical data, including medical history, physical examination and hematological, biochemical, radiological, microbiological investigations, and biomarker levels. The severity of illness was assessed on admission by using the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score. A flow chart resuming patients' inclusion and exclusion process is shown in Supplementary file 1, <http://links.lww.com/SLA/B290>.

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 respective scientific committees for clinical research of the participant hospitals.

Microbiology

Standard cultures in biological samples guided by the presumptive source of the septic insult were performed to assess the presence of bacterial and fungal infection. Potentially contaminant microorganisms were not considered.

mRNA Analysis

Droplet Digital Polymerase Chain Reaction mRNA Extraction and Quality Evaluation

A sample of 2.5 mL of blood was collected by using PaxGene (BD) venous blood vacuum collection tubes in the first 12 hours following diagnosis of sepsis or in the first 12 hours following surgery in the case of the surgical controls. Blood from healthy individuals was collected at the moment of donation. Total RNA was extracted from blood samples using the PAXgene Blood RNA System (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland). The evaluation of concentration and quality was performed by spectrometry (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and RNA Experion Bioanalyzer (BioRad, CA). Only samples with good quality and concentration were tested by ddPCR (Supplementary file 1, <http://links.lww.com/SLA/B290>).

Gene Selection

Increased expression of neutrophil protease genes and depressed expression of antigen-presentation genes are 2 major immunophenotypes characterizing sepsis,¹ and are thought to play major roles in the pathogenesis of this disease (Table 1). In a previous work, we identified those genes which expression levels in blood differed in a significant manner between surgical patients with sepsis and those with no sepsis.⁴ From the list of genes obtained in this previous study, we selected those participating in either the neutrophil protease or in

the antigen presentation immunophenotypes, which showed the largest variation in their expression levels between patients with sepsis and those with no sepsis. This way, *OLFM4*, *MMP8*, *LCN2*, *LTF*, *PRTN3*, and *MPO* were selected for the neutrophil protease immunophenotype, and *HLA-DRA*, *CD40LG*, *CD3E*, *CD28*, and *ICOS* for the antigen presentation one. In that microarray study, median fold change of gene expression in patients with sepsis compared with those with no sepsis was as follows: *OLFM4* (14.9), *MMP8* (13.9), *LCN2* (7.9), *LTF* (7.7), *PRTN3* (4.7), *MPO* (4.0), *HLA-DRA* (-2.0), *CD40LG* (-2.2), *CD3E* (-1.9), *CD28* (-1.8), *ICOS* (-1.8).⁴

Quantification of Transcriptomic Response by Droplet Digital Polymerase Chain Reaction

Gene expression was quantified by ddPCR (BioRad) using predesigned TaqMan Assay Primer/Probe Sets, (FAM labeled MGB probes, Thermo Fisher/Scientific-Life Technologies, Waltham, MA): *MMP8*, matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) (reference Hs01029057_m1); *LCN2* (lipocalin-2, also known as neutrophil gelatinase-associated lipocalin, *NGAL*) (reference Hs01008571_m1); *OLFM4*, olfactomedin 4 (Hs00197437_m1); *LTF*, lactotransferrin (Hs00914334_m1); *PRTN3*, proteinase 3 (Hs01597752_m1); *MPO*, myeloperoxidase (Hs00924296_m1), *HLA-DRA*, major histocompatibility complex, class II, DR alpha (Hs00219575_m1); *ICOS*, inducible T-cell costimulator (Hs04261471_m1); *CD40LG*, CD40 ligand (Hs00163934_m1); *CD28*, CD28 molecule (Hs01007422_m1); *CD3E*, CD3e molecule (Hs01062241_m1). cDNA was generated from each sample on a Techne TC-512 thermal cycler (Bibby-Scientific, Staffordshire, OSA, UK) starting from 1000 ng of mRNA by using iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (BioRad, cat:1725038). The obtained volume of cDNA (20 μ L) was further diluted (1/25), and 2.5 μ L (5 ng of total mRNA) were employed for quantification of target gene expression according to the manufacturer instruction's. Briefly, ddPCR was performed using the BioRad QX200 ddPCR system, ddPCR Supermix for Probes (no dUTP), and BioRad standard reagents for droplet generation and reading. End-point PCR with 40 cycles was performed by using C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) after splitting each sample into approximately 20,000 droplets. Next, the droplet reader used at least 10,000 droplets to determine the percentage of positive droplets and calculation of copy number of cDNA per nanogram of initial mRNA.

Procalcitonin and C-reactive Protein Quantification

Procalcitonin (PCT) measurement in plasma was performed by electrochemiluminescence immunoassay on a chemistry analyzer (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Meylan, France); limit of detection 0.02 ng/mL. Serum C-reactive protein (CRP) was measured by particle enhanced immunoturbidimetric assay (e501 Module Analyzer, Roche Diagnostics); limit of detection 0.15 mg/dL.

Statistical Analysis

Differences in demographic and clinical characteristics between patient groups were assessed using the χ^2 test for categorical variables and the Mann Whitney *U* test for continuous variables (Fig. 1). Differences in gene expression levels and expression ratios were assessed using Mann Whitney *U* test. The accuracy of individual genes and gene expression ratios for identifying the presence/absence of sepsis was studied by calculating the area under the receiver operating characteristic curve (AUROC). We employed the Hanley and McNeil test to compare the AUROC curves obtained for the individual genes and gene ratios with that obtained for PCT, CRP, and the neutrophil/lymphocyte ratio.¹⁵ The optimal operating point (OOP) was calculated, being the value for which the point on the

TABLE 1. Description and Main Immunological Functions of the Genes Selected for This Study

Neutrophil proteases: Contribute to the neutrophil oxygen-independent system-mediated protection against invading pathogens, but they could mediate endothelial and tissue damage		Antigen presentation (AP) molecules: In sepsis, AP cells are decreased in lymphoid and nonlymphoid tissues, impairing immune regulation and antimicrobial T cell and antibody response			
Matrix metalloproteinase 8	<i>MMP8</i>	MMP8 coordinates leukocyte trafficking during inflammation and orchestrates the initial response to LPS. It is upregulated in sepsis, where high levels are associated with mortality	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	<i>HLA-DRA</i>	It binds peptides derived from antigens that access the endocytic route of antigen presenting cells and presents them on the cell surface for recognition by CD4 T-cells.
Lipocalin 2	<i>LCN2</i>	It plays a role in innate immunity by limiting bacterial growth as a result of sequestering iron-containing siderophores.	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5	<i>CD40LG</i>	It is expressed on the surface of T cells. It regulates B-cell function by engaging CD40 on the B-cell surface.
Olfactomedin 4	<i>OLFM4</i>	Septic shock patients with a high % of OLFM4 + neutrophils are at higher risk for greater organ failure burden and death.	T-cell surface glycoprotein CD3 Epsilon chain	<i>CD3E</i>	It forms the T-cell receptor-CD3 complex, which couples antigen recognition to intracellular signal-transduction pathways.
Lactotransferrin	<i>LTF</i>	It demonstrates properties as host defense against a broad range of microbial infections and anti-inflammatory activity.	T-cell-specific surface glycoprotein CD28	<i>CD28</i>	This gene is involved in T-cell activation, the induction of cell proliferation and cytokine production and promotion of T-cell survival.
Polymorphonuclear leukocyte serine protease	<i>PRTN3</i>	It induces activation of endothelial and epithelial cells, macrophages, lymphocytes, and platelets, and possesses antimicrobial properties.	Inducible T-cell costimulator	<i>ICOS</i>	It enhances T-cell responses to a foreign antigen and help B-cells for antibody secretion.
Myeloperoxidase	<i>MPO</i>	Part of the host defense system of polymorphonuclear leukocytes. Microbicidal activity against a wide range of organisms.			

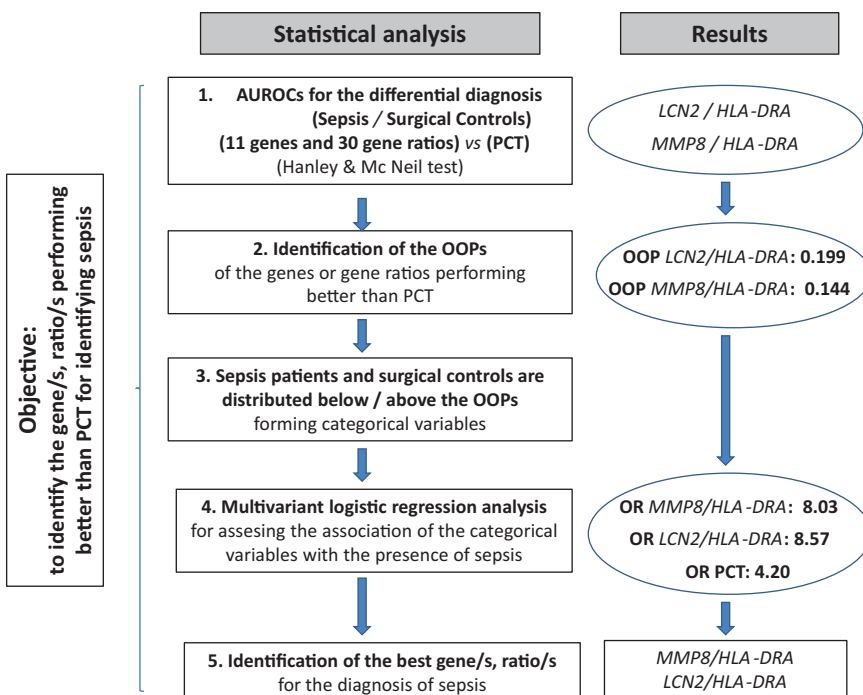


FIGURE 1. Flow chart explaining the statistical analysis and main results of the study. OR indicates odds ratio.

curve had the minimum distance to the upper left corner (where sensitivity = 1 and specificity = 1). By Pithagoras' theorem this distance is

$$OOP = \sqrt{(1 - \text{sensitivity})^2 + (1 - \text{specificity})^2}$$

Categorical variables were further created using the OOPs as cut-offs. The ability of these categorical variables to diagnose the

presence/absence of sepsis was further evaluated by using logistic regression analysis. Only those genes or ratios showing significant differences with PCT in the Hanley and McNeil test were evaluated in this analysis. Potential confounding factors for logistic regression were identified from those variables described in Table 2. Those variables yielding a P value of less than 0.1 in the univariate regression analysis were included in the multivariate one. Logistic regression was employed also to evaluate potential associations

TABLE 2. Clinical Characteristics of the Patients

		Sepsis Patients (n = 101)	Surgical Controls (n = 53)	P
Characteristics	Age [years, median (IQR)]	72.0 (15.0)	64.0 (18.0)	0.006
	Male	65.3 (66)	71.7 (38)	n.s.
Comorbidities, % (n)	High blood ressure	55.4 (56)	60.0 (30)	n.s.
	Chronic cardiovascular disease	47.5 (48)	34.0 (18)	n.s.
	Chronic respiratory disease	14.8 (15)	21.1 (11)	n.s.
	Chronic renal failure	14.9 (15)	2.0 (1)	n.s.
	Chronic hepatic failure	3.0 (3)	5.8 (3)	n.s.
	Neurologic disease	5.0 (5)	3.7 (2)	n.s.
	Cerebrovascular disease	4.0 (4)	5.6 (3)	n.s.
	Diabetes mellitus	34.0 (34)	18.8 (10)	0.005
	Cancer	29.7 (30)	45.3 (24)	0.050
	Immunosuppression	18.0 (17)	13.9 (5)	n.s.
	Surgery type, % (n)	Urgent surgery	63.4 (64)	3.8 (2)
Cardiothoracic		30.0 (30)	39.6 (21)	n.s.
Abdominal		62.0 (62)	43.4 (23)	n.s.
Neurosurgery		1.0 (1)	1.9 (1)	n.s.
Vascular		3.0 (3)	3.7 (2)	n.s.
Urological/renal		1.0 (1)	9.4 (5)	0.011
Other		3.0 (3)	1.9 (1)	n.s.
Time course and outcome	Length of hospital stay [days, median (IQR)]	26.5 (23.5)	10.0 (7.0)	<0.001
	Length of ICU stay [days, median (IQR)]	14.0 (17.0)	4.0 (3.0)	<0.001
	SIRS, % (n)	100.0 (101)	56.6 (30)	<0.001
	Septic shock, % (n)	61.4 (62)	n.a	n.a.
Source of infection, % (n)	Nonsurvivors at day 28, % (n)	19.8 (20)	0	<0.001
	Hospital mortality, % (n)	24.7 (25)	0	<0.001
	Unknown	14.8 (15)	n.a.	n.a.
	Respiratory tract	18.8 (19)	n.a.	n.a.
	Abdomen	45.5 (46)	n.a.	n.a.
	Urinary tract	4.9 (5)	n.a.	n.a.
	Surgical site	5.9 (6)	n.a.	n.a.
Microbiology, % (n)	Bacteremia	4.9 (5)	n.a.	n.a.
	Other	4.9 (5)	n.a.	n.a.
	Gram +	46.5 (47)	n.a.	n.a.
	Gram -	60.4 (61)	n.a.	n.a.
	Fungi	9.9 (10)	n.a.	n.a.
	Virus	2.0 (2)	n.a.	n.a.
	Polymicrobial	44.6 (45)	n.a.	n.a.
Measurements at diagnosis, [median (IQR)]	SOFA score	8 (6)	1 (3)	<0.001
	Total bilirubin (mg/dL)	0.7 (1.3)	0.8 (0.5)	n.s.
	Glucose (mg/dL)	152.0 (78.0)	135.0 (55.0)	n.s.
	Platelet count (cell/mm ³)	180,000.0 (194.7)	155,000.0 (740000)	n.s.
	INR	1.3 (0.4)	1.2 (0.4)	n.s.
	ScvO ₂ (%)	73.1 (19.0)	68.8 (80.0)	n.s.
	CRP (mg/L)	232.3 (169.2)	57.7 (77.7)	<0.001
	Procalcitonin (ng/mL)	5.5 (17.5)	0.5 (0.9)	<0.001
	White blood cells (cells/mm ³)	14,465.0 (10,257.5)	12,290.0 (4875.0)	0.023
	Lymphocytes (cells/mm ³)	944.32 (818.6)	1008.0 (894.3)	n.s.
	Monocytes (cells/mm ³)	1068.48 (51,887.6)	781.8 (1327.8)	n.s.
	Neutrophils (cells/mm ³)	12,337.0 (9220.5)	10,016.0 (4704.5)	0.017
	Eosinophils (cells/mm ³)	49.9 (2052.6)	12.3 (70.4)	0.019
	Basophils (cells/mm ³)	78.4 (1593.2)	28.8 (68.9)	0.006

Continuous variables are represented as median (interquartile range, IQR); categorical variables were represented as (% , n). ICU indicates intensive care unit; INR, international normalized ratio; n.a., not applicable; n.s., not significant; ScvO₂, central venous oxygen saturation; SIRS, systemic inflammatory response syndrome.

between gene expression levels and risk of hospital mortality in sepsis patients. Napierian logarithm values of gene expression levels were employed for this analysis. In addition, the gene selected by the multivariate analysis (*HLA-DRA*) for identifying hospital survivors was tested also by AUROC to identify the OOP, which was further used to distribute patients below or above this cut-off. The corresponding categorical variable created based upon this OOP was tested for the occurrence of death by using Kaplan-Meier curves. Groups were compared by the log-rank test (Mantel-Haenszel). For this analysis, time was censored at 28 days after diagnosis of sepsis. Significance level was fixed at *P* value less than 0.05. Data were analyzed by using the IBM SPSS 22.0 software (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Clinical Characteristics of the Patients

Elderly male predominated in both sepsis and surgical control groups, with sepsis patients being slightly older (Table 2). Profile of comorbidities was similar between sepsis cases and surgical controls, but the former showed a higher prevalence of diabetes mellitus. Sepsis patients needed of urgent surgery in 2/3 of the cases, whereas this was a rare event in controls. Kind of surgery was similar in both groups. Sepsis patients stayed longer at the hospital/ICU, presented with a higher degree of organ failure as assessed by the SOFA score. None of the patients of the surgical control group died, but 1/4 of sepsis patients did not survive to the disease. Most common sources of infection were the abdominal and respiratory ones. Regarding origin of sepsis, in 60 cases sepsis was of nosocomial origin, and in 41 cases sepsis was originated in the community (Supplementary file 1, <http://links.lww.com/SLA/B290>). Delay from hospital admission to recruitment was 9.5 days in median in the case of nosocomial sepsis and 1 day in the case of community acquired sepsis (*P* < 0.001). Sepsis patients showed higher levels of CRP and PCT, higher counts in blood of leukocytes, neutrophils, eosinophils, and basophils. Both cases and controls had lymphocyte median levels ranging lymphopenia (<1000 lymphocytes/mm³).

Microbiology

Approximately 84.2% of the sepsis patients (*n* = 85) showed at least 1 positive identification in the microbiological tests. About 39.5% of the positive cultures corresponded to facultative anaerobic Gram-negative bacilli of the *Enterobacteriaceae* family, being the most common microorganism *Escherichia coli* (*n* = 31). Approximately 32.93% were aerobic or facultative anaerobic Gram-positive cocci, being *Staphylococcus epidermidis* (*n* = 10) and *Enterococcus faecium* (*n* = 10) the microorganisms most frequently found in this category. Fungi represented the 5.99% of the positive microbiological cultures, with *Candida albicans* as the most common one (*n* = 6). The remaining 21.57% of the positive cultures belonged to other microbiological species.

Variation of Gene Expression and Ratios Across Groups (Supplementary File 2, <http://links.lww.com/SLA/B290>)

Surgical controls presented significant higher concentrations in plasma of PCT and expression levels in blood of MMP8 than healthy controls, reflecting the existence of an active inflammatory process at the systemic level in postoperated patients with no infection. In turn, surgical controls showed significant lower levels of *HLA-DRA*, *CD40LG*, *CD3E*, *CD28*, and *ICOS* than healthy controls, suggesting depression of adaptive immunity in these patients. Surgical controls also showed significant higher gene expression ratios than healthy controls (except *LTF/HLA-DRA*,

PRTN3/HLA-DRA). Sepsis induced even more expression of neutrophil proteases and down-modulation of immunological synapse genes. As we had already evidenced in a previous work,⁴ in sepsis, patients changes in gene expression paralleled organ failure degree, with neutrophil proteases increasing and immunological synapse genes decreasing in their expression levels with SOFA score, which translated into gene expression ratios which grew with disease severity. Levels of PCT increased also with sepsis severity.

Accuracy of Individual Genes and Gene Expression Ratios for the Diagnosis of Sepsis

When the accuracy of genes and ratios for differentiating between sepsis patients and surgical uninfected controls was evaluated, a number of them yielded AUROCs higher than 0.80 for distinguishing sepsis patients from surgical controls (Table 3), but only the ratios *LCN2/HLA-DRA*, *MMP8/HLA-DRA* yielded AUROCs improving that of PCT in a significant manner (Table 3 and Fig. 2). When these ratios were compared with other biomarkers purposed for the diagnosis of infection and sepsis (CRP and the neutrophil/lymphocyte ratio), they still worked better for identifying the presence of sepsis, as evidenced the Hanley and McNeil test, which yielded significant *P* values (<0.05) for the comparisons between AUROCs: *LCN2/HLA-DRA*: 0.90 (0.85–0.96), *MMP8/HLA-DRA*: 0.89 (0.84–0.95), CRP: 0.81 (0.73–0.89), neutrophil/lymphocyte ratio: 0.64 (0.55–0.73). Consistent with the results of this first AUROC analysis, the *LCN2/HLA-DRA* and the *MMP8/HLA-DRA* ratios were selected to undergo a further multivariate one.

Multivariate Analysis for Evaluating Risk of Sepsis

This analysis revealed that exhibiting *LCN2/HLA-DRA* or *MMP8/HLA-DRA* values over the OOPs identified in the AUROCs translated into a stronger probability of sepsis than that showed by the patients with PCT levels over its respective OOP value (Table 4). Interestingly, this association with the risk of sepsis was independent of the basal inflammatory activity of the patient, as assessed by (neutrophil concentration in blood) and (CRP levels in serum), which were introduced as adjusting variables in the multivariate analysis. The presence of ratios over the OOPs improved the sensitivity, specificity, and predictive values showed by PCT (Table 4).

Comparison of *LCN2/HLA-DRA*, *MMP8/HLA-DRA*, *LCN2*, *MMP8*, *HLA-DRA*, and PCT across the different groups of patients and controls is shown in Figure 3. Surgical controls did not show significant differences between them for the levels of these parameters depending on the presence or absence of SIRS (data not shown). In consequence, they could be considered as a single group for the statistical analysis detailed above.

Biomarker's Combination to Identify Sepsis

We next employed logistic regression to build probabilistic functions combining biomarkers to differentiate sepsis patients from surgical controls. The resulting probabilistic functions created were tested for their ability to identify sepsis by AUROC analysis. Results of individual biomarkers and also of the combinations were as follows, expressed as [AUROC, (confidence interval 95%), *P*]: (1) PCT [0.80 (0.73–0.88), <0.001]; (2) *LCN2/HLA-DRA* [0.90 (0.85–0.96), <0.001]; (3) *MMP8/HLA-DRA* [0.89 (0.84–0.95), <0.001]; (4) *LCN2/HLA-DRA* + *MMP8/HLA-DRA* [0.86 (0.79–0.93), <0.001]; (5) *LCN2/HLA-DRA* + PCT [0.90 (0.86–0.95), <0.001]; (6) *MMP8/HLA-DRA* + PCT [0.89 (0.84–0.95), <0.001]; (7) *LCN2/HLA-DRA* + *MMP8/HLA-DRA* + PCT [0.91 (0.86–0.96), <0.001]. No significant differences were found between the AUROCs obtained with the combinations compared to that obtained by *LCN2/HLA-DRA* or *MMP8/HLA-DRA* alone.

TABLE 3. Diagnostic Accuracy of Genes and Ratios for Diagnosis the Presence of Sepsis

	AUROC for Distinguishing Sepsis From Controls					Differences With the AUROC for PCT		
	Area	[CI 95%]		P	OOP	Se (%)	Sp (%)	P
LCN2/HLA-DRA	0.90	0.85	0.96	<0.001	0.199	85.1	81.1	0.017
MMP8/HLA-DRA	0.89	0.84	0.95	<0.001	0.144	83.2	84.9	0.030
LCN2/CD40LG	0.88	0.81	0.94	<0.001	17.416	85.1	83.0	0.090
LCN2/CD3E	0.88	0.81	0.94	<0.001	1.504	86.1	83.0	0.090
OLFM4/HLA-DRA	0.87	0.81	0.93	<0.001	0.028	78.2	84.9	0.095
LTF/HLA-DRA	0.87	0.81	0.93	<0.001	0.072	83.2	81.1	0.106
MMP8/CD40LG	0.87	0.81	0.94	<0.001	6.92	85.1	79.2	0.106
MMP8/CD3E	0.87	0.81	0.93	<0.001	1.07	82.2	83.0	0.106
LCN2/CD28	0.87	0.81	0.93	<0.001	8.049	88.1	79.2	0.129
MMP8/CD28	0.87	0.81	0.93	<0.001	5.68	82.2	81.1	0.129
LCN2/ICOS	0.87	0.80	0.93	<0.001	21.215	89.1	81.1	0.149
MMP8/ICOS	0.86	0.80	0.93	<0.001	14.075	82.2	81.1	0.163
MMP8	0.86	0.80	0.92	<0.001	386	80.2	79.2	0.186
LCN2	0.86	0.80	0.92	<0.001	946	74.3	88.8	0.194
OLFM4/CD3E	0.86	0.79	0.92	<0.001	0.113	85.1	81.1	0.203
LTF/CD3E	0.86	0.79	0.92	<0.001	0.558	81.2	81.1	0.203
OLFM4/CD40LG	0.85	0.79	0.92	<0.001	1.201	85.1	79.2	0.248
OLFM4/CD28	0.85	0.78	0.91	<0.001	0.746	84.2	81.1	0.299
PRTN3/HLA-DRA	0.85	0.78	0.91	<0.001	0.005	80.2	77.4	0.321
LTF/CD40LG	0.85	0.78	0.91	<0.001	5.875	79.2	81.1	0.321
OLFM4/ICOS	0.84	0.78	0.91	<0.001	2.533	82.2	81.1	0.344
LTF/CD28	0.84	0.77	0.91	<0.001	3.955	79.2	83.0	0.392
OLFM4	0.83	0.77	0.9	<0.001	86.4	77.2	81.1	0.471
PRTN3/CD3E	0.83	0.76	0.9	<0.001	0.043	80.2	81.1	0.542
LTF/ICOS	0.83	0.76	0.9	<0.001	10.165	77.2	81.1	0.586
MPO/HLA-DRA	0.83	0.75	0.9	<0.001	0.010	79.2	80.8	0.601
PRTN3/CD40LG	0.83	0.75	0.9	<0.001	0.472	78.2	79.2	0.601
PRTN3/CD28	0.82	0.74	0.89	<0.001	0.257	78.2	79.2	0.757
LTF	0.81	0.74	0.88	<0.001	259	76.2	79.2	0.886
PCT	0.80	0.73	0.88	<0.001	1.115	73.3	75.5	NA
HLA-DRA*	0.80	0.73	0.87	<0.001	3464	69.8	76.2	NA
PRTN3/ICOS	0.80	0.72	0.88	<0.001	0.651	79.2	75.5	NA
MPO/CD3E	0.80	0.72	0.88	<0.001	0.087	75.2	82.7	NA
PRTN3	0.78	0.70	0.85	<0.001	1.308	68.0	74.5	NA
MPO/CD40LG	0.78	0.70	0.86	<0.001	1.102	69.3	82.7	NA
MPO/CD28	0.77	0.69	0.85	<0.001	0.485	70.3	78.8	NA
MPO/ICOS	0.75	0.67	0.83	<0.001	1.237	74.3	71.2	NA
CD3E*	0.73	0.64	0.82	<0.001	414	71.7	63.4	NA
CD40LG*	0.72	0.64	0.81	<0.001	42.2	71.7	66.3	NA
CD28*	0.70	0.61	0.78	<0.001	72.2	69.8	60.4	NA
ICOS*	0.67	0.59	0.76	<0.001	25.4	69.8	58.4	NA
MPO	0.67	0.58	0.75	0.001	48.2	55.4	76.9	NA

The areas under receiving operating curves for differential diagnosis between patients with sepsis and surgical controls are presented here. At the right the table shows the results from the Hanley and McNeil test to evaluate the statistical significance of the difference between the AUROC curves of our genes and ratios and that of PCT (only those comparisons involving the genes or ratios with AUROCs higher than that of PCT were performed).

*AUROC for detecting the absence of sepsis. Results for gene expression levels are provided as cDNA copies/ng total mRNA. Results for PCT are provided as ng/mL. Ratios are provided as adimensional values.

NA indicates not applicable; Se, sensitivity; Sp, specificity.

Association Between Gene Expression Levels and Mortality

Univariate analysis showed a direct, significant association between expression levels of *MMP8*, *LCN2*, *LTF*, and *PRTN3* with the risk of hospital mortality (data not shown). Nonetheless, *HLA-DRA* was the only gene evidencing a significant (inverse) association between expression levels and mortality risk in both the univariate [0.50 (0.28–0.90), 0.020] and multivariate analysis [0.34 (0.16–0.75), 0.007] [odds ratio (confidence interval 95%), *P*]. Adjusting variables for this analysis were (SOFA score) and (diabetes mellitus) (presence of gram+) (presence of fungal infection). Kaplan-Meier analysis showed that patients with gene expression levels of *HLA-DRA* below 1976 cDNA copies per nanogram of total mRNA died 2.5

days before in average (survival mean time of 23.3 vs 25.8 days) (Fig. 4).

DISCUSSION

Our results evidence that quantification of the transcriptomic ratios *LCN2/HLA-DRA*, *MMP8/HLA-DRA* in blood by using ddPCR improves the performance of PCT for the diagnosis of sepsis in surgical patients. PCT is still the biomarker most commonly employed for ruling in the presence of sepsis of bacterial origin, the most frequent in surgical patients.^{16,17} In addition, the ratios performed better to identify sepsis than other easily accessible measurements such as CRP¹⁷ or the neutrophil to lymphocyte count ratio.¹⁸

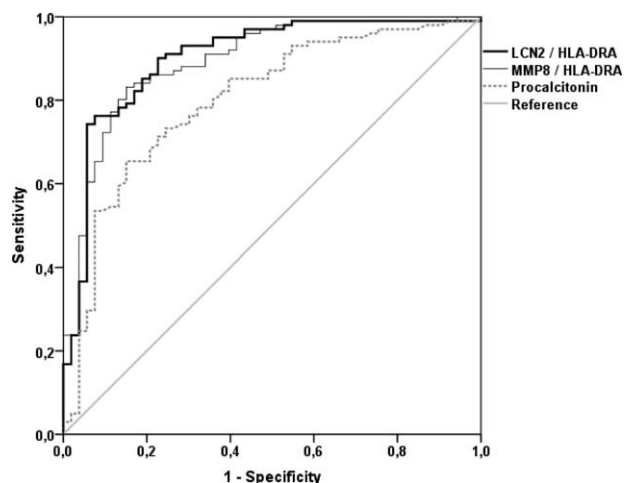


FIGURE 2. AUROC to differentiate sepsis patients from surgical controls. Only the AUROCs for the ratios showing differences with procalcitonin in the Hanley and McNeil test are showed.

mRNAs evaluated in this study coded for neutrophil proteases and proteins participating in the immunological synapse (Table 1). Neutrophil proteases contribute to the neutrophil oxygen-independent system-mediated protection of the host against invading pathogens. Although effective in their ability to kill pathogens, they are equally effective at inducing cell and tissue damage.⁴ Genes participating of the immunological synapse are involved in the switch from innate to adaptive immunity, which is the stage of the immune response where resolving infection moves from nonspecific mechanisms to the generation of antigen-specific T cells and antigen-specific antibodies that clear the patient of the invading pathogen.¹

This study confirms previous findings from our group and others which identified increased expression levels of neutrophil proteases genes and depressed ones of immunological synapse genes as a hallmark of sepsis. As said in before in this article, in a microarray study profiling gene expression in whole blood from surgical patients, we found that sepsis patients had increased expression levels of *MMP8*, *LCN2* (*NGAL*), *OLFM4*, *LTF*, *PRTN3*, and *MPO* and depressed expression of *HLA-DRA*, *CD40LG*, *CD3E*, *CD28*, and *ICOS* as compared to a group of uninfected patients.^{4,19} In the microarray analysis from Shen et al,²⁰ *MMP8* ranked first between the upregulated genes distinguishing between presence/absence of sepsis in trauma patients. Yazdan-Ashoori et al²¹ demonstrated that levels of the protein *MMP8* raise in plasma from patients with severe sepsis. *MMP8* forms part of PERSEVERE (PEdiatRic SEpsis biomarkEr Risk modEl), a risk model to estimate mortality probability in children with septic shock.²² Solan et al²³ identified *MMP8* as a novel modulator of inflammation during sepsis and a

potential therapeutic target in this disease. Kangelaris et al⁷ evidenced the presence of upregulation of *MMP8* and *OLFM4* in patients with early sepsis-induced ARDS. *MMP8*, *OLFM4*, and *PRTN3* forms part of an mRNA expression signature of 21 genes with predictive capacity for septic acute kidney injury.²⁴ Alder et al²⁵ have recently demonstrated that *OLFM4* is a candidate maker for a pathogenic neutrophil subset in septic shock. Wang et al²⁶ demonstrated that levels in plasma of the protein *LCN2* (*NGAL*) are a valuable tool for early diagnosis of sepsis in the emergency department. In a recent meta-analysis, Zhang et al²⁷ showed that *LCN2* (*NGAL*) is an effective predictive factor for acute kidney injury during sepsis showing potential value for mortality prediction. Parnell et al⁹ found increased expression of *MPO*, *LTF*, along with depressed one of *CD40LG*, *CD3E*, and *HLA-DRA* as a characteristic signature of sepsis, using microarrays. In turn, in another microarray study, Davenport et al²⁸ identified downregulation of *HLA-DR*, *CD3E*, *CD28*, *ICOS*, and *CD40LG* in patients with sepsis due to community-acquired pneumonia.

A major strength of the present work is that the results obtained for the diagnosis of sepsis with the ratios *LCN2/HLA-DRA* and *MMP8/HLA-DRA* have been confirmed not only by AUROC analysis but also using a robust multivariate analysis, which included variables controlling for organ failure degree, basal inflammatory status, age, and comorbidities. Another particular strength of our study is that it is pioneer in evidencing the potential of mRNA quantification using ddPCR for identifying patients with sepsis. Although quantification of expression levels of individual genes using microarrays or qRT-PCR has been a widely employed approach to identify the presence of sepsis, using ddPCR to obtain expression ratios between up- and downregulated genes is a totally novel approach to diagnose this disease. Moreover, the cut-offs for the ratios provided in Table 4 could be potentially useful to early identify the presence of sepsis in surgical patients, since ddPCR takes less than 4 hours to provide results of mRNA quantification, with an average cost of 30 USD per determination.

As a drawback, in our study we only evaluated a limited number of genes which expression is altered in sepsis, but there are other candidate genes with potential diagnostic value for this disease.⁴ Although we found no additional benefit for the diagnosis of sepsis when the *LCN2/HLA-DRA*, *MMP8/HLA-DRA* ratios were combined between them or with PCT, further studies should elucidate whether combinations of the genes tested here with other different ones could translate into improved diagnostic accuracy.

As evidenced by the multivariate analysis, *HLA-DRA* was the only gene independently associated with the risk of hospital mortality, demonstrating a central role of antigen presentation in sepsis. Poor expression of *HLA-DRA* at the first moment of sepsis could preclude mounting effective and balanced adaptive responses against the infecting microbe, which could be an initial key event to prevent mortality in this disease. Our results confirm the role of *HLA-DRA* as predictor of mortality in sepsis.^{29,30} Cajander et al¹¹ have proposed qRT-PCR measurement of *HLA-DRA* expression to identify patients

TABLE 4. Multivariate Analysis for Evaluating the Risk of Sepsis Based on the Gene Expression Ratios or Procalcitonin Levels

	OR	CI 95%	P	Se	Sp	PPV	NPV
<i>LCN2/HLA-DRA</i> >0.199	8.57	2.25	32.62	0.002	85.1	81.1	89.6
<i>MMP8/HLA-DRA</i> >0.144	8.03	2.10	30.76	0.002	83.2	84.9	91.3
Procalcitonin >1.11 (ng/mL)	4.20	1.15	15.43	0.030	73.3	75.5	85.1

For this analysis patients were split into 2 groups depending on the optimal operating point for the ratios and PCT calculated in Table 3. Adjusting variables were SOFA score, age, urgent surgery, chronic renal failure, cancer, diabetes mellitus, neutrophil concentration in blood, cells/mm³, C-reactive protein (mg/dL).

NPV indicates negative predictive value; OR odds ratio; PPV, positive predictive value; Se, sensitivity; Sp, specificity.



FIGURE 3. Box plots showing gene expression levels of *LCN2* and *HLA-DRA*, the ratio between these genes, and the concentration of Procalcitonin across groups. The median value for the SOFA score (8 points) was employed to distribute sepsis patients into 2 groups. Lines represent significant differences between groups. The triangle represents significant differences against the healthy control.

with severe sepsis that may benefit from immunostimulation. In the multivariate analysis for hospital mortality, *MMP8* and *PRTN3* yielded *P* values less than 0.1 (data not shown). Studies with larger cohorts of patients should confirm or exclude the potential impact of neutrophil proteases on the outcome of sepsis patients.

In conclusion, results from our study evidence that quantifying the transcriptomic ratios *MMP8/HLA-DRA*, *LCN2/HLA-DRA* by ddPCR is a promising approach to improve sepsis diagnosis in surgical patients.

REFERENCES

- Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, et al. Defining immunological dysfunction in sepsis: a requisite tool for precision medicine. *J Infect.* 2016;72:525–536.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315:801–810.
- Bermejo-Martin JF, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, et al. Characterizing systemic immune dysfunction syndrome to fill in the gaps of SEPSIS-2 and SEPSIS-3 definitions. *Chest.* 2017;151:518–519.
- Almansa R, Heredia-Rodríguez M, Gomez-Sanchez E, et al. Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J Infect.* 2015;70: 445–456.
- Johnson SB, Lissauer M, Bochicchio GV, et al. Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann Surg.* 2007;245: 611–621.
- Sweeney TE, Shidham A, Wong HR, et al. A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Sci Transl Med.* 2015;7:287ra71.
- Kangelaris KN, Prakash A, Liu KD, et al. Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308:L1102–L1113.
- Shanley TP, Cvijanovich N, Lin R, et al. Genome-level longitudinal expression of signaling pathways and gene networks in pediatric septic shock. *Mol Med Camb Mass.* 2007;13:495–508.
- Parnell GP, Tang BM, Nalos M, et al. Identifying key regulatory genes in the whole blood of septic patients to monitor underlying immune dysfunctions. *Shock Augusta Ga.* 2013;40:166–174.

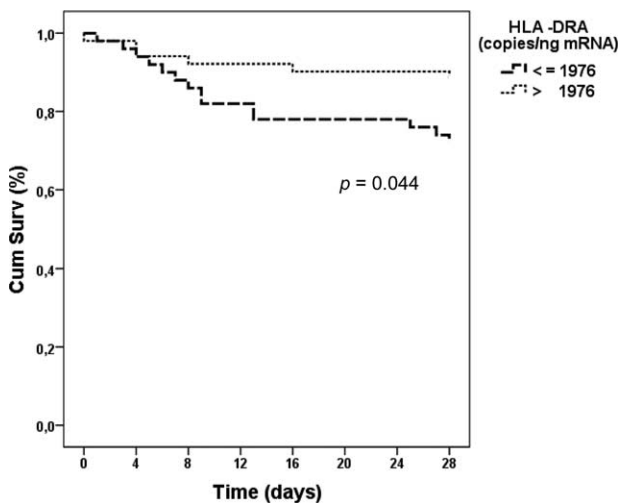


FIGURE 4. Kaplan-Meier analysis for survival at 28 days following sepsis diagnosis depending on *HLA-DRA* gene expression levels.

10. Cajander S, Bäckman A, Tina E, et al. Preliminary results in quantitation of HLA-DRA by real-time PCR: a promising approach to identify immunosuppression in sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2013;17:R223.
11. Cajander S, Tina E, Bäckman A, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction measurement of HLA-DRA gene expression in whole blood is highly reproducible and shows changes that reflect dynamic shifts in monocyte surface HLA-DR expression during the course of sepsis. *PLoS One*. 2016;11:e0154690.
12. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013;10:1003–1005.
13. Tamayo E, Almansa R, Carrasco E, 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;18:433.
14. 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. *Chest*. 1992;101:1644–1655.
15. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143:29–36.
16. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:426–435.
17. Giannakopoulos K, Hoffmann U, Ansari U, et al. The use of biomarkers in sepsis: a systematic review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2017 [Epub ahead of print].
18. Zhang H-B, Chen J, Lan Q-F, et al. Diagnostic values of red cell distribution width, platelet distribution width and neutrophil-lymphocyte count ratio for sepsis. *Exp Ther Med*. 2016;12:2215–2219.
19. Almansa R, Tamayo E, Heredia M, et al. Transcriptomic evidence of impaired immunoglobulin G production in fatal septic shock. *J Crit Care*. 2014;29:307–309.
20. Shen Z-G, Guo J-L, Li D-S. Screening of differentially expressed genes related to severe sepsis induced by multiple trauma with DNA microarray. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18:734–739.
21. Yazdan-Ashoori P, Liaw P, Tolft L, et al. Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2011;26:556–565.
22. Wong HR, Weiss SL, Giuliano JS, et al. Testing the prognostic accuracy of the updated pediatric sepsis biomarker risk model. *PLoS One*. 2014;9:e86242.
23. Solan PD, Dunsmore KE, Denenberg AG, et al. A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. *Crit Care Med*. 2012;40:379–387.
24. Basu RK, Standage SW, Cvijanovich NZ, et al. Identification of candidate serum biomarkers for severe septic shock-associated kidney injury via microarray. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15:R273.
25. Alder MN, Opoka AM, Lahni P, et al. Olfactomedin-4 is a candidate marker for a pathogenic neutrophil subset in septic shock. *Crit Care Med*. 2017;45:e426–e432.
26. Wang M, Zhang Q, Zhao X, et al. Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the emergency department: an observational study. *Crit Care Lond Engl*. 2014;18:634.
27. Zhang A, Cai Y, Wang P-F, et al. Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2016;20:41.
28. Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2016;4:259–271.
29. Cazalis M-A, Friggeri A, Cavé L, et al. Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit Care Lond Engl*. 2013;17:R287.
30. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32:1175–1183.

Endothelial dysfunction is an early indicator of sepsis and neutrophil degranulation of septic shock in surgical patients

M. Martín-Fernández^{1,4}, L. M. Vaquero-Roncero², R. Almansa^{1,4,10}, E. Gómez-Sánchez⁵, S. Martín⁹, E. Tamayo⁵, M. C. Esteban-Velasco³, P. Ruiz-Granado⁵, M. Aragón⁵, D. Calvo⁶, J. Rico-Feijoo⁹, A. Ortega^{1,4}, E. Gómez-Pesquera⁵, M. Lorenzo-López⁵, J. López³, C. Doncel^{1,4}, C. González-Sánchez³, D. Álvarez², E. Zarcá⁶, A. Ríos-Llorente², A. Díaz-Alvarez², E. Sánchez-Barrado², D. Andaluz-Ojeda⁷, J. M. Calvo-Vecino², L. Muñoz-Bellvís^{3,11}, J. I. Gomez-Herreras⁵, C. Abad-Molina⁸, J. F. Bermejo-Martin^{1,4,10}, C. Aldecoa⁹ and M. Heredia-Rodríguez²

¹Group for Biomedical Research in Sepsis (BioSepsis), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), ²Anaesthesiology and Reanimation Service, Hospital Universitario de Salamanca, and ³Department of General and Gastrointestinal Surgery, Hospital Universitario de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) and Universidad de Salamanca, Salamanca, ⁴Research Unit, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, ⁵Group for Biomedical Research in Critical Care (BioCritico), Anaesthesiology and Reanimation Service, ⁶Clinical Analysis Service, ⁷Intensive Care Medicine Service and ⁸Microbiology and Immunology Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, and ⁹Anaesthesiology and Reanimation Service, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, and ¹⁰Biomedical Research Networking Centre on Respiratory Diseases (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, and ¹¹Biomedical Research Networking Centre on Cancer (CIBERONC), Madrid, Spain

Correspondence to: Dr J. F. Bermejo-Martin, Group for Biomedical Research in Sepsis (BioSepsis), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Paseo de San Vicente, 58-182, 37007 Salamanca, Spain (e-mail: jfbermejo@saludcastillayleon.es)

Background: Stratification of the severity of infection is currently based on the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, which is difficult to calculate outside the ICU. Biomarkers could help to stratify the severity of infection in surgical patients.

Methods: Levels of ten biomarkers indicating endothelial dysfunction, 22 indicating emergency granulopoiesis, and six denoting neutrophil degranulation were compared in three groups of patients in the first 12 h after diagnosis at three Spanish hospitals.

Results: There were 100 patients with infection, 95 with sepsis and 57 with septic shock. Seven biomarkers indicating endothelial dysfunction (mid-regional proadrenomedullin (MR-ProADM), syndecan 1, thrombomodulin, angiopoietin 2, endothelial cell-specific molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1 and E-selectin) had stronger associations with sepsis than infection alone. MR-ProADM had the highest odds ratio (OR) in multivariable analysis (OR 11.53, 95 per cent c.i. 4.15 to 32.08; $P = 0.006$) and the best area under the curve (AUC) for detecting sepsis (0.86, 95 per cent c.i. 0.80 to 0.91; $P < 0.001$). In a comparison of sepsis with septic shock, two biomarkers of neutrophil degranulation, proteinase 3 (OR 8.09, 1.34 to 48.91; $P = 0.028$) and lipocalin 2 (OR 6.62, 2.47 to 17.77; $P = 0.002$), had the strongest association with septic shock, but lipocalin 2 exhibited the highest AUC (0.81, 0.73 to 0.90; $P < 0.001$).

Conclusion: MR-ProADM and lipocalin 2 could be alternatives to the SOFA score in the detection of sepsis and septic shock respectively in surgical patients with infection.

Funding information

Instituto de Salud Carlos III, PI15/01959, PI15/01451, PI16/01156
 Consejería de Educación de Castilla y León/Fondo social Europeo
 European Union (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Una manera de hacer Europa)

Paper accepted 14 January 2020

Published online 19 February 2020 in Wiley Online Library (www.bjsopen.com). DOI: 10.1002/bjs.5.50265

Introduction

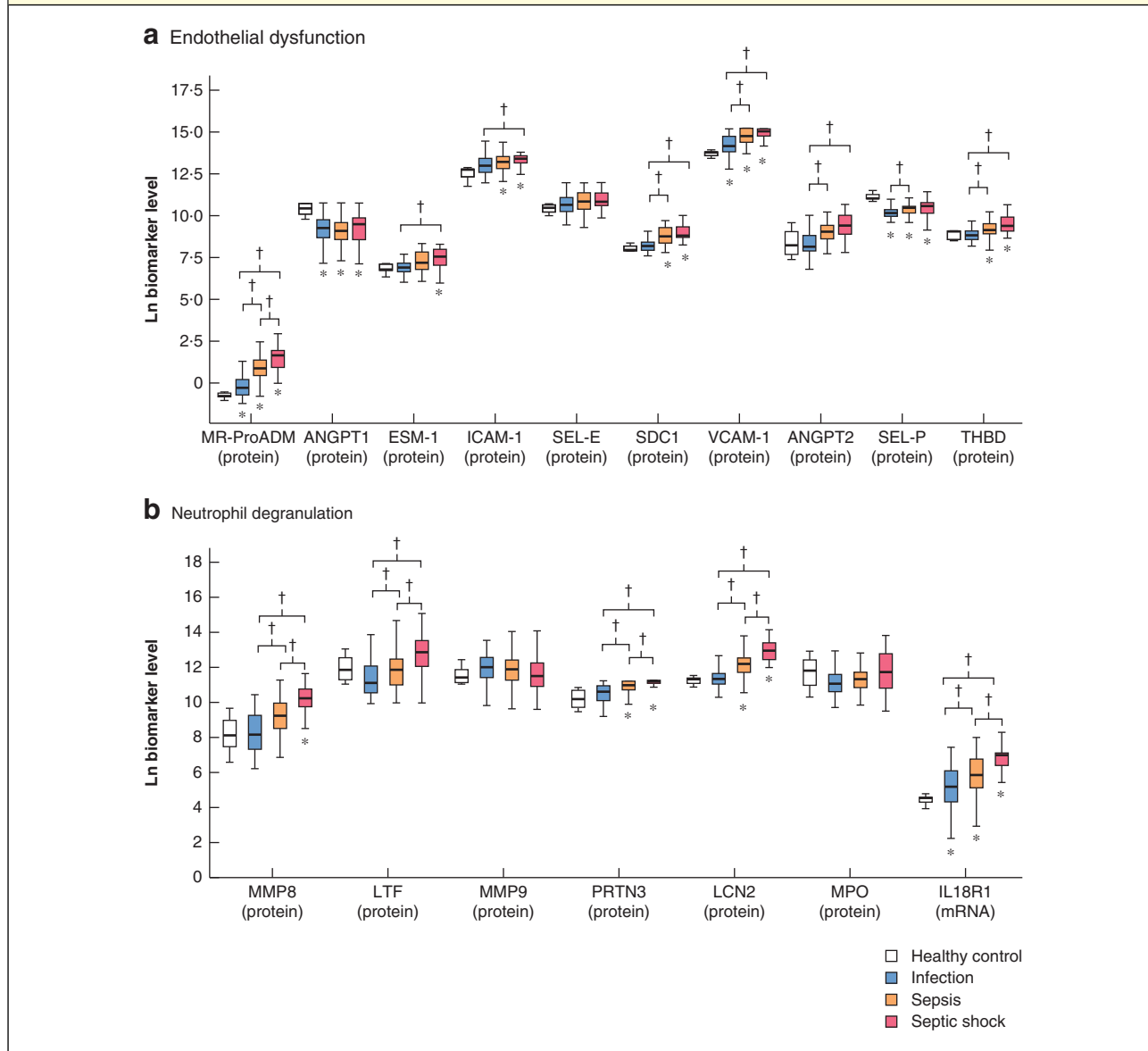
Sepsis and septic shock are major causes of morbidity and mortality in surgical patients¹. In a patient with infection, prompt detection of sepsis is key to the initiation of early

treatment with appropriate antimicrobials, elimination of the infectious source, administration of fluids and appropriate transfer to the ICU. In patients with sepsis, prompt detection of septic shock could imply a need to modify antibiotic treatment, seek alternative sources of

	Infection (n = 100)	Sepsis (n = 95)	Septic shock (n = 57)	P† (infection versus sepsis)	P† (infection versus septic shock)	P† (sepsis versus septic shock)
Age (years)*	57.0 (39.25–70.50)	73.0 (59–80)	74.0 (68–78.5)	< 0.001‡	< 0.001‡	1.000
Male sex	60 (60.0)	62 (65)	31 (54)	0.448	0.493	0.183
Co-morbidity						
Chronic cardiovascular disease	13 (13.0)	28 (29)	21 (37)	0.005	< 0.001	0.347
Chronic respiratory disease	2 (2)	13 (14)	6 (11)	0.003	0.022	0.569
High BP	30 (30.0)	47 (49)	34 (60)	0.009	< 0.001	0.223
Chronic renal failure	2 (2.0)	9 (9)	7 (12)	0.024	0.004	0.388
Chronic hepatic failure	4 (4.0)	2 (2)	1 (2)	0.422	0.423	0.880
Diabetes mellitus	14 (14.0)	20 (21)	17 (30)	0.194	0.017	0.222
Cancer	13 (13.0)	18 (19)	13 (23)	0.256	0.112	0.568
Immunosuppression	5 (5.0)	13 (14)	6 (11)	0.037	0.205	0.553
Surgery type						
Urgent	70 (70.0)	74 (78)	41 (72)	0.210	0.798	0.407
Abdominal	65 (65.0)	54 (57)	24 (42)	0.243	0.005	0.078
Cardiothoracic	0 (0)	14 (15)	14 (25)	< 0.001	< 0.001	0.130
Vascular	1 (1.0)	3 (3)	1 (2)	0.288	0.685	0.601
Urological/renal	0 (0)	0 (0)	1 (2)	§	0.184	0.195
Other	13 (13.0)	4 (4)	4 (7)	0.030	0.246	0.453
Time course and outcome						
Length of hospital stay (days)*	5 (2–12)	15 (8–29.5)	31 (18.50–48.75)	< 0.001‡	< 0.001‡	< 0.001‡
Length of ICU stay (days)*	0.5 (0–2)	3 (1–6.75)	7 (3–13)	< 0.001‡	< 0.001‡	0.001‡
Hospital mortality	0 (0)	7 (7)	22 (39)	0.006	< 0.001	< 0.001
Source of infection						
Respiratory tract	4 (4.0)	15 (16)	14 (25)	0.006	< 0.001	0.183
Abdomen	67 (67.0)	48 (51)	19 (33)	0.019	< 0.001	0.039
Urinary tract	0 (0)	4 (4)	6 (11)	0.038	0.001	0.128
Surgical site	12 (12.0)	16 (17)	13 (23)	0.335	0.075	0.365
Bacteraemia	0 (0)	6.30 (6)	12 (21)	0.011	< 0.001	0.006
Other	13 (13.0)	16 (17)	4 (7)	0.451	0.246	0.083
Microbiology						
Positive culture	29 (29.0)	54 (57)	43 (75)	< 0.001	< 0.001	0.021
Gram-positive	13 (13.0)	29 (31)	21 (37)	0.003	< 0.001	0.422
Gram-negative	23 (23.0)	31 (33)	34 (60)	0.133	< 0.001	0.001
Fungal	4 (4.0)	8 (8)	8 (14)	0.199	0.023	0.275
Measurements at diagnosis*						
SOFA score	0 (0–1)	6 (3–8)	9 (7–11)	< 0.001‡	< 0.001‡	< 0.001‡
Total bilirubin (mg/dl)	0.70 (0.4–1.03)	0.70 (0.43–1.78)	1.00 (0.56–1.89)	1.000‡	0.013‡	0.072‡
Glucose level (mg/dl)	118 (105–140)	158 (117.5–184)	163 (128–232.50)	< 0.001‡	< 0.001‡	1.000‡
Sodium level (mmol/l)	139.00 (136–141.25)	138.00 (135–141.25)	129.00 (134–142)	0.008‡	< 0.001‡	0.001‡
Potassium level (mmol/l)	3.90 (3–4.10)	4.00 (3.50–4.20)	3.85 (3–4.12)	§	§	§
Platelet count (cells/mm ³)	221 500 (186 250–299 250)	184 000 (105 250–276 000)	123 000 (88 500–258 000)	0.023‡	0.001‡	0.794‡
INR	1.15 (1.03–1.26)	1.27 (1.16–1.35)	1.44 (1.27–1.81)	0.002‡	< 0.001‡	< 0.001‡
Albumin (mg/dl)	3480 (2737.5–4135)	2445 (2132.50–3130)	2340 (1837.5–2752.5)	< 0.001‡	< 0.001‡	1.000‡
Lactate (mmol/l)	1.50 (1.06–1.85)	1.50 (1.23–2)	3.55 (2.46–5.19)	1.000‡	< 0.001‡	< 0.001‡
White blood cell count (cells/mm ³)	13 070 (9187.5–16 347.5)	14 050 (9410–18 290)	14 550 (7525–19 880)	§	§	§
Lymphocytes (cells/mm ³)	1383.50 (911.50–1806.36)	940 (600.10–1453.86)	592 (410.08–1103.39)	0.021‡	< 0.001‡	0.004‡
Monocytes (cells/mm ³)	795.52 (466.07–1099)	632 (345–962)	411.25 (245–791.56)	0.049‡	0.002‡	0.196‡
Neutrophils (cells/mm ³)	10 144 (6327.70–13 864.48)	12 100 (7857–15 195)	12 240 (5647.50–18 177.50)	0.091‡	0.199‡	1.000‡
Eosinophils (cells/mm ³)	43 (12.50–117.41)	19 (0–57.52)	10.92 (0–47.53)	§	§	§
Basophils (cells/mm ³)	33.60 (18–59.73)	26.90 (11.76–54.80)	20 (10.54–49.92)	0.827‡	0.042‡	0.196‡

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; *values are median (i.q.r.). SOFA, Sequential Organ Failure Score; INR, international normalized ratio. † χ^2 test, except ‡Kruskal–Wallis test; §absence of P value for χ^2 or Kruskal–Wallis test, as appropriate.

Fig. 1 Levels of endothelial dysfunction and neutrophil degranulation biomarkers in healthy control, infection, sepsis and septic shock groups

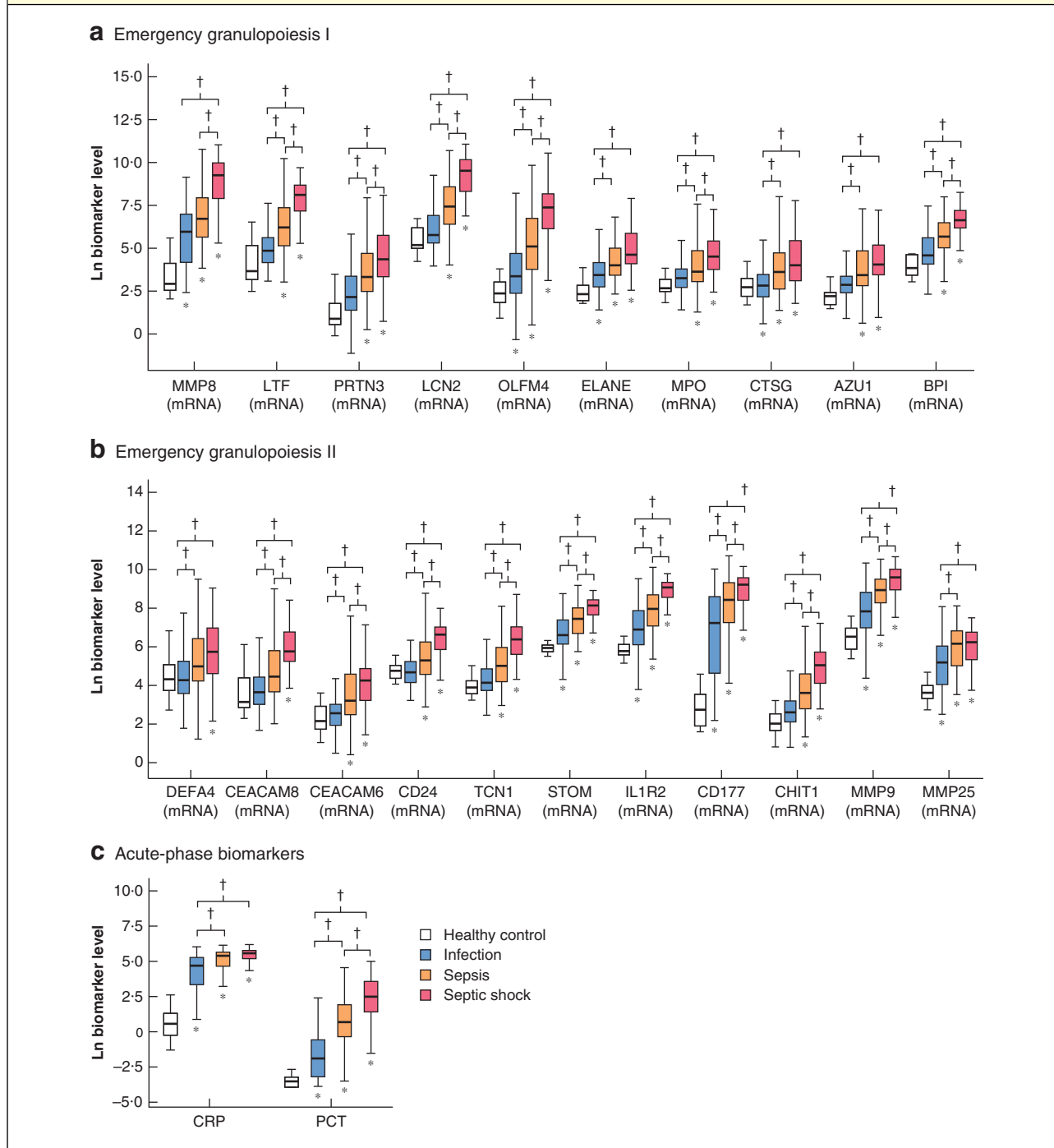


Biomarkers of **a** endothelial dysfunction and **b** neutrophil degranulation. Levels of mid-regional proadrenomedullin (MR-ProADM) are in nmol/l, those of interleukin-18 receptor type 1 (IL18R1) are copies of cDNA per ng mRNA, and those of the remaining biomarkers are in pg/ml. ANGPT, angiopoietin; ESM, endothelial cell-specific molecule; ICAM, intercellular adhesion molecule; SEL-E, E-selectin; SDC, syndecan; VCAM, vascular cell adhesion molecule; SEL-P, P-selectin; THBD, thrombomodulin; MMP, matrix metalloproteinase; LTF, lactoferrin; PRTN, proteinase; LCN, lipocalin; MPO, myeloperoxidase. * $P \leq 0.050$ versus healthy control; † $P \leq 0.050$ (Kruskal–Wallis test).

potentially infectious organisms not already identified, and adjust ICU support. Since publication of the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (SEPSIS-3) in 2016², severity stratification in patients with infection has been based on the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score³. The problem with this

score is that it is difficult to calculate in non-ICU settings, such as surgical departments or the emergency room. The alternative proposed by the SEPSIS-3 consensus for these settings, the quickSOFA (composed of three simple items: respiratory frequency, BP and the Glasgow Coma Scale score), is very specific but less useful for detecting sepsis⁴.

Fig. 2 Levels of emergency granulopoiesis and acute-phase response biomarkers in healthy control, infection, sepsis and septic shock groups



Biomarkers of **a,b** emergency granulopoiesis and **c** acute-phase response. Levels of C-reactive protein (CRP) are in mg/l, those of procalcitonin (PCT) are in ng/ml, and those of the remaining biomarkers are copies of cDNA per ng mRNA. MMP, matrix metalloproteinase; LTF, lactoferrin; PRTN, proteinase; LCN, lipocalin; OLFM, olfactomedin; ELANE, elastase, neutrophil expressed; MPO, myeloperoxidase; CTSG, cathepsin G; AZU, azurocidin; BPI, bactericidal/permeability-increasing protein; DEFA, defensin α ; CEACAM, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule; CD, cluster of differentiation; TCN, transcobalamin; STOM, stomatin; IL1R2, interleukin-1 receptor type 2; CHIT, chitinase. * $P \leq 0.050$ versus healthy control; † $P \leq 0.050$ (Kruskal–Wallis test).

Table 2 Multivariable analysis for risk of sepsis versus infection

Biomarker*	Indicator for	Odds ratio	P	Benjamini-Hochberg P
Mid-regional proadrenomedullin (nmol/l)	ED	11.53 (4.15, 32.08)	<0.001	0.006
Syndecan 1 (pg/ml)	ED	9.48 (2.86, 31.38)	<0.001	0.006
Thrombomodulin (pg/ml)	ED	4.14 (1.28, 13.39)	0.018	0.040
Angiopoietin 2 (pg/ml)	ED	3.70 (1.80, 7.59)	<0.001	0.006
Endothelial cell-specific molecule 1 (pg/ml)	ED	3.58 (1.45, 8.83)	0.006	0.022
Vascular cell adhesion molecule 1 (pg/ml)	ED	2.72 (1.10, 6.76)	0.031	0.047
E-selectin (pg/ml)	ED	2.32 (1.12, 4.81)	0.023	0.041
Lipocalin 2 (pg/ml)	ND	2.27 (1.16, 4.44)	0.016	0.040
MMP8 (pg/ml)	ND	1.90 (1.23, 2.96)	0.004	0.016
Procalcitonin (ng/ml)	AR	1.83 (1.41, 2.37)	<0.001	0.006
Chitinase 1 (<i>CHIT1</i>) (copies/ng)	EG	1.81 (1.24, 2.64)	0.002	0.009
Stomatin (<i>STOM</i>) (copies/ng)	EG	1.68 (1.09, 2.60)	0.020	0.040
MMP9 (<i>MMP9</i>) (copies/ng)	EG	1.67 (1.14, 2.44)	0.008	0.026
Interleukin-1 receptor type 2 (<i>IL1R2</i>) (copies/ng)	EG	1.64 (1.12, 2.42)	0.011	0.006
MMP8 (<i>MMP8</i>) (copies/ng)	EG	1.64 (1.23, 2.19)	0.001	0.033
Lipocalin 2 (<i>LCN2</i>) (copies/ng)	EG	1.62 (1.23, 2.15)	0.001	0.006
Transcobalamin 1 (<i>TCN1</i>) (copies/ng)	EG	1.56 (1.07, 2.27)	0.021	0.040
Lactoferrin (<i>LTF</i>) (copies/ng)	EG	1.55 (1.16, 2.06)	0.002	0.009
Bactericidal/permeability-increasing protein (<i>BPI</i>) (copies/ng)	EG	1.52 (1.07, 2.17)	0.020	0.040
CD24 (<i>CD24</i>) (copies/ng)	EG	1.51 (1.05, 2.17)	0.026	0.043
C-reactive protein (mg/l)	AR	1.51 (1.05, 2.18)	0.028	0.044
MMP25 (<i>MMP25</i>) (copies/ng)	EG	1.46 (1.05, 2.05)	0.026	0.043
CD177 (<i>CD177</i>) (copies/ng)	EG	1.31 (1.05, 1.65)	0.020	0.040
Olfactomedin 4 (<i>OLFM4</i>) (copies/ng)	EG	1.28 (1.05, 1.55)	0.012	0.033

Values in parentheses are 95 per cent confidence intervals. *Biomarker values correspond to napierian logarithms. Variables adjusted for gene expression biomarkers were age, cardiovascular disease, immunosuppression, high BP, chronic respiratory disease, chronic renal disease, abdominal surgery, other surgery, respiratory source of infection and abdominal source of infection; variables adjusted for protein biomarkers were age, immunosuppression, high BP, chronic respiratory disease, chronic renal disease, urgent surgery, abdominal surgery, other surgery, respiratory source of infection and abdominal source of infection (Table S4, supporting information). ED, endothelial dysfunction; ND, neutrophil degranulation; MMP, matrix metalloproteinase; AR, acute-phase response; EG, emergency granulopoiesis; CD, cluster of differentiation.

Biomarkers could contribute to stratification of the severity of infection. Sepsis is characterized by acute endothelial dysfunction, which increases vascular permeability, promotes activation of the coagulation cascade and tissue oedema, and compromises the perfusion of vital organs⁵. Biomarkers of endothelial responses can be used to categorize patients into homogeneous subgroups with different severity⁶. In turn, sepsis activates emergency granulopoiesis, inducing release of immature neutrophil precursor cells in the peripheral blood, an event related directly to severity^{7–10}. Emergency granulopoiesis can be detected by profiling the mRNA in blood of the genes that are expressed sequentially in the neutrophil precursors^{11,12}. Other molecules denoting severity during an infection are proteins released to the plasma during neutrophil degranulation^{13,14}. These include matrix metalloproteinase (MMP) 8, neutrophil gelatinase-associated lipocalin and lactotransferrin, which have been shown to

be closely related to the development of sepsis¹⁵, and levels of plasma MMPs 3, 7, 8 and 9 are increased in severe sepsis on admission to the ICU¹⁶.

In this study, 38 biomarkers of endothelial dysfunction, emergency granulopoiesis or neutrophil degranulation were evaluated to stratify severity in surgical patients with infection. The hypothesis was that these biomarkers might differentiate between three groups of patients: those with infection, those with sepsis, and those with septic shock.

Methods

Surgical patients with infection, sepsis or septic shock were recruited prospectively from the surgery departments and surgical ICUs of the three participating hospitals (Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid and Hospital Clínico

Table 3 Multivariable analysis for risk of septic shock versus sepsis

Biomarker*	Indicator for	Odds ratio	P	Benjamini-Hochberg P
Proteinase 3 (pg/ml)	ND	8.09 (1.34, 48.91)	0.023	0.028
Lipocalin 2 (pg/ml)	ND	6.62 (2.47, 17.77)	< 0.001	0.002
Syndecan 1 (pg/ml)	ED	6.10 (1.77, 21.06)	0.004	0.006
Mid-regional proadrenomedullin (nmol/l)	ED	4.58 (1.99, 10.58)	< 0.001	0.002
Thrombomodulin (pg/ml)	ED	4.52 (1.42, 14.34)	0.011	0.014
Interleukin-18 receptor type 1 (<i>IL18R1</i>) (copies/ng)	ND	4.22 (2.26, 7.85)	< 0.001	0.002
Stomatin (<i>STOM</i>) (copies/ng)	EG	3.74 (1.87, 7.45)	< 0.001	0.002
Interleukin-1 receptor type 2 (<i>IL1R2</i>) (copies/ng)	EG	3.72 (2.10, 6.58)	< 0.001	0.002
Angiopietin 2 (pg/ml)	ED	3.02 (1.29, 7.10)	0.011	0.014
MMP8 (pg/ml)	ND	2.97 (1.55, 5.67)	0.001	0.002
MMP9 (<i>MMP9</i>) (copies/ng)	EG	2.67 (1.55, 4.59)	< 0.001	0.002
Lipocalin 2 (<i>LCN2</i>) (copies/ng)	EG	2.45 (1.71, 3.50)	< 0.001	0.002
MMP8 (<i>MMP8</i>) (copies/ng)	EG	2.43 (1.74, 3.38)	< 0.001	0.002
Transcobalamin 1 (<i>TCN1</i>) (copies/ng)	EG	2.36 (1.62, 3.44)	< 0.001	0.002
Lactoferrin (pg/ml)	ND	2.30 (1.38, 3.84)	0.001	0.002
Myeloperoxidase (pg/ml)	ND	2.26 (1.20, 4.25)	0.011	0.014
Lactoferrin (<i>LTF</i>) (copies/ng)	EG	2.24 (1.59, 3.15)	< 0.001	0.002
Bactericidal/permeability-increasing protein (<i>BPI</i>) (copies/ng)	EG	2.23 (1.49, 3.36)	< 0.001	0.002
CD24 (<i>CD24</i>) (copies/ng)	EG	2.15 (1.47, 3.16)	< 0.001	0.002
Chitinase 1 (<i>CHIT1</i>) (copies/ng)	EG	2.01 (1.42, 2.83)	< 0.001	0.002
CD177 (<i>CD177</i>) (copies/ng)	EG	1.97 (1.30, 2.99)	0.001	0.002
Olfactomedin 4 (<i>OLFM4</i>) (copies/ng)	EG	1.85 (1.42, 2.40)	< 0.001	0.002
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 (<i>CEACAM8</i>) (copies/ng)	EG	1.78 (1.31, 2.41)	< 0.001	0.002
Procalcitonin (ng/ml)	AR	1.73 (1.31, 2.29)	< 0.001	0.002
Myeloperoxidase (<i>MPO</i>) (copies/ng)	EG	1.36 (1.02, 1.81)	0.038	0.044

Values in parentheses are 95 per cent confidence intervals. *Biomarker values correspond to napierian logarithms. Variables adjusted for gene expression biomarkers were age, abdominal surgery, abdominal source of infection, bacteraemia, other sources of infection, presence of Gram-negative organisms and presence of polymicrobial infection; variables adjusted for protein biomarkers were surgical-site source of infection, bacteraemia, presence of Gram-negative organisms, and presence of polymicrobial infection (Table S4, supporting information). ND, neutrophil degranulation; ED, endothelial dysfunction; EG, emergency granulopoiesis; MMP, matrix metalloproteinase; CD, cluster of differentiation; AR, acute-phase response.

Universitario de Salamanca), between January 2017 and January 2019. Infection was defined according to the US Centers for Disease Control and Prevention National Surveillance Definitions for Specific Types of Infections¹⁷. Sepsis and septic shock were defined using the SEPSIS-3 consensus definitions^{2,18}. A specific standard survey was employed in the three participating hospitals to collect clinical data along with results of haematological, biochemical, radiological and microbiological investigations. Healthy controls with similar age and sex characteristics to the patients were recruited from the Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (CHEMCYL, Valladolid, Spain).

Ethical approval

The study was approved by the respective Committees for Ethics in Clinical Research of the three participating

hospitals. Methods were carried out in accordance with current Spanish law for Biomedical Research, fulfilling the standards indicated by the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from patients' relatives or their legal representative before enrolment.

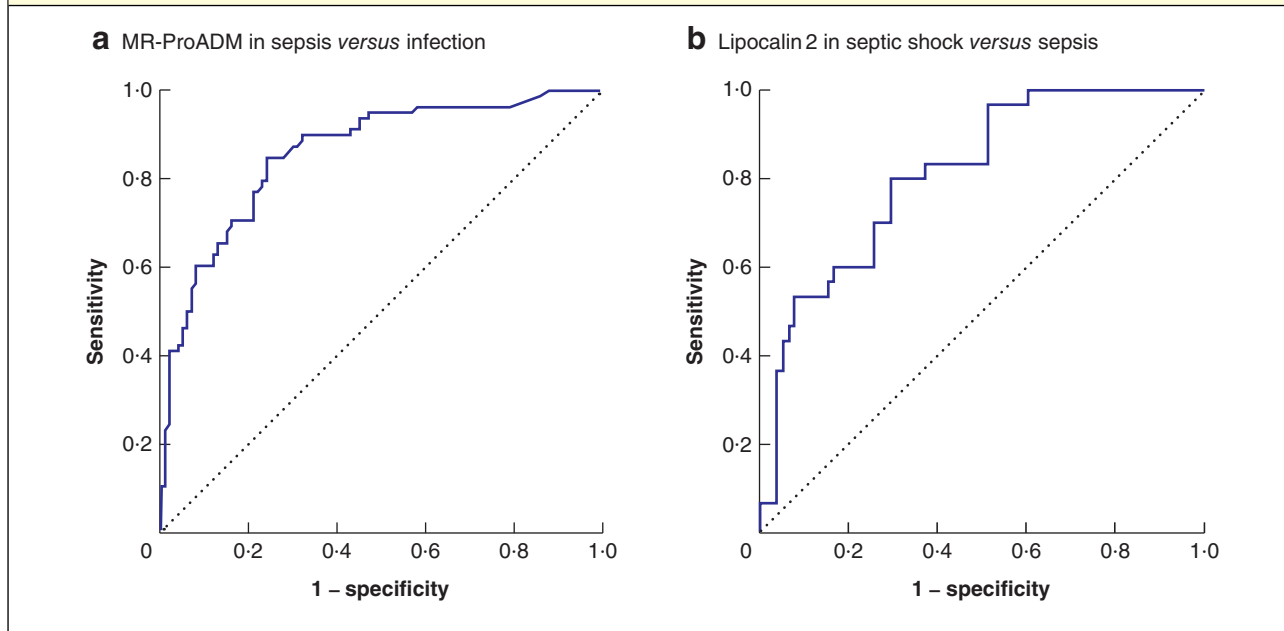
Microbiology

Standard cultures in biological samples, guided by the presumptive source of the infection, were performed to assess the presence of the causal pathogen. Potentially contaminant microorganisms were not considered.

Biomarker profiling

Thirty-eight biomarkers (10 denoting endothelial dysfunction, 22 indicating emergency granulopoiesis and 6 denoting neutrophil degranulation) were profiled in the three

Fig. 3 Area-under-the-curve analysis evaluating the accuracy of two biomarkers in differentiating sepsis from infection or from septic shock



a Accuracy of mid-regional proadrenomedullin (MR-ProADM) in differentiating sepsis from infection. Area under the curve (AUC): 0.86, 95 per cent c.i. 0.80 to 0.91 ($P < 0.001$); optimal operating point (OOP): 1.165 nmol/l; sensitivity: 84.6 per cent; specificity: 76.0 per cent. **b** Accuracy of lipocalin 2 in differentiating septic shock from sepsis. AUC: 0.81, 95 per cent c.i. 0.73 to 0.90 ($P < 0.001$); OOP: 246.346 pg/ml; sensitivity: 80.0 per cent; specificity: 70.5 per cent.

patient groups (infection, sepsis or septic shock) in the first 12 h after diagnosis (Tables S1 and S2, supporting information). The methods used to profile these biomarkers are detailed in Appendix S1 (supporting information). Blood from healthy individuals was collected as part of their blood donation.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS® version 20 (IBM, Armonk, New York, USA). Box plots were represented using Minitab® 19.2 (Minitab, Coventry, UK). For demographic and clinical characteristics of the patients, differences between groups were assessed using the χ^2 test for categorical variables. Differences between groups for continuous variables were assessed with the Kruskal–Wallis test, with *post hoc* tests adjusting for multiple comparisons. In the comparison of infection and sepsis, multivariable logistic regression analysis was employed to evaluate the association between biomarker levels and the presence of sepsis. In the comparison of sepsis and septic shock, the same type of analysis was employed to evaluate the association between biomarker levels and the presence of septic shock. Only biomarkers yielding $P \leq 0.050$ in

univariable analysis were tested in multivariable analyses. Potential confounding clinical factors that yielded $P \leq 0.100$ in univariable analysis were introduced as adjusting variables in multivariable analyses, followed by multiple testing correction by the false discovery rate using the Benjamini–Hochberg procedure. The optimal operating point in the area under the curve (AUC) analysis was identified as described previously¹⁹.

Results

There was a total of 100 patients with infection, 95 with sepsis and 57 with septic shock. Patients with infection were significantly younger than those in the other groups (Table 1), and the healthy controls. Proportions of men to women were similar in all patient groups and control subjects. Patients with sepsis and septic shock had more antecedent cardiovascular, respiratory or renal disease. The proportion of patients needing urgent surgery was similar in the three groups. Abdominal surgery was the most frequent type, and the abdomen was the predominant source of infection in all three patient groups.

Respiratory infection was more common in patients with sepsis or septic shock than in patients with infection alone.

The prevalence of bacteraemia was highest in patients with septic shock, where Gram-negative bacteria dominated (Table 1).

Patients with septic shock showed the highest degree of organ failure as assessed by the SOFA score. Duration of hospital stay was directly associated with severity. No patient in the infection group died in hospital, compared with seven of 95 (7 per cent) patients with sepsis and 22 of 57 (39 per cent) with septic shock (Table 1).

Coagulopathy (as assessed by the international normalized ratio) and decreased lymphocyte and monocyte counts were related to increasing severity. Biomarker levels showed a generalized trend to increase with disease severity (Figs 1 and 2; Table S3, supporting information).

Confounding factors from Table 1 that yielded $P \leq 0.100$ in univariable analysis, to be introduced as adjusting variables in multivariable analyses, are shown in Table S4 (supporting information).

Multivariable analysis of biomarker levels to evaluate the risk of sepsis versus infection identified seven biomarkers of endothelial dysfunction, two of neutrophil degranulation and 13 of emergency granulopoiesis as independent risk factors for sepsis (Table 2).

Multivariable analysis to evaluate the risk of septic shock versus sepsis revealed four biomarkers of endothelial dysfunction, six of neutrophil degranulation and 14 of emergency granulopoiesis as independent risk factors for septic shock (Table 3).

The AUC analysis to assess biomarker sensitivity and specificity indicated that mid-regional proadrenomedullin (MR-ProADM) was the best biomarker for differentiating sepsis from infection, whereas lipocalin 2 in plasma was the best biomarker for distinguishing septic shock from sepsis (Fig. 3).

Discussion

This study found that a panel of seven biomarkers related to endothelial dysfunction (MR-ProADM, syndecan (SDC) 1, thrombomodulin (THBD), angiopoietin (ANGPT) 2, endothelial cell-specific molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1 and E-selectin) were associated with the presence of sepsis in patients with infection. This suggests that induction of endothelial injury is an early event as organ dysfunction develops.

SDC1 and MR-proADM were the biomarkers showing the highest odds ratios for sepsis. SDC1 is a glycosaminoglycan shed from the endothelial glycocalyx during sepsis, and levels in plasma correlate with the SOFA score^{20,21}. In the present study, MR-proADM was the biomarker of endothelial dysfunction showing not only the strongest

association but also the best balance between sensitivity and specificity for sepsis, with an AUC of 0.86. Adrenomedullin is secreted from various organs and tissues, including vascular endothelial cells. It regulates vascular tone and endothelial permeability²². MR-proADM, the mid-regional fragment of proadrenomedullin, is more stable and directly reflects levels of the rapidly degraded active adrenomedullin peptide²³. There is growing evidence of the value of MR-ProADM as an early marker of severity in patients with infection²⁴ and as a predictor of organ failure in patients with community-acquired pneumonia²⁵.

In the comparison of sepsis and septic shock, the number of biomarkers of endothelial dysfunction independently associated with septic shock dropped to four (SDC1, MR-ProADM, THBD and ANGPT2). In contrast, six biomarkers denoting neutrophil degranulation were associated with septic shock: proteinase 3 (a serine protease), lipocalin 2 (a neutrophil gelatinase-associated protein), interleukin-18 receptor type 1 (an inducer of neutrophil degranulation)²⁶, matrix metalloproteinase (MMP) 8 (a neutrophil collagenase), lactoferrin (a major iron-binding protein) and myeloperoxidase (a heme protein). Only two of these biomarkers seemed relevant to differentiate sepsis from plain infection (lipocalin 2 and MMP8), suggesting that neutrophil degranulation may be important in the pathogenesis of septic shock. Proteins released from neutrophil granules could be mediating antibacterial effects^{8,27–30}, and may participate in tissue remodelling³¹, attenuation of inflammation³² and preventing the deleterious effects of neutrophil extracellular traps³³. However, increased intravascular levels of degranulated proteins could induce enhanced proteolysis³⁴, endothelial injury and organ failure^{35–39}.

Proteinase 3 and lipocalin 2 had strongest associations with the presence of septic shock. Neutrophil degranulation can lead to increased endothelial permeability via a mechanism that, in part, involves the actions of proteinase 3⁴⁰, and a multimarker model containing proteinase 3 was able to predict the risk of septic acute kidney injury in patients with septic shock⁴¹. In the present study, lipocalin 2 was the marker showing the best balance between sensitivity and specificity in detecting septic shock. Lipocalin 2 has been used for risk stratification, early diagnosis and prognostication of sepsis in the emergency department^{42,43}. This protein is associated with mortality and multiple organ dysfunction syndrome in severe sepsis and septic shock⁴⁴. Lipocalin 2 has been promoted as a relatively robust predictor of 28-day mortality in severe sepsis⁴⁵.

The present study has shown that emergency granulopoiesis is a preserved signature of both sepsis and septic

shock, although to a greater degree in septic shock. The observed parallel between emergency granulopoiesis signatures and severity is in agreement with a previous study⁹ demonstrating that, in sepsis, the increased presence of circulating immature granulocytes is linked to clinical deterioration.

Regarding acute-phase biomarkers, procalcitonin showed modest associations with the risk of sepsis and septic shock, while C-reactive protein showed a mild association, exclusively with the risk of sepsis. These results indicate that neither procalcitonin nor C-reactive protein is suitable for severity stratification in patients with infection.

Profiling protein levels in plasma of MR-ProADM and lipocalin 2 could contribute to stratification of the severity of infection, particularly in settings where calculation of the SOFA score is not feasible. Evaluation of protein biomarkers is technically easier than evaluating those of transcriptional nature. Emerging point-of-care devices could result in evaluation of these biomarkers in clinical practice as results can be obtained in less than 1 h⁴⁶.

This study has an important limitation in that biomarkers were compared only at diagnosis of infection, sepsis or septic shock. Further prospective follow-up studies with serial sampling should validate the potential role of MR-ProADM and lipocalin 2 in predicting clinical worsening of patients with infection or sepsis.

Acknowledgements

M.M.-F, L.M.V.-R. and R.A. are joint first authors of this article, and J.F.B.-M., C.A. and M.H.-R. contributed equally.

The authors thank the nursing teams of the participating clinical services for their continuous support to the research programme. They also thank M. J. Garcia Salgado, from the Biobanco Hospital Clínico Universitario de Salamanca, for assistance with sample storing, and CHEMCYL (Valadolid, Spain) for providing the samples from healthy controls.

The authors thank the Instituto de Salud Carlos III for financial support (grant numbers PI15/01959, PI15/01451 and PI16/01156) and Consejería de Educación de Castilla y León/Fondo social Europeo for supporting M.M.-F. This research was also supported by funds from the European Union (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Una manera de hacer Europa).

J.F.B.-M. is the inventor of a patent with Thermo-Fisher on MR-proADM for prognosis prediction in sepsis. J.F.B.-M. and R.A. are inventors of a patent with Thermo-Fisher on MMP8 for diagnosis and severity assessment of sepsis.

Disclosure: The authors declare no other conflict of interest.

References

- 1 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* 2001; **29**: 1303–1310.
- 2 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* 2016; **315**: 801–810.
- 3 Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; **22**: 707–710.
- 4 Serafim R, Gomes JA, Salluh J, Póvoa P. A Comparison of the quick-SOFA and systemic inflammatory response syndrome criteria for the diagnosis of sepsis and prediction of mortality: a systematic review and meta-analysis. *Chest* 2018; **153**: 646–655.
- 5 Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, López-Mestanza C, Duque P, Almansa R. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease). *J Clin Med* 2018; **7**: E400.
- 6 Clark DV, Banura P, Bandeen-Roche K, Liles WC, Kain KC, Scheld WM *et al.* Biomarkers of endothelial activation/dysfunction distinguish sub-groups of Ugandan patients with sepsis and differing mortality risks. *JCI Insight* 2019; **23**: 5.
- 7 Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev* 2016; **273**: 11–28.
- 8 Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 302–314.
- 9 Daix T, Guerin E, Tavernier E, Mercier E, Gissot V, Hérald O *et al.*; Septiflux Trial Group. Multicentric standardized flow cytometry routine assessment of patients with sepsis to predict clinical worsening. *Chest* 2018; **154**: 617–627.
- 10 Mare TA, Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chambers DJ *et al.* The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care* 2015; **19**: 57.
- 11 Cowland JB, Borregaard N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 989–995.
- 12 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* 2015; **70**: 445–456.

- 13 Sônego F, Castanheira FV, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CA, Nascimento DC *et al.* Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious. *Front Immunol* 2016; **7**: 155.
- 14 Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost* 2018; **16**: 231–241.
- 15 Tong Y, Ku X, Wu C, Liu J, Yang C, Tang W *et al.* Data-independent acquisition-based quantitative proteomic analysis reveals differences in host immune response of peripheral blood mononuclear cells to sepsis. *Scand J Immunol* 2019; **89**: e12748.
- 16 Yazdan-Ashoori P, Liaw P, Toldt L, Webb B, Kilmer G, Carter DE *et al.* Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J Crit Care* 2011; **26**: 556–565.
- 17 Centers for Disease Control and Prevention. *CDC/NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infections*; updated 2014. https://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/17pscNosInfDef_current.pdf [accessed 10 January 2017].
- 18 Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS *et al.*; Sepsis Definitions Task Force. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**: 775–787.
- 19 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* 2019; **269**: 545–553.
- 20 Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 2008; **30**: 623–627.
- 21 Sallisalimi M, Tenhunen J, Yang R, Oksala N, Pettilä V. Vascular adhesion protein-1 and syndecan-1 in septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; **56**: 316–322.
- 22 Mebazaa A, Geven C, Hollinger A, Wittebole X, Chousterman BG, Blet A *et al.*; AdrenOSS-1 study investigators. Circulating adrenomedullin estimates survival and reversibility of organ failure in sepsis: the prospective observational multinational Adrenomedullin and Outcome in Sepsis and Septic Shock-1 (AdrenOSS-1) study. *Crit Care* 2018; **22**: 354.
- 23 Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A. Identification of an adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides* 2004; **25**: 1369–1372.
- 24 Saeed K, Wilson DC, Bloos F, Schuetz P, van der Does Y, Melander O *et al.* The early identification of disease progression in patients with suspected infection presenting to the emergency department: a multi-centre derivation and validation study. *Crit Care* 2019; **23**: 40.
- 25 Menéndez R, Méndez R, Almansa R, Ortega A, Alonso R, Suescun M *et al.* Simultaneous depression of immunological synapse and endothelial injury is associated with organ dysfunction in community-acquired pneumonia. *J Clin Med* 2019; **8**: E1404.
- 26 Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C *et al.* A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol* 2001; **167**: 2879–2886.
- 27 Standish AJ, Weiser JN. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol* 2009; **183**: 2602–2609.
- 28 Cramer EP, Dahl SL, Rozell B, Knudsen KJ, Thomsen K, Moser C *et al.* Lipocalin-2 from both myeloid cells and the epithelium combats *Klebsiella pneumoniae* lung infection in mice. *Blood* 2017; **129**: 2813–2817.
- 29 Atkinson SJ, Varisco BM, Sandquist M, Daly MN, Klingbeil L, Kuethe JW *et al.* Matrix metalloproteinase-8 augments bacterial clearance in a juvenile sepsis model. *Mol Med* 2016; **22**: 455–463.
- 30 Miethke M, Skerra A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1580–1589.
- 31 Blázquez-Prieto J, López-Alonso I, Huidobro C, Albaiceta GM. The emerging role of neutrophils in repair after acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018; **59**: 289–294.
- 32 González-López A, Aguirre A, López-Alonso I, Amado L, Astudillo A, Fernández-García MS *et al.* MMP-8 deficiency increases TLR/RAGE ligands S100A8 and S100A9 and exacerbates lung inflammation during endotoxemia. *PLoS One* 2012; **7**: e39940.
- 33 Okubo K, Kamiya M, Urano Y, Nishi H, Herter JM, Mayadas T *et al.* Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *EBioMedicine* 2016; **10**: 204–215.
- 34 Bauzá-Martinez J, Aletti F, Pinto BB, Ribas V, Odena MA, Díaz R *et al.* Proteolysis in septic shock patients: plasma peptidomic patterns are associated with mortality. *Br J Anaesth* 2018; **121**: 1065–1074.
- 35 Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AHJ, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol* 2015; **80**: 389–402.
- 36 Kuravi SJ, Bevins A, Satchell SC, Harper L, Williams JM, Rainger GE *et al.* Neutrophil serine proteases mediate inflammatory cell recruitment by glomerular endothelium and progression towards dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2012; **27**: 4331–4338.
- 37 Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapek F, Hebling S, Frosch M. *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1000874.
- 38 Macdonald SPJ, Bosio E, Neil C, Arendts G, Burrows S, Smart L *et al.* Resistin and NGAL are associated with inflammatory response, endothelial activation and clinical outcomes in sepsis. *Inflamm Res* 2017; **66**: 611–619.

- 39 Solan PD, Dunsmore KE, Denenberg AG, Odoms K, Zingarelli B, Wong HR. A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. *Crit Care Med* 2012; **40**: 379–387.
- 40 Patterson EK, Cepinskas GK, Inoue K, Fraser DD. Sepsis-associated elastase and proteinase 3 induce endothelial permeability. *FASEB J* 2017; **31**: 978.11–978.11.
- 41 Wong HR, Cvijanovich NZ, Anas N, Allen GL, Thomas NJ, Bigham MT *et al.* A multibiomarker-based model for estimating the risk of septic acute kidney injury. *Crit Care Med* 2015; **43**: 1646–1653.
- 42 Wang M, Zhang Q, Zhao X, Dong G, Li C. Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the emergency department: an observational study. *Crit Care* 2014; **18**: 634.
- 43 Macdonald SPJ, Stone SF, Neil CL, van Eeden PE, Fatovich DM, Arendts G *et al.* Sustained elevation of resistin, NGAL and IL-8 are associated with severe sepsis/septic shock in the emergency department. *PLoS One* 2014; **9**: e110678.
- 44 Wang B, Chen G, Zhang J, Xue J, Cao Y, Wu Y. Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with mortality and multiple organ dysfunction syndrome in severe sepsis and septic shock. *Shock* 2015; **44**: 234–238.
- 45 Chang W, Zhu S, Pan C, Xie J-F, Liu S-Q, Qiu H-B *et al.* Predictive utilities of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in severe sepsis. *Clin Chim Acta* 2018; **481**: 200–206.
- 46 Reddy B, Hassan U, Seymour C, Angus DC, Isbell TS, White K *et al.* Point-of-care sensors for the management of sepsis. *Nat Biomed Eng* 2018; **2**: 640–648.

Supporting information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of the article.



Review

Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease)

Jesus F. Bermejo-Martin ^{1,2,*†}, Marta Martín-Fernandez ^{1,*†}, Cristina López-Mestanza ¹, Patricia Duque ³ and Raquel Almansa ^{1,2}

¹ Group for Biomedical Research in Sepsis (Bio-Sepsis), Hospital Clínico Universitario de Valladolid/IECSCYL, Av. Ramón y Cajal, 3, 47003 Valladolid, Spain; xtina.lopez.mestanza@hotmail.com (C.L.-M.); ralmansa@saludcastillayleon.es (R.A.)

² Centro de Investigación Biomedica En Red-Enfermedades Respiratorias (CibeRes, CB06/06/0028), Instituto de salud Carlos III (ISCIII), Av. de Monforte de Lemos, 5, 28029 Madrid, Spain

³ Anesthesiology and Reanimation Service, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Calle del Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain; patriduque@gmail.com

* Correspondence: jfbermejo@saludcastillayleon.es (J.F.B.-M.); mmartin.iecscyl@saludcastillayleon.es (M.M.-F.); Tel.: +34-983-420-000 (ext. 87422) (J.F.B.-M.); +34-983-420-000 (ext. 87987) (M.M.-F.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 21 September 2018; Accepted: 27 October 2018; Published: 30 October 2018



Abstract: Acute vascular endothelial dysfunction is a central event in the pathogenesis of sepsis, increasing vascular permeability, promoting activation of the coagulation cascade, tissue edema and compromising perfusion of vital organs. Aging and chronic diseases (hypertension, dyslipidaemia, diabetes mellitus, chronic kidney disease, cardiovascular disease, cerebrovascular disease, chronic pulmonary disease, liver disease, or cancer) are recognized risk factors for sepsis. In this article we review the features of endothelial dysfunction shared by sepsis, aging and the chronic conditions preceding this disease. Clinical studies and review articles on endothelial dysfunction in sepsis, aging and chronic diseases available in PubMed were considered. The main features of endothelial dysfunction shared by sepsis, aging and chronic diseases were: (1) increased oxidative stress and systemic inflammation, (2) glycocalyx degradation and shedding, (3) disassembly of intercellular junctions, endothelial cell death, blood-tissue barrier disruption, (4) enhanced leukocyte adhesion and extravasation, (5) induction of a pro-coagulant and anti-fibrinolytic state. In addition, chronic diseases impair the mechanisms of endothelial repair. In conclusion, sepsis, aging and chronic diseases induce similar features of endothelial dysfunction. The potential contribution of pre-existent endothelial dysfunction to sepsis pathogenesis deserves to be further investigated.

Keywords: aging; chronic disease; endothelium dysfunction; sepsis

1. Introduction

Sepsis is a major health problem worldwide. Data exclusively from high-income countries suggests that 50.9 million cases of sepsis occur globally each year, with potentially 5.3 million deaths annually [1]. The global burden of this disease is thought to be much higher, since data on sepsis incidence in low-income and middle-income countries remain scarce. Vascular endothelial dysfunction (ED) is a central event in the pathophysiology of sepsis [2]. ED precedes organ dysfunction and plays an important role in its pathogenesis by increasing vascular permeability, promoting activation of the coagulation cascade, tissue edema and compromising regional perfusion in vital organs [3].

Aging and chronic co-morbidities are recognized risk factors of sepsis. In a report from the American Centers for Disease Control with 246 sepsis patients, the median age was 69 years. Most of the patients in

this study (97%) had at least one co-morbidity. A total of 35% had diabetes mellitus, 32% had cardiovascular disease (including coronary artery disease, peripheral vascular disease, or congestive heart failure), 23% had chronic kidney disease, and 20% had chronic obstructive pulmonary disease [4]. Two large epidemiological studies on sepsis, which already use the new SEPSIS-3 criteria to define this disease [5], provide a similar picture of the clinical characteristics of sepsis patients. The studies of Rhee et al. with 173,690 patients [6] and Donnelly et al. with 1080 patients [7] reveal that the mean age of sepsis patients was 66.5 year and 69.7 year respectively. In these large reports, the most frequent co-morbidities present in sepsis patients were those participating of the metabolic syndrome (hypertension, dyslipidaemia, diabetes mellitus), chronic kidney disease, cardiovascular disease, cerebrovascular disease, chronic pulmonary or liver disease, and cancer (Table 1).

Table 1. Mean age, sex and major co-morbidities associated to sepsis.

	Rhee et al. (n = 173,690)		Donnelly et al. (n = 1080)
Age (mean in years)	66.5	Age (mean)	69.7
Sex (male)	57.6%	Sex (male)	59.2%
Diabetes	35.7%	Hypertension	74.5%
Chronic pulmonary disease	30.9%	Dyslipidaemia	67.3%
Renal disease	26.8%	Diabetes	41.8%
Congestive heart failure	25.4%	Chronic kidney disease	31.5%
Cancer	19.7%	Myocardial infarction	24.4%
Dementia or cerebrovascular disease	10.3%	Chronic lung disease	17.4%
Liver disease	10%	Stroke	12.6%

These data correspond to the studies of Rhee et al. [6] and Donnelly et al. [7]. Co-morbidities are showed by their observed prevalence in each study.

It is well-established that aging and the co-morbidities preceding sepsis induce chronic ED. As a result, it is probably that the acute endothelial injury induced by sepsis in aged/chronic disease patients is occurring on an endothelium which is, to a greater or lesser extent, already damaged. Surprisingly, until now there are no studies evaluating the potential influence of the pre-existent ED on the acute ED secondary to sepsis. This review article intends to explore this scenario by identifying common features of ED between sepsis and their preceding risk factors (aging and chronic diseases). We have identified five major features of ED shared between these conditions: (1) increased oxidative stress and systemic inflammation, (2) glycocalyx degradation and shedding, (3) disassembly of intercellular junctions, endothelial cell death, blood-tissue barrier disruption, (4) enhanced leukocyte adhesion and extravasation, (5) induction of a pro-coagulant and anti-fibrinolytic state. Future research works should evaluate if these features could represent a pathogenic trigger of sepsis in aged patients with chronic diseases suffering an infection.

2. Search Strategy and Selection Criteria

References for this literature review were identified through searches of PubMed for articles, giving priority to those published in the last 10 years, which constitutes 95% of the articles cited (Table 2). Terms used were “endothelial dysfunction”, “endothelium”, “sepsis”, “aging”, “elderly”. The terms for the chronic diseases associated to sepsis considered in this review are showed in Table 1, and were those reported by Rhee et al. [6] and Donnelly et al. [7]. These are the largest works published to the present date detailing the risk factors associated to sepsis using the new SEPSIS-3 criteria to define this disease [5]. Other terms searched in combination with “endothelial dysfunction” were “repair”, “progenitor cells”, “chemotherapy” and “radiotherapy”.

Table 2. References describing the features of endothelial dysfunction (ED).

Features of ED	Sepsis	Aging/Chronic Disease
Increased oxidative stress and systemic inflammation	[3,8–10]	[11–16]
Glycocalyx degradation and shedding	[2,3,17,18]	[19–29]
Disassembly of intercellular junctions, endothelial cell death, blood-tissue barrier disruption	[2,3,9,18,30,31]	[11,32–44]
Enhanced leukocyte adhesion and extravasation	[3,18,45,46]	[14,15,23,41,47–53]
Induction of a pro-coagulant and anti-fibrinolytic state	[3,8,17,30,54–56]	[12,15,16,23,41,48,57–63]
Impairment in the mechanisms of endothelial repair	[64]	[65–68]

3. The Healthy Endothelium

The vascular endothelium constitutes a semi-permeable barrier lining the inner surface of blood vessels (Figure 1). It controls the exchange of fluids, solutes, plasma proteins and leucocytes, by opening and closing the cell junctions composing it in a coordinated manner [69]. The normal vascular endothelium consists of a layer of endothelial cells (ECs), supported on a basement membrane, with the glycocalyx on the luminal side [45]. It prevents microorganisms to enter into tissues, exerting in addition a natural anticoagulant action that prevents from uncontrolled activation of the coagulation system.

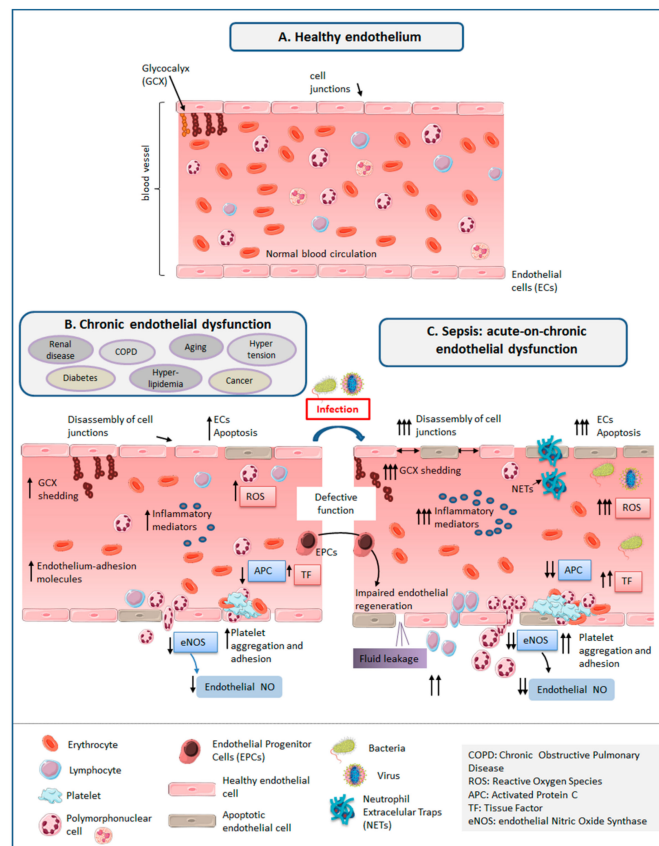


Figure 1. The endothelium in different scenarios: **(A)** Healthy endothelium: the normal vascular endothelium consists of a layer of endothelial cells with the glycocalyx on the luminal side. It prevents microorganisms to enter into tissues, exerting in addition a natural anticoagulant action that prevents from uncontrolled activation of the coagulation system; **(B)** Endothelial dysfunction (ED) induced by aging and chronic disease: senescence and the comorbidities preceding sepsis are associated to the presence of a chronic status of increased oxidative stress and inflammation, which induces glycoalyx degradation, apoptosis of endothelial cells, disassembly of endothelial cell junctions, and increased expression of molecules which promotes leukocyte adhesion to endothelial cells. In turn, these diseases induce a pro-coagulant and anti-fibrinolytic state with diminished activation of protein C and increased production of tissue factor. Decrease in the production of nitric oxide by the endothelial nitric oxide synthase promotes platelet aggregation and adhesion. Finally, these diseases impair production and function of Endothelial Progenitor Cells, impairing endothelial regeneration; **(C)** ED in sepsis: sepsis induces similar features of ED to those caused by aging and chronic diseases, inducing oxidative stress and inflammation, release of NETs and proteases by neutrophils, leading to fluid and cell leakage, hypotension, microvascular thrombosis, inadequate organ perfusion, organ failure and shock in the most severe cases. In addition, bacterial toxins can breach the endothelial barrier, by directly killing endothelial cells (ECs), weakening the cytoskeleton within ECs, and breaking the junctions between ECs. Acute challenges such as the aggression induced by surgery, trauma or hypervolemia could contribute to facilitate or enhance ED in patients facing an infection. Images for representing cells were taken from “Smart Servier Medical Art” (<https://smart.servier.com/>). NO: nitric oxide.

3.1. Glycocalyx (GCX)

It is an organized layer of sulfated proteoglycans, hyaluronan, glycoproteins, and plasma proteins that adhere to a surface matrix which coats the luminal surface of the endothelium. It serves as a protective barrier between the flowing blood and the vessel wall, contributing to maintain the endothelial barrier to fluid and protein, to regulate leukocyte-endothelial adhesion and to inhibit intravascular thrombosis [17].

3.2. Endothelial Cells (ECs)

ECs line our vasculature, as a one continuous layer resting on a basement membrane formed by collagen, laminins, nidogens/entactins, and the proteoglycan perlecan. Endothelial cells lining the vessel wall are connected by adherens junctions (mainly composed of vascular endothelial (VE)-cadherin), tight junctions (predominantly consisting of occludins and claudins) and gap junctions [2,70], which prevent leukocyte emigration and vascular leak [2]. Embedded in the basement membrane and outside it is a non-continuous layer of cells known as pericytes, which are thought to play a role in angiogenesis [45].

4. ED in Sepsis

Sepsis causes acute ED, inducing a pro-adhesive, pro-coagulant and anti-fibrinolytic state in ECs, altering hemostasis, leukocyte trafficking, inflammation, barrier function, and microcirculation [30] (Figure 1).

4.1. Increased Oxidative Stress and Systemic Inflammation

There are a number of mediators participating in the “molecular storm” occurring in sepsis that initiate and amplify injury to the endothelium. Between these molecules are bacterial endotoxins/pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), cytokines, bradykinin, histamine, platelet-activating factor (PAF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibrin degradation products and reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, hydroxyl anions, and superoxide [3,8–10]. In turn, the endothelium it is not just a passive element suffering the aggression during sepsis, but also produces chemokines to attract immune cells, boosting the inflammatory response [10].

4.2. GCX Degradation and Shedding

The “cocktail” of pro-inflammatory and pro-oxidative molecules induced by sepsis promotes shedding of the GCX [2,3,18]. Release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as degradation products of the endothelial GCX (i.e., heparan sulfates) or components of Neutrophil extracellular traps (NETs) amplifies this deleterious response [17,18].

4.3. Disassembly of Intercellular Junctions, Endothelial Cell Death, Blood–Tissue Barrier Disruption

The marked pro-inflammatory and oxidative response occurring in sepsis induces also the formation of gaps between ECs by disassembly of intercellular junctions [2,3,18]. NETs released from dying neutrophils induce death of ECs, an effect mediated by NETs-related proteases and cationic proteins such as defensins and histones [30,31]. Bacterial toxins can breach the endothelial barrier, by directly killing ECs, weakening the cytoskeleton within ECs, and breaking the junctions between ECs [9].

4.4. Enhanced Leukocyte Adhesion and Extravasation

Glycocalyx shedding exposes the endothelium to leukocyte adhesion [18]. Pro-inflammatory cytokines induce expression of molecules such as *p*-selectin, E-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) or vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) that allow adhesion of activated immune cells to the vascular wall and promote transendothelial migration into surrounding tissues [3]. Activated neutrophils from sepsis patients adhered to endothelium mediate profound loss of endothelial barrier integrity [46]. The proteases released by activated neutrophils could contribute to

degrade junctional proteins [45]. Extravasated neutrophils induce tissue damage producing potentially destructive enzymes and oxygen-free radicals.

4.5. Induction of A Pro-Coagulant and Anti-Fibrinolytic State

In sepsis there is also a significant increase in the production of nitric oxide (NO, a potent vasodilator) mediated by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) [3,54]. In contrast, there is an important decrease in the production of NO by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), which impairs direct vasodilatation, and promotes platelet and leukocyte adhesion [8]. Down-regulation of endothelial expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptors translates into diminished activation of the activated protein C [30]. ECs release the procoagulant glycoprotein TF (tissue factor), whereas their synthesis of TF pathway inhibitor is inhibited [30]. The activation of platelets and the coagulation cascade causes microvascular thrombosis [17]. In addition, NETs provide a scaffold for thrombus formation, promoting hypercoagulability in patients with sepsis [30]. The association of TF with NETs could target thrombin generation and fibrin clot formation at sites of infection/neutrophil activation, with active thrombin leading to increased platelet activation [55]. Acute vascular dysfunction and leakage contribute to hypotension, inadequate organ perfusion, local hypoxia, ischemia and ultimately, to organ failure, acute respiratory distress syndrome, shock and death in the most severe patients [8,56].

5. ED Associated to Aging and Chronic Disease

The same features of ED induced by sepsis are also induced by aging and chronic disease (Figure 1).

5.1. Increased Oxidative Stress and Systemic Inflammation

Aging is characterized by the presence of increased endothelial oxidative stress, as a result of augmented production from the intracellular enzymes NADPH oxidase and uncoupled eNOS, as well as from mitochondrial respiration in the absence of appropriate increases in antioxidant defenses [11]. Nitroso-oxidative stress contributes to ED associated with diabetes [12]. Vascular oxidative stress and inflammation are major determinants of ED in atherosclerosis and cardiovascular diseases [13]. Inflammation and free radical formation contributes also to the pathogenesis of hypertension and cancer [14]. In patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), chronic inflammation not only impacts on lung parenchyma, but potentially also involves the endothelium of blood vessels, which makes it a systemic disease [15]. Inflammation and oxidative stress play major roles in the pathogenesis of ED in liver cirrhosis [16].

5.2. GCX Degradation and Shedding

Untreated hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia are associated to a reduced endothelial GCX thickness [19–21]. Hyperglycaemia and oxidised low-density lipoprotein (LDL) causes GCX dysfunction [22]. GCX degradation is an initial event in atherosclerosis, promoting lipid deposition in the vessel wall [23]. Patients with chronic renal disease under dialysis have an impaired GCX barrier and shed its constituents into blood [24]. Cigarette smoking (the main cause of COPD) compromises endothelial GCX integrity [25]. Patients with end-stage liver disease show marked increased concentration of syndecan-1 in plasma, a marker of GCX shedding [26]. Elevated haematocrit, a risk factor for stroke and myocardial infarction, could induce a reduction in GCX thickness [27]. Patients with heart failure with reduced ejection fraction have increased levels of the GCX shedding marker median hyaluronic acid [28]. Lacunar stroke patients with white matter lesions show compromised GCX barrier properties [29].

5.3. Disassembly of Intercellular Junctions, Endothelial Cell Death, Blood-Tissue Barrier Disruption

Sedentary aging enhances endothelial cell senescence. Senescent ECs show a pro-oxidant phenotype with increased ROS production, which promote endothelial injury [11]. Tight junction structure and barrier

integrity is significantly impaired in senescent ECs [32]. LDL from patients with hypercholesterolaemia are inflammatory to microvascular endothelial cells, impairing in addition endothelial tight junction expression [33]. Activation of endothelial inflammasomes due to increased free fatty acids produces high mobility group box protein-1, HMGB1, which disrupts inter-endothelial junctions and increases paracellular permeability of endothelium [34]. High glucose concentrations induce disruption of endothelial adherens junctions mediated by protein kinase C- β -dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation [35]. Patients with chronic kidney diseases have increased levels of anti-endothelial cell antibodies, and decreased expression of both adherens and tight junction proteins VE-cadherin, claudin-1, and zonula occludens-1 [36]. Cigarette smoking disrupts intercellular adhesion molecules between ECs and induces their apoptosis [37]. In COPD patients, circulating anti-endothelial cell antibodies along with chronic oxidative and inflammatory stress induces apoptosis of ECs [38]. Cancer induces also disruption of endothelial junctions, in particular adherens junctions [39]. Anticancer chemotherapy may induce systemic damage of vascular endothelium related to massive cell loss and alterations of endothelial function [40]. Radiotherapy causes premature senescence, apoptosis of endothelial cells and increased vascular permeability [41]. Endothelial barrier is also altered in cardiovascular disease. Chemical modification of tubulin caused by cardiometabolic risk factors and oxidative stress leads to reorganization of endothelial microtubules, destabilizing vascular integrity and increasing permeability, which finally results in increasing cardiovascular and cerebrovascular risk [42]. Intravascular albumin is important for maintaining vascular integrity, since it contributes to preserve normal capillary permeability [43] and the GCX structure [44]. Patients with malnutrition, liver disease or nephrotic syndrome could present hypo-albuminemia.

5.4. Enhanced Leukocyte Adhesion and Extravasation

Aging is associated to stiffening of extracellular matrix within the intima, which promotes EC permeability and leukocyte extravasation [47]. Hypertension induces vascular wall injury and remodeling, a process which involves recruitment of leukocytes to the endothelium [14]. Glycocalyx degradation in atherosclerosis facilitates the interaction between ECs and leukocytes [23]. Hyperglycemia induces activation of NF- κ B in ECs, leading to an increased production of adhesion molecules, leukocyte-attracting chemokines and cytokines activating inflammatory cells in the vascular wall [48]. In chronic kidney disease, leukocytes acquire an adhesive phenotype, by mechanisms mediated by hypoxia and by cytokines released from ischemic renal endothelium [49]. In patients with COPD, fibrinogen is increased and stimulates the adhesion of platelets and white blood cells to the vessel wall [15]. Tobacco nicotine causes a loss of functional integrity of endothelium by causing vasospasm, stimulating the adhesion of leukocytes [50]. Up-regulation of selectins seems to be a central event in metastatic progression in cancer, proteins which mediate tethering and rolling of leukocytes to the vascular endothelium. Regarding cancer treatment, radiotherapy leads to increased endothelial cell activation and expression of VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-selectin and *p*-selectin, which promotes adhesion of leukocytes [41]. Chronic liver disease is characterized by upregulation of endothelium-adhesion molecules such as CD11b in circulating leukocytes in blood [51]. Leukocyte activation, adhesion and accumulation in the endothelium are events playing an important role in the pathogenesis of different cardiac diseases (myocarditis, cardiomyopathy, cardiac hypertrophy and failure, and ischemic heart disease) [52] and in ischemic cerebrovascular disease [53].

5.5. Induction of A Pro-Coagulant and Anti-Fibrinolytic State

Senescent ECs show reduced eNOS activity, which impairs their ability to inhibit platelet aggregation [57]. Hypertension is associated to ED leading to attenuated NO formation because of direct oxidative modification of eNOS [58]. GCX degradation in atherosclerosis causes ECs to reduce their expression of eNOS [23]. Oxidative stress associated with hyperglycemia induces eNOS uncoupling and reduce NO production [12]. Hyperglycemia, excess free fatty acid release and insulin resistance in diabetes mellitus induces platelet hyperactivity [48]. Additionally, hyperglycemia

generates a prothrombotic state by the increased production of lesion-based coagulants, such as tissue factor, and the inhibitors of fibrinolysis, such as PAI-1 [48]. Patients with chronic renal disease can show either coagulation defects and endothelial cell damage leading to a thrombophilic state, which is characterized by the presence of high plasma concentration of fibrinogen, D-dimer, thrombin–antithrombin complex, coagulation factor VII, vWF, thrombomodulin and PAI-1 [59]. Patients with COPD or liver cirrhosis have impaired eNOS activity also [15,16]. Smoking along with the maintained pro-inflammatory state in COPD induce a thrombotic effect, by increasing platelet activation and triggering coagulation cascade [15]. Cancer may result in activation of coagulation and endothelial cell perturbation, leading to coagulopathies, a prothrombotic state and microvascular dysfunction, by mechanisms involving tissue factor-mediated thrombin generation, down regulation of endothelial cell-associated physiological anticoagulant pathways, deranged fibrinolysis and dysfunctional ECs [60]. This pro-coagulating phenotype in cancer could also be favored in chemo and radiotherapy [41,60]. Patients with chronic liver disease show hyperhomocysteinaemia, a disorder of methionine metabolism, which has been suggested to cause endothelial injury and atherothrombotic vascular disease by several mechanisms involving oxidative stress, altered production of NO and impaired platelet-modulating activity [61]. Coronary heart disease associated with hypertension is characterized by reduced endothelial NO synthesis [62]. Endothelial dysfunction and coagulation are also involved in the pathogenesis of ischaemic stroke [63].

6. Impact of Aging and Chronic Disease on the Mechanisms of Endothelial Repair

Endothelial cell injury is mitigated by the reparative activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs). As recently described, EPCs could have a role in determining the prognosis of patients with sepsis [64]. Cell senescence impairs the regenerative capacity of ECs. Age impairs migration of endothelial progenitor cells (EPCs) reducing their ability to contribute to vascular repair [65]. Chronic diseases preceding sepsis decrease EPC availability and/or mobilization. The absolute number, or functional capacity of EPCs, has been shown to be reduced in several disease states including diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and chronic kidney disease [66]. Circulating EPCs from COPD are dysfunctional, displaying impaired angiogenic ability and increased apoptosis [67]. Radiotherapy lowers the number of circulating EPCs in cancer survivors [68]. The consequences of chemotherapy on EPCs at the long term are unknown.

7. Link between Chronic Endothelial Dysfunction and Sepsis: “Proof of Concept” Studies

The evidence available from the literature shows that sepsis and their preceding risk factors (aging and chronic diseases) share common features of ED, characterized by loss of the endothelium’s tightly regulated balance and the presence of sustained EC activation. As occurs in sepsis, aging and chronic ED promotes a pro-inflammatory, pro-oxidative and pro-coagulation status in the blood vessels, favoring vasomotor tone alterations, platelet activation and leukocyte adhesion and transmigration. In addition, aging and chronic diseases impair the regenerative ability of the endothelium. Aging and chronic ED thus contribute to generating a basal degree of organ failure [14]. All of this draws a scenario of “endothelial frailty” preceding sepsis. The presence of previous ED could represent thus a predisposing factor for developing new ED when the patient suffers an infection (a phenomenon of “Acute-on-Chronic ED”), contributing to generate new organ failure in these patients, or which is the same, sepsis (Figure 1).

There is a number of “proof of concept” studies supporting the link between chronic ED and sepsis (Figure 2). In an elegant study on a cohort of individuals with no sepsis living in the community, Wang et al. showed that high basal levels of endothelial activation makers in serum (E-selectin and ICAM-1) conferred a higher risk of developing future episodes of sepsis. As the authors discuss in this article, basal elevation of these biomarkers may indicate individuals that are prone to develop a higher degree of ED in the face of acute infection [71]. In a large epidemiological study, the same authors identified an association between the antecedent of vascular disease and risk of developing sepsis,

proposing endothelium dysfunction as the physiopathological link between these two conditions [72]. Schuetz P. et al. showed in a cohort of sepsis patients, that compared to non-diabetic patients, those patients with diabetes had higher levels of circulating E-selectin and fms-like tyrosine kinase-1 (a VEGF signaling protein contributing to vascular leak), and propose developing future studies to investigate whether patients with diabetes suffering from sepsis show an enhanced activation of the endothelium [73]. Similarly, Kern et al. evidenced that sepsis patients with preexisting coronary artery disease shows increased endothelial injury (indicated by the elevated levels of ICAM-1, E-selectin, and cGMP) compared to those with no antecedent of this disease [74]. Wiewel et al. showed that the antecedent of hypertension and chronic cardiovascular insufficiency is associated with an increased risk of hypothermic sepsis, an especially severe form of this disease, and propose a fractalkine-related endothelial activation mechanism to explain the link between these cardiovascular risk factors and sepsis [75]. Using an animal model, Doi et al. demonstrated that septic mice with pre-existing renal disease had significantly higher mortality, vascular permeability, plasma vascular endothelial growth factor levels (VEGF; a growth factor known to enhance vascular permeability), and more severe septic shock when compared to septic mice without pre-existing disease [76].

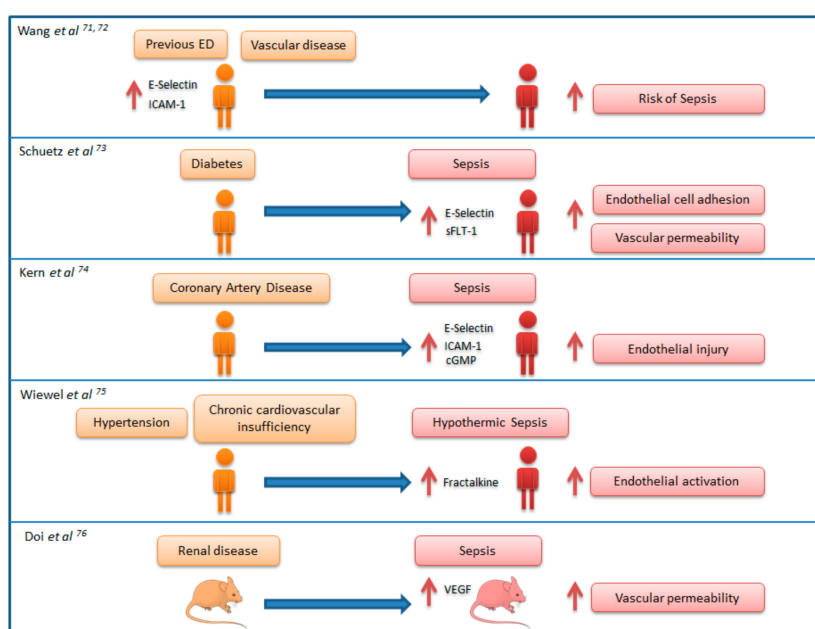


Figure 2. Proof of concept studies supporting the connection between chronic ED and sepsis. Images for representing mice were taken from “Smart Servier Medical Art” (<https://smart.servier.com/>). ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VEGF: vascular endothelial growth factor; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; sFLT-1: fms-like tyrosine kinase-1.

8. Other Factors Inducing ED before Sepsis

In addition to aging and chronic disease, there are other factors such as critical illness, surgery, trauma or hypovolemia which induce ED preceding sepsis [77–79]. Increasing evidence supports that this previous ED could facilitate the incidence of sepsis. Vassiliou A.G. et al. in a cohort of initially non-septic critically-ill patients, found that the presence of elevated biomarkers of ED at ICU admission (Soluble E- and *p*-selectin levels) predicted sepsis development [80]. In the same scenario (non-septic critically-ill patients), Vassiliou A.G. et al. have also demonstrated that soluble endothelial protein C receptor levels at intensive care unit (ICU) admission (a protein regulates the protein C anticoagulant activity) are elevated in the subjects who will subsequently become septic [81]. In a recently published article, Wei S. et al. demonstrate that a high degree of ED following traumatism (as assessed by levels of Syndecan 1 in serum) is associated with an increased risk of developing sepsis [79]. An old work

from Ikegami K. et al. showed that the degree of endothelial cell injury in patients suffering blunt trauma (as quantified by the soluble thrombomodulin levels) predicted the incidence of sepsis [82].

9. Implications for Clinical Practice and Future Research

9.1. Quantifying ED to Predict or Early Detect Sepsis in Infected Patients

When an aged individual with chronic disease shows signs of infection, monitoring ED could help to predict or early detect sepsis [17]. ED could be profiled “in vivo” using non-invasive image techniques. Examples are flow-mediated vasodilation [66], intravital microscopy or hand-held video images of sublingual microcirculation [3]. The other approach to evaluate ED is using biomarkers. Biomarkers of ED have been reviewed elsewhere [83–86] and include markers of endothelial glycocalyx degradation such as heparan sulfate, chondroitin sulfate, hyaluronic acid and syndecan [87], markers of endothelial cell activation such as endocan [88] or Angiotensin-2 [85], cell adhesion molecules such as selectins [85], ICAM-1 and VCAM-1 [88], vasoactive peptides such as midregional proadrenomedullin [89] and midregional proatrial natriuretic peptide [84], coagulation inhibitors such as thrombomodulin [84], molecules with vasoconstrictor and vasopressor activity such as endothelin [85], growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) [85], and circulating endothelial cells [66] as some of the most relevant. As previously proposed, a multimarker strategy could represent the best approach to cover the different features of endothelial injury [84]. Methods such as the ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based multiple reaction allows to simultaneously profile multiple endothelial biomarkers [84]. Development of “point of care” approaches for profiling ED at the community, the emergency room or at the hospital ward could contribute to diagnose sepsis earlier [90].

9.2. Endothelium-Protective Therapies for the Prevention and Treatment of Sepsis

In elderly patients or those with chronic diseases who suffer an infection, combining antimicrobials with drugs protecting the endothelium could prevent the development of sepsis or improve outcome once sepsis is present. Many potential treatment options to prevent or treat ED have been proposed, [13,44,86,91], but probably the most successful example to the present date is the trial performed by Marik et al. These authors have demonstrated that the early administration of intravenous vitamin C, corticosteroids and thiamine prevent progressive organ dysfunction and reduce mortality of patients with sepsis [92]. In an elegant “in vitro” work, the group of Dr. Marik demonstrated that Hydrocortisone and Ascorbic Acid exert a synergistic effect preventing and repairing endothelial barrier dysfunction induced by Lipopolysaccharide [93]. Works on cellular and animal models will help to elucidate the potential role of endothelium-protective drugs for the prevention and treatment of sepsis in the infected host.

9.3. Other Potential Research Avenues

(1) Developing future studies evaluating the specific impact of aging and each one of the chronic diseases discussed here on the endothelium will help to better understand their individual contribution to sepsis. Animal and cellular models could be very useful to this regard. (2) Our review focused on those co-morbidities linked to sepsis in high income countries. In low-middle income countries, the epidemiological profile of sepsis is different. Sepsis patients are younger there, but they suffer frequently from a number of conditions also linked to ED, such as malnutrition, malaria and HIV infection. Evaluating the chronic impact of these conditions on the endothelium and also on the risk of developing sepsis deserves further research efforts. (3) Our review addresses only vascular ED. There is a total lack of information in the literature on the impact of sepsis, aging and chronic disease on the lymphatic vessels’ endothelium. The lymphatic system could have important implications in sepsis pathophysiology, since it is the main avenue for circulation of dendritic cells and lymphocytes.

(4) Finally, studies evaluating the interactions between chronic endothelial, immunological, coagulation and metabolic dysfunction will help to better understand the pathogenesis of sepsis (Figure 3).

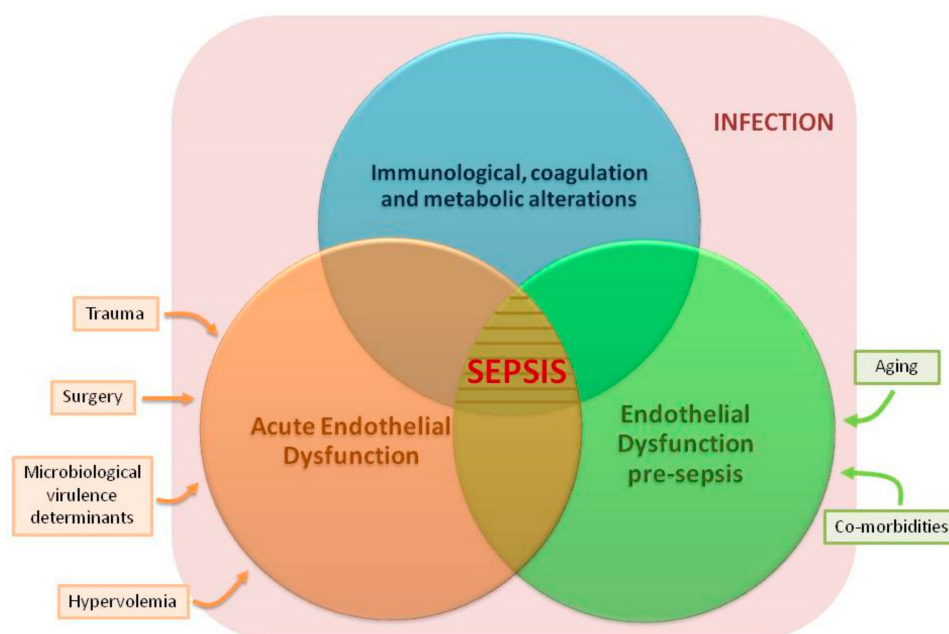


Figure 3. Potentially synergistic factors contributing to sepsis. Blue circle: immunological, coagulation or metabolic alterations previous to sepsis or induced by sepsis. Green circle: chronic endothelial dysfunction (ED) pre-sepsis caused by aging and chronic diseases. Orange circle: acute ED induced by sepsis secondary to microbial aggression, to the dysfunctional host response to infection, hypervolemia, trauma, surgery, and/or to other acute insults facilitating sepsis.

10. Conclusions

Sepsis, aging and chronic disease induce similar features of ED. There is growing evidence supporting that pre-existing ED could represent a predisposing factor for sepsis, facilitating the induction of acute ED in those patients facing an infection. Further studies should elucidate whether monitoring ED in elderly individuals with chronic disease could help to predict or to early identify sepsis, and also if administration of drugs improving ED could have a beneficial effect to prevent or treat this disease.

Author Contributions: The bibliographic review was performed by J.F.B.-M., who wrote the manuscript. C.L.-M., P.D., R.A. contributed to design the article structure, and to select the included bibliography. In addition, they critically reviewed the manuscript. M.M.-F. and R.A. created the figures and the tables and critically reviewed the manuscript.

Funding: This research was funded by “Consejería de Sanidad de Castilla y León-IECSCYL”/“Instituto de Salud Carlos III”, Spain, [EMER07/050 & PI16/01156] and “Consejería de Educación de Castilla y León/Fondo social Europeo”.

Acknowledgments: We thank the Anesthesiology and Critical Care Services of our Hospitals for their continued support to our research program on sepsis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hotchkiss, R.S.; Moldawer, L.L.; Opal, S.M.; Reinhart, K.; Turnbull, I.R.; Vincent, J.-L. Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2016**, *2*, 16045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lee, W.L.; Slutsky, A.S. Sepsis and endothelial permeability. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 689–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ince, C.; Mayeux, P.R.; Nguyen, T.; Gomez, H.; Kellum, J.A.; Ospina-Tascón, G.A.; Hernandez, G.; Murray, P.; De Backer, D. ADQI XIV Workgroup. The endothelium in sepsis. *Shock* **2016**, *45*, 259–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Novosad, S.A.; Sapiiano, M.R.P.; Grigg, C.; Lake, J.; Robyn, M.; Dumyati, G.; Felsen, C.; Blog, D.; Dufort, E.; Zansky, S.; et al. Vital signs: Epidemiology of sepsis: Prevalence of health care factors and opportunities for prevention. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 864–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Singer, M.; Deutschman, C.S.; Seymour, C.W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.R.; Chiche, J.-D.; Coopersmith, C.M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 801–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rhee, C.; Dantes, R.; Epstein, L.; Murphy, D.J.; Seymour, C.W.; Iwashyna, T.J.; Kadri, S.S.; Angus, D.C.; Danner, R.L.; Fiore, A.E.; et al. CDC prevention epicenter program incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs. claims data, 2009–2014. *JAMA* **2017**, *318*, 1241–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Donnelly, J.P.; Safford, M.M.; Shapiro, N.I.; Baddley, J.W.; Wang, H.E. Application of the Third International Consensus Definitions for Sepsis (Sepsis-3) Classification: A retrospective population-based cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 661–670. [[CrossRef](#)]
8. Pool, R.; Gomez, H.; Kellum, J.A. Mechanisms of organ dysfunction in sepsis. *Crit. Care Clin.* **2018**, *34*, 63–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lubkin, A.; Torres, V.J. Bacteria and endothelial cells: A toxic relationship. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, *35*, 58–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Chousterman, B.G.; Swirski, F.K.; Weber, G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39*, 517–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Donato, A.J.; Morgan, R.G.; Walker, A.E.; Lesniewski, L.A. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *89*, 122–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Goligorsky, M.S. Vascular endothelium in diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2017**, *312*, 266–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Daiber, A.; Steven, S.; Weber, A.; Shuvaev, V.V.; Muzykantov, V.R.; Laher, I.; Li, H.; Lamas, S.; Münzel, T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1591–1619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Konukoglu, D.; Uzun, H. Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *956*, 511–540. [[PubMed](#)]
15. Malerba, M.; Nardin, M.; Radaeli, A.; Montuschi, P.; Carpagnano, G.E.; Clini, E. The potential role of endothelial dysfunction and platelet activation in the development of thrombotic risk in COPD patients. *Expert Rev. Hematol.* **2017**, *10*, 821–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vairappan, B. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World J. Hepatol.* **2015**, *7*, 443–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Colbert, J.F.; Schmidt, E.P. Endothelial and microcirculatory function and dysfunction in sepsis. *Clin. Chest Med.* **2016**, *37*, 263–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Martin, L.; Koczera, P.; Zechendorf, E.; Schuerholz, T. The endothelial glycocalyx: New diagnostic and therapeutic approaches in sepsis. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 3758278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ikonomidis, I.; Voumvourakis, A.; Makavos, G.; Triantafyllidi, H.; Pavlidis, G.; Katogiannis, K.; Benas, D.; Vlastos, D.; Trivilou, P.; Varoudi, M.; et al. Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Groen, B.B.L.; Hamer, H.M.; Snijders, T.; van Kranenburg, J.; Frijns, D.; Vink, H.; Van Loon, L.J.C. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. *J. Appl. Physiol.* **2014**, *116*, 998–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Meuwese, M.C.; Mooij, H.L.; Nieuwdorp, M.; van Lith, B.; Marck, R.; Vink, H.; Kastelein, J.J.P.; Stroes, E.S.G. Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 148–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Drake-Holland, A.J.; Noble, M.I. The important new drug target in cardiovascular medicine—The vascular glycocalyx. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* **2009**, *9*, 118–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mitra, R.; O’Neil, G.L.; Harding, I.C.; Cheng, M.J.; Mensah, S.A.; Ebong, E.E. Glycocalyx in atherosclerosis-relevant endothelium function and as a therapeutic target. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2017**, *19*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vlahu, C.A.; Lemkes, B.A.; Struijk, D.G.; Koopman, M.G.; Krediet, R.T.; Vink, H. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *23*, 1900–1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Ikonomidis, I.; Marinou, M.; Vlastos, D.; Kourea, K.; Andreadou, I.; Liarakos, N.; Triantafyllidi, H.; Pavlidis, G.; Tsougos, E.; Parissis, J.; et al. Effects of varenicline and nicotine replacement therapy on arterial elasticity, endothelial glycocalyx and oxidative stress during a 3-month smoking cessation program. *Atherosclerosis* **2017**, *262*, 123–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schiefer, J.; Lebherz-Eichinger, D.; Erdoes, G.; Berlakovich, G.; Bacher, A.; Krenn, C.G.; Faybik, P. Alterations of endothelial glycocalyx during orthotopic liver transplantation in patients with end-stage liver disease. *Transplantation* **2015**, *99*, 2118–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Richter, V.; Savery, M.D.; Gassmann, M.; Baum, O.; Damiano, E.R.; Pries, A.R. Excessive erythrocytosis compromises the blood-endothelium interface in erythropoietin-overexpressing mice. *J. Physiol. (Lond.)* **2011**, *589*, 5181–5192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Nijst, P.; Cops, J.; Martens, P.; Swennen, Q.; Dupont, M.; Tang, W.H.W.; Mullens, W. Endovascular shedding markers in patients with heart failure with reduced ejection fraction: Results from a single-center exploratory study. *Microcirculation* **2018**, *25*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Martens, R.J.H.; Vink, H.; van Oostenbrugge, R.J.; Staals, J. Sublingual microvascularglycocalyx dimensions in lacunar stroke patients. *Cerebrovasc. Dis.* **2013**, *35*, 451–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hattori, Y.; Hattori, K.; Suzuki, T.; Matsuda, N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *177*, 56–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Saffarzadeh, M.; Juenemann, C.; Queisser, M.A.; Lochnit, G.; Barreto, G.; Galuska, S.P.; Lohmeyer, J.; Preissner, K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yamazaki, Y.; Baker, D.J.; Tachibana, M.; Liu, C.-C.; van Deursen, J.M.; Brott, T.G.; Bu, G.; Kanekiyo, T. Vascular cell senescence contributes to blood-brain barrier breakdown. *Stroke* **2016**, *47*, 1068–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dias, H.K.I.; Brown, C.L.R.; Polidori, M.C.; Lip, G.Y.H.; Griffiths, H.R. LDL-lipids from patients with hypercholesterolaemia and Alzheimer’s disease are inflammatory to microvascular endothelial cells: Mitigation by statin intervention. *Clin. Sci.* **2015**, *129*, 1195–1206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, L.; Chen, Y.; Li, X.; Zhang, Y.; Gulbins, E.; Zhang, Y. Enhancement of endothelial permeability by free fatty acid through lysosomalcathepsin B-mediated Nlrp3 inflammasome activation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 73229–73241. [[PubMed](#)]
35. Haidari, M.; Zhang, W.; Willerson, J.T.; Dixon, R.A. Disruption of endothelial adherens junctions by high glucose is mediated by protein kinase C- β -dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Cardiovasc. Diabetol.* **2014**, *13*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hernandez, N.M.; Casselbrant, A.; Joshi, M.; Johansson, B.R.; Sumitran-Holgersson, S. Antibodies to kidney endothelial cells contribute to a “leaky” glomerular barrier in patients with chronic kidney diseases. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2012**, *302*, 884–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lu, Q.; Gottlieb, E.; Rounds, S. Effects of cigarette smoke on pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Polverino, F.; Celli, B.R.; Owen, C.A. COPD as an endothelial disorder: Endothelial injury linking lesions in the lungs and other organs? (2017 Grover Conference Series). *Pulm. Circ.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cerutti, C.; Ridley, A.J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* **2017**, *358*, 31–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Romanov, Y.A.; Chervontseva, A.M.; Savchenko, V.G.; Smirnov, V.N. Vascular endothelium: Target or victim of cytostatic therapy? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *85*, 396–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Guipaud, O.; Jaillot, C.; Clément-Colmou, K.; François, A.; Supiot, S.; Milliat, F. The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **2018**, *91*, 20170762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chistiakov, D.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. Endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ferrer, R.; Mateu, X.; Maseda, E.; Yébenes, J.C.; Aldecoa, C.; De Haro, C.; Ruiz-Rodriguez, J.C.; Garnacho-Montero, J. Non-oncotic properties of albumin. A multidisciplinary vision about the implications for critically ill patients. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 125–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Tarbell, J.M.; Cancel, L.M. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J. Intern. Med.* **2016**, *280*, 97–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gane, J.; Stockley, R. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. *Thorax* **2012**, *67*, 553–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fox, E.D.; Heffernan, D.S.; Cioffi, W.G.; Reichner, J.S. Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit. Care* **2013**, *17*, 226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Huynh, J.; Nishimura, N.; Rana, K.; Peloquin, J.M.; Califano, J.P.; Montague, C.R.; King, M.R.; Schaffer, C.B.; Reinhart-King, C.A. Age-related intimal stiffening enhances endothelial permeability and leukocyte transmigration. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sena, C.M.; Pereira, A.M.; Seiça, R. Endothelial dysfunction—A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 2216–2231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Fu, Q.; Colgan, S.P.; Shelley, C.S. Hypoxia: The force that drives chronic kidney disease. *Clin. Med. Res.* **2016**, *14*, 15–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Favero, G.; Paganelli, C.; Buffoli, B.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: Life style intervention. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 801896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wadkin, J.C.R.; Patten, D.A.; Kamarajah, S.K.; Shepherd, E.L.; Novitskaya, V.; Berdichevski, F.; Adams, D.H.; Weston, C.J.; Shetty, S. CD151 supports VCAM-1-mediated lymphocyte adhesion to liver endothelium and is upregulated in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2017**, *313*, 138–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gavin, J.B.; Maxwell, L.; Edgar, S.G. Microvascular involvement in cardiac pathology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1998**, *30*, 2531–2540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Frijns, C.J.M.; Kappelle, L.J. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* **2002**, *33*, 2115–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Fortin, C.F.; McDonald, P.P.; Fülöp, T.; Lesur, O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): An intricate affair. *Shock* **2010**, *33*, 344–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gardiner, E.E.; Andrews, R.K. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev.* **2012**, *26*, 255–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Crouser, E.D.; Matthay, M.A. Endothelial damage during septic shock: Significance and implications for future therapies. *Chest* **2017**, *152*, 1–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Silva, G.C.; Abbas, M.; Khemais-Benkhiat, S.; Burban, M.; Ribeiro, T.P.; Toti, F.; Idris-Khodja, N.; Côrtes, S.F.; Schini-Kerth, V.B. Replicative senescence promotes prothrombotic responses in endothelial cells: Role of NADPH oxidase- and cyclooxygenase-derived oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **2017**, *93*, 7–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Brandes, R.P. Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension* **2014**, *64*, 924–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Lutz, J.; Menke, J.; Sollinger, D.; Schinzel, H.; Thürmel, K. Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2014**, *29*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Levi, M. Cancer-related coagulopathies. *Thromb. Res.* **2014**, *133*, 70–75. [[CrossRef](#)]
61. Remková, A.; Remko, M. Homocysteine and endothelial markers are increased in patients with chronic liver diseases. *Eur. J. Intern. Med.* **2009**, *20*, 482–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Besedina, A. NO-synthase activity in patients with coronary heart disease associated with hypertension of different age groups. *J. Med. Biochem.* **2016**, *35*, 43–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wiseman, S.; Marlborough, F.; Doubal, F.; Webb, D.J.; Wardlaw, J. Blood markers of coagulation, fibrinolysis, endothelial dysfunction and inflammation in lacunar stroke versus non-lacunar stroke and non-stroke: Systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc. Dis.* **2014**, *37*, 64–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kung, C.-T.; Su, C.-M.; Chen, C.T.; Cheng, H.-H.; Chang, M.-W.; Hung, C.-W.; Hung, S.-C.; Chang, W.-N.; Tsai, N.-W.; Wang, H.-C.; et al. Circulating endothelial progenitor cells may predict outcomes in adult patients with severe sepsis in the emergency department. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *455*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Williamson, K.A.; Hamilton, A.; Reynolds, J.A.; Sipos, P.; Crocker, I.; Stringer, S.E.; Alexander, Y.M. Age-related impairment of endothelial progenitor cell migration correlates with structural alterations of heparan sulfate proteoglycans. *Aging Cell* **2013**, *12*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Burger, D.; Touyz, R.M. Cellular biomarkers of endothelial health: Microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2012**, *6*, 85–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Paschalaki, K.E.; Starke, R.D.; Hu, Y.; Mercado, N.; Margariti, A.; Gorgoulis, V.G.; Randi, A.M.; Barnes, P.J. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem Cells* **2013**, *31*, 2813–2826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Pradhan, K.; Mund, J.; Case, J.; Gupta, S.; Liu, Z.; Gathirua-Mwangi, W.; McDaniel, A.; Renbarger, J.; Champion, V. Differences in circulating endothelial progenitor cells among childhood cancer survivors treated with and without radiation. *J. Hematol. Thromb.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)]
69. Radeva, M.Y.; Waschke, J. Mind the gap: Mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol. (Oxf.)* **2018**, *222*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Wallez, Y.; Huber, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 794–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Wang, H.E.; Shapiro, N.I.; Griffin, R.; Safford, M.M.; Judd, S.; Howard, G. Inflammatory and endothelial activation biomarkers and risk of sepsis: A nested case-control study. *J. Crit. Care* **2013**, *28*, 549–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wang, H.E.; Shapiro, N.I.; Griffin, R.; Safford, M.M.; Judd, S.; Howard, G. Chronic medical conditions and risk of sepsis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Schuetz, P.; Yano, K.; Sorasaki, M.; Ngo, L.; St Hilaire, M.; Lucas, J.M.; Aird, W.; Shapiro, N.I. Influence of diabetes on endothelial cell response during sepsis. *Diabetologia* **2011**, *54*, 996–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kern, H.; Wittich, R.; Rohr, U.; Kox, W.J.; Spies, C.D. Increased endothelial injury in septic patients with coronary artery disease. *Chest* **2001**, *119*, 874–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Wiewel, M.A.; Harmon, M.B.; van Vught, L.A.; Scicluna, B.P.; Hoogendijk, A.J.; Horn, J.; Zwinderman, A.H.; Cremer, O.L.; Bonten, M.J.; Schultz, M.J.; et al. Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis. *Crit. Care* **2016**, *20*, 328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Doi, K.; Leelahavanichkul, A.; Hu, X.; Sidransky, K.L.; Zhou, H.; Qin, Y.; Eisner, C.; Schnermann, J.; Yuen, P.S.T.; Star, R.A. Pre-existing renal disease promotes sepsis-induced acute kidney injury and worsens outcome. *Kidney Int.* **2008**, *74*, 1017–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Wang, J.; Wu, A.; Wu, Y. Endothelial glycocalyx layer: A possible therapeutic target for acute lung injury during lung resection. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 5969657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Chappell, D.; Bruegger, D.; Potzel, J.; Jacob, M.; Brettner, F.; Vogeser, M.; Conzen, P.; Becker, B.F.; Rehm, M. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit. Care* **2014**, *18*, 538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Wei, S.; Rodriguez, E.G.; Chang, R.; Holcomb, J.B.; Kao, L.S.; Wade, C.E. PROPPR Study Group elevated syndecan-1 after trauma and risk of sepsis: A secondary analysis of patients from the Pragmatic, Randomized Optimal Platelet and Plasma Ratios (PROPPR) trial. *J. Am. Coll. Surg.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Vassiliou, A.G.; Mastora, Z.; Orfanos, S.E.; Jahaj, E.; Maniatis, N.A.; Koutsoukou, A.; Armaganidis, A.; Kotanidou, A. Elevated biomarkers of endothelial dysfunction/activation at ICU admission are associated with sepsis development. *Cytokine* **2014**, *69*, 240–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Vassiliou, A.G.; Kotanidou, A.; Mastora, Z.; Maniatis, N.A.; Albani, P.; Jahaj, E.; Koutsoukou, A.; Armaganidis, A.; Orfanos, S.E. Elevated soluble endothelial protein C receptor levels at ICU admission are associated with sepsis development. *Minerva Anesthesiol.* **2015**, *81*, 125–134. [[PubMed](#)]
82. Ikegami, K.; Suzuki, Y.; Yukioka, T.; Matsuda, H.; Shimazaki, S. Endothelial cell injury, as quantified by the soluble thrombomodulin level, predicts sepsis/multiple organ dysfunction syndrome after blunt trauma. *J. Trauma* **1998**, *44*, 789–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Xing, K.; Murthy, S.; Liles, W.C.; Singh, J.M. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis—A systematic review. *Crit. Care* **2012**, *16*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Walczak, M.; Suraj, J.; Kus, K.; Kij, A.; Zakrzewska, A.; Chlopicki, S. Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 771–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Paulus, P.; Jennewein, C.; Zacharowski, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: Can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* **2011**, *16*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Opal, S.M.; van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* **2015**, *277*, 277–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Schmidt, E.P.; Overdier, K.H.; Sun, X.; Lin, L.; Liu, X.; Yang, Y.; Ammons, L.A.; Hiller, T.D.; Suflita, M.A.; Yu, Y.; et al. Urinary glycosaminoglycans predict outcomes in septic shock and acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *194*, 439–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Hsiao, S.-Y.; Kung, C.-T.; Tsai, N.-W.; Su, C.-M.; Huang, C.-C.; Lai, Y.-R.; Wang, H.-C.; Cheng, B.-C.; Su, Y.-J.; Lin, W.-C.; et al. Concentration and value of endocan on outcome in adult patients after severe sepsis. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *483*, 275–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Andaluz-Ojeda, D.; Nguyen, H.B.; Meunier-Beillard, N.; Cicuéndez, R.; Quenot, J.-P.; Calvo, D.; Dargent, A.; Zarca, E.; Andrés, C.; Nogales, L.; et al. Superior accuracy of mid-regional proadrenomedullin for mortality prediction in sepsis with varying levels of illness severity. *Ann. Intensive Care* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Reddy, B., Jr.; Hassan, U.; Seymour, C.; Angus, D.C.; Isbell, T.S.; White, K.; Weir, W.; Yeh, L.; Vincent, A.; Bashir, R. Point-of-care sensors for the management of sepsis. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2*, 640–648. [[CrossRef](#)]
91. Darwish, I.; Liles, W.C. Emerging therapeutic strategies to prevent infection-related microvascular endothelial activation and dysfunction. *Virulence* **2013**, *4*, 572–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Marik, P.E.; Khangoora, V.; Rivera, R.; Hooper, M.H.; Catravas, J. Hydrocortisone, vitamin c, and thiamine for the treatment of severe sepsis and septic shock: A retrospective before-after study. *Chest* **2017**, *151*, 1229–1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Barabutis, N.; Khangoora, V.; Marik, P.E.; Catravas, J.D. Hydrocortisone and ascorbic acid synergistically prevent and repair lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Chest* **2017**, *152*, 954–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	300361244	
Application number	EP20382308.3	
File No. to be used for priority declarations	EP20382308	
Date of receipt	17 April 2020	
Your reference	905 008	
Applicant	Fundación Instituto de Estudios Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL-IBSAL)	
Country	ES	
Title	IN VITRO METHOD FOR PREDICTING MORTALITY RISK IN PATIENTS SUFFERING FROM INFECTION WITH ORGAN FAILURE	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\905 008 Description.pdf (15 p.) SPECEPO-4.pdf\905 008 Figures.pdf (7 p.) OLF-ARCHIVE.zip\905 008 Text to file.zip	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\905 008 Claims.pdf (3 p.) SPECEPO-3.pdf\905 008 Abstract.pdf (1 p.) f1002-1.pdf (2 p.)
Submitted by	CN=Miguel Martinez 64077	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	17 April 2020, 09:03:02 (CEST)	

/Madrid, Oficina Receptora/

Request for grant of a European patent

For official use only

1	Application number:	<input type="text" value="MKEY"/>
2	Date of receipt (Rule 35(2) EPC):	<input type="text" value="DREC"/>
3	Date of receipt at EPO (Rule 35(4) EPC):	<input type="text" value="RENA"/>
4	Date of filing:	

5 Grant of European patent, and examination of the application under Article 94, are hereby requested.

Request for examination in an admissible non-EPO language:

Se solicita el examen de la solicitud según el artículo 94.

5.1 The applicant waives his right to be asked whether he wishes to proceed further with the application (Rule 70(2))

Procedural language:

en

Filing Language:

en

6 Applicant's or representative's reference

905 008

Filing Office:

ES

Applicant 1

7-1 Name:

Fundación Instituto de Estudios Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL-IBSAL)

8-1 Address:

Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182

37007 Salamanca

Spain

10-1 State of residence or of principal place of business:

Spain

Applicant 2

7-2 Name:

Gerencia Regional de Salud de Castilla y León

8-2 Address:

Paseo de Zorrilla, 1

47007 Valladolid

Spain

10-1 State of residence or of principal place of business:

Spain

Applicant 3

7-3

Name:

Universidad de Valladolid

8-3

Address:

Plaza de Santa Cruz, 8
47002 Valladolid
Spain

10-1

State of residence or of principal place of business:

Spain

14.1 The/Each applicant hereby declares that he is an entity or a natural person under Rule 6(4) EPC.



Representative 1

15-1

Name:

HOFFMANN EITLE S.L.U.

Association No.:

151

16-1

Address of place of business:

Paseo de la Castellana 140
Planta 3ª. Edificio Lima
28046 Madrid
Spain

17-1

Telephone:

+34917822780

17-1

Fax:

+4989918356

17-1

E-mail:

mmartinez@hoffmanneitle.com

Inventor(s)

23 Designation of inventor attached



24 **Title of invention**

Title of invention:

IN VITRO METHOD FOR PREDICTING
MORTALITY RISK IN PATIENTS SUFFERING
FROM INFECTION WITH ORGAN FAILURE

25 **Declaration of priority (Rule 52) and search results under Rule 141(1)**

A declaration of priority is hereby made for the following applications

25.2 Re-establishment of rights

Re-establishment of rights under Article 122 EPC in respect of the priority period is herewith requested for the following priority/priorities

--

25.3 The EPO is requested to retrieve a certified copy of the following previous application(s) (priority document(s)) via the WIPO Digital Access Service (DAS) using the indicated access code(s):

Request	Application number:	Access Code
---------	---------------------	-------------

25.4 This application is a complete translation of the previous application

25.5 It is not intended to file a (further) declaration of priority

26 Reference to a previously filed application

27 Divisional application

28 Article 61(1)(b) application

29 Claims

Number of claims:

29.1 as attached

29.2 as in the previously filed application (see Section 26.2)

29.3 The claims will be filed later

30 Figures

It is proposed that the abstract be published together with figure No.

31 Designation of contracting states

All the contracting states party to the EPC at the time of filing of the European patent application are deemed to be designated (see Article 79(1)).

32 Different applicants for different contracting states

33 Extension/Validation

This application is deemed to be a request to extend the effects of the European patent application and the European patent granted in respect of it to all non-contracting states to the EPC with which extension or validation agreements are in force on the date on which the application is filed. However, the request is deemed withdrawn if the extension fee or the validation fee, whichever is applicable, is not paid within the prescribed time limit.

33.1 It is intended to pay the extension fee(s) for the following state(s):

33.2 It is intended to pay the validation fee(s) for the following state(s):

34 Biological material

38 Nucleotide and amino acid sequences

38.1 The description contains a sequence listing.

38.2a The sequence listing is attached in computer-readable format in accordance with WIPO Standard ST.25 (Rule 30(1)).

38.2b The sequence listing is attached in PDF format

Further indications

39 Additional copies of the documents cited in the European search report are requested

Number of additional sets of copies:

40 Refund of the search fee under Article 9(2) of the Rules relating to Fees is requested

Application number or publication number of earlier search report:

42 Payment

Method of payment

Credit Card

The fees and costs indicated under Fee selection will be paid by credit card within a month after filing.

Currency:

EUR

43 Refunds

Any refunds should be made to EPO deposit account:

28120316

Account holder:

Hoffmann Eitle S.L.U.

Fees

	Factor applied	Fee schedule	Amount to be paid
001 Filing fee - EP direct - online	1	125.00	125.00
002 Fee for a European search - Applications filed on/after 01.07.2005	1	1 350.00	1 350.00
015 Claims fee - For the 16th to the 50th claim	0	245.00	0.00
015e Claims fee - For the 51st and each subsequent claim	0	610.00	0.00
501 Additional filing fee for the 36th and each subsequent page	0	16.00	0.00
Total:		EUR	1 475.00

44-A Forms

Details:

System file name:

A-1

Request

as ep-request.pdf

A-2

1. Designation of inventor

1. Inventor

as f1002-1.pdf

44-B Technical documents

Original file name:

System file name:

B-1

Specification

905 008 Description.pdf
Description

SPECEPO-1.pdf

B-2

Specification

905 008 Claims.pdf

SPECEPO-2.pdf

	14 claims		
B-3	Specification	905 008 Figures.pdf 3 figure(s)	SPECEPO-4.pdf
B-4	Specification	905 008 Abstract.pdf abstract	SPECEPO-3.pdf
B-9	Pre-conversion archive	905 008 Text to file.zip	OLF-ARCHIVE.zip

44-C Other documents

Original file name:

System file name:

45

General authorisation:

46 Signature(s)

Place: **Madrid**

Date: **17 April 2020**

Signed by: **Miguel Martinez 64077**

Association: **HOFFMANN EITLE S.L.U.**

Representative name: **Miguel Martinez**

Capacity: **(Representative)**

Form 1002 - 1: Public inventor(s)

Designation of inventor

User reference: 905 008
Application No:

Public

Inventor	Name: BERMEJO MARTÍN, Mr. Jesús Francisco Company: IECSCYL-IBSAL Address: Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182 37007 Salamanca Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: ALMANSA MORA, Ms. Raquel Company: IECSCYL-IBSAL Address: Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182 37007 Salamanca Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: MARTÍN FERNÁNDEZ, Ms. Marta Company: IECSCYL-IBSAL Address: Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182 37007 Salamanca Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: VAQUERO RONCERO, Mr. Luis Mario Company: IECSCYL-IBSAL Address: Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182 37007 Salamanca Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer

Inventor	Name: ESTEBAN VELASCO, Ms. María del Carmen Company: IECSCYL-IBSAL Address: Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182 37007 Salamanca Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: TAMAYO GÓMEZ, Mr. Eduardo Company: SACYL / UVA Address: Servicio de Anestesiología y Reanimación. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Av. Ramón y Cajal, 3 47003 Valladolid Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer
Inventor	Name: ALDECOA ÁLVAREZ-SANTULLANO, Mr. César Company: IECSCYL-IBSAL Address: Hospital Universitario de Salamanca, Edificio Virgen de la Vega, 10ª pl., Paseo San Vicente 58-182 37007 Salamanca Spain The applicant has acquired the right to the European patent: As employer

Signature(s)

Place: **Madrid**
Date: **17 April 2020**
Signed by: **Miguel Martinez 64077**
Association: **HOFFMANN EITLE S.L.U.**
Representative name: **Miguel Martinez**
Capacity: **(Representative)**

***IN VITRO* METHOD FOR PREDICTING MORTALITY RISK IN PATIENTS
SUFFERING FROM INFECTION WITH ORGAN FAILURE**

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention refers to the medical field. Particularly, the present invention refers to an *in vitro* method for predicting mortality risk, or for selecting patients with a higher mortality risk, among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock.

PRIOR ART

10 Sepsis is defined as organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Nowadays, this condition is one of the main healthcare problems in the intensive care unit (ICU), reaching to 300-480 cases per 100.000 people of incidence and leading the cause of mortality (20-30%) in the intensive care unit of the developed countries. Compared to other diseases, sepsis incidence remains higher than cerebrovascular accident (76-119 per 100.000), acute
15 myocardial infarction (8%) and other pathologies with important social impact, such as breast cancer (25.9-94.2 per 100.000) or AIDS (24 per 100.000). Moreover, sepsis is the first cause of mortality in non-coronary ICUs, reaching the 30-50% of mortality in severe sepsis and 50-60% in septic shock.

It has been reported that the death increased by 20% in sepsis patients for each one-hour increase
20 in door-to-antimicrobial time. Moreover, nowadays there is not an easy, quick and accurate method for predicting mortality risk in patients suffering from infection with organ failure. The gold standard used today for predicting mortality risk in sepsis patients is SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment score). However, this score is used to track a person's status during the stay in an ICU to determine the extent of a person's organ function or rate of
25 failure. This means that SOFA score is not designed to be used in patients during the stay in the hospital floor unit. On the other hand, SOFA is a complex method which is based on six different scores, one each for the respiratory, cardiovascular, hepatic, coagulation, renal and neurological systems.

So, in summary, nowadays, there is an unmet medical need of finding easy, quick and accurate
30 tools for predicting mortality risk in patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock, which can be carried out not only in ICU but also in the hospital floor unit.

The present invention is focused on solving the above-mentioned problems and it is herein provided an *in vitro* method for predicting mortality risk in patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock. According to the present invention, it could be possible to get a rapid and accurate identification of patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock with a high mortality risk, also in the hospital floor unit, that would help the clinicians to provide specific treatments or measures.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 Brief description of the invention

As a first step, 179 surgical patients with infection and organ failure were prospectively recruited in the three participant surgical ICUs. 22 genes encoding granule proteins sequentially expressed by granulocytes paralleling maturation were evaluated for their expression levels in blood. Area under the curve (AUC) and multivariate regression analysis were employed to evaluate the ability of gene expression to predict hospital mortality. Results were validated using the microarray data of 72 patients from a previous study.

It was observed that eleven emergency granulopoiesis genes gave rise to an AUC > 0.7 for predicting mortality risk in patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock (see **Table 1**)

20

Table 1

Gene		AUC for predicting mortality						
Gene name	Gene ID	AUC	[CI 95%]		<i>p</i>	OOP	Se (%)	Sp (%)
BPI	HGNC:1095	0.77	0.68	0.85	< 0.001	598	72.4	72.7
TCN1	HGNC:11652	0.76	0.68	0.84	< 0.001	358	79.3	68.0
CD24	HGNC:1645	0.75	0.68	0.82	< 0.001	342	82.8	64.4
CEACAM8	HGNC:1820	0.74	0.66	0.81	< 0.001	203	86.2	62.7
LCN2	HGNC:6526	0.73	0.65	0.82	< 0.001	3314	82.8	59.1
IL1R2	HGNC:5994	0.72	0.63	0.81	< 0.001	6996	69.0	73.3
LTF	HGNC:6720	0.71	0.62	0.81	< 0.001	1500	75.9	70.0
OLFM4	HGNC:17190	0.71	0.61	0.80	< 0.001	840	72.4	68.7
STOM	HGNC:3383	0.71	0.61	0.80	< 0.001	2688	69.0	65.3
MMP8	HGNC:7175	0.70	0.60	0.80	0.001	2240	79.3	62.0
PRTN3	HGNC:9495	0.70	0.61	0.79	0.001	94.2	62.1	73.3

Table 1. Eleven emergency granulopoiesis genes with an AUC \geq 0.7. HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee).

Moreover, the above cited eleven genes were combined in order to find biomarker signatures with an improved performance. For instance, **Table 2** and **Table 3** show, respectively, combinations of two or three biomarkers comprising TCN1. Most of said combinations of biomarkers are associated with an improved AUC value as compared with the AUC value of TCN1 alone. Moreover, all the AUCs included in **Table 2** and **Table 3** were compared with the AUC of SOFA by using Hanley & McNeil test and the result indicated that there are not statistically significant differences between the AUC of the combination of those genes and the AUC of SOFA (which is 0.84).

Table 2

	AUC	[CI 95%]		<i>p</i>
TCN1 + CEACAM8	0.79	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + IL1R2	0.78	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + MMP8	0.77	0.68	0.85	< 0.001
TCN1 + PRTN3	0.77	0.69	0.86	< 0.001
TCN1 + BPI	0.76	0.67	0.85	< 0.001
TCN1 + CD24	0.76	0.68	0.84	< 0.001
TCN1 + LTF	0.75	0.65	0.85	< 0.001
TCN1 + STOM	0.75	0.66	0.84	< 0.001
TCN1 + LCN2	0.74	0.65	0.84	< 0.001
TCN1 + OLFM4	0.74	0.64	0.84	< 0.001

Table 2. *Combinations of two biomarkers comprising TCN1*

10

Table 3

	AUC	[CI 95%]		<i>p</i>
TCN1 + CEACAM8 + IL1R2	0.81	0.74	0.88	< 0.001
TCN1 + CEACAM8 + MMP8	0.81	0.74	0.88	< 0.001
TCN1 + IL1R2 + PRTN3	0.81	0.74	0.88	< 0.001
TCN1 + BPI + IL1R2	0.80	0.73	0.87	< 0.001
TCN1 + BPI + MMP8	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + BPI + CD24	0.79	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + CD24 + CEACAM8	0.79	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + CD24 + MMP8	0.79	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + CD24 + PRTN3	0.79	0.72	0.87	< 0.001
TCN1 + CEACAM8 + LTF	0.79	0.71	0.87	< 0.001

TCN1 + CEACAM8 + OLFM4	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + CEACAM8 + STOM	0.79	0.72	0.87	< 0.001
TCN1 + CEACAM8 + PRTN3	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + CEACAM8 + LCN2	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + LCN2 + IL1R2	0.79	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + IL1R2 + LTF	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + IL1R2 + OLFM4	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + IL1R2 + MMP8	0.79	0.72	0.87	< 0.001
TCN1 + STOM + PRTN3	0.79	0.71	0.87	< 0.001
TCN1 + MMP8 + PRTN3	0.79	0.72	0.87	< 0.001
TCN1 + BPI + CEACAM8	0.78	0.70	0.86	< 0.001
TCN1 + BPI + PRTN3	0.78	0.70	0.87	< 0.001
TCN1 + CD24 + IL1R2	0.78	0.71	0.86	< 0.001
TCN1 + LCN2 + PRTN3	0.78	0.70	0.86	< 0.001
TCN1 + LTF + MMP8	0.78	0.69	0.87	< 0.001
TCN1 + LTF + PRTN3	0.78	0.69	0.86	< 0.001
TCN1 + OLFM4 + PRTN3	0.78	0.69	0.87	< 0.001
TCN1 + BPI + LTF	0.77	0.68	0.85	< 0.001
TCN1 + BPI + OLFM4	0.77	0.68	0.86	< 0.001
TCN1 + BPI + STOM	0.77	0.69	0.86	< 0.001
TCN1 + BPI + LCN2	0.77	0.68	0.85	< 0.001
TCN1 + CD24 + LTF	0.77	0.69	0.86	< 0.001
TCN1 + CD24 + OLFM4	0.77	0.69	0.86	< 0.001
TCN1 + CD24 + LCN2	0.77	0.69	0.85	< 0.001
TCN1 + IL1R2 + STOM	0.77	0.69	0.85	< 0.001
TCN1 + OLFM4 + MMP8	0.77	0.68	0.86	< 0.001
TCN1 + STOM + MMP8	0.77	0.68	0.85	< 0.001
TCN1 + CD24 + STOM	0.76	0.67	0.85	< 0.001
TCN1 + LCN2 + STOM	0.76	0.67	0.85	< 0.001
TCN1 + LCN2 + MMP8	0.76	0.68	0.85	< 0.001
TCN1 + LTF + STOM	0.76	0.67	0.85	< 0.001
TCN1 + OLFM4 + STOM	0.76	0.66	0.85	< 0.001
TCN1 + LCN2 + LTF	0.75	0.66	0.85	< 0.001
TCN1 + LCN2 + OLFM4	0.75	0.65	0.85	< 0.001
TCN1 + LTF + OLFM4	0.75	0.65	0.85	< 0.001

Table 3. *Combinations of three biomarkers comprising TCN1*

In a further stage, the expression levels of the eleven genes included in **Table 1** [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3] were combined in the form of an additive score (Emergency Granulopoiesis Gene Expression score, EGEX). EGEX AUC to predict mortality was similar to that showed by the SOFA score (AUC [CI95%]: EGEX = 0.82 [0.75 – 0.88]; SOFA = 0.84 [0.78 – 0.90]). Multivariate analysis evidenced that EGEX was an independent predictor of mortality. Those patients with > 8 points in the EGEX score presented a four-fold increase in their risk of mortality. EGEX score in the microarray study predicted mortality with an AUC of 0.76 [0.64 – 0.87], the same to that yielded by the SOFA score.

So, in summary, the present invention shows that there is a direct relationship between the magnitude of emergency granulopoiesis and prognosis during severe infection and demonstrates that the overexpression of the above cited genes denoting emergency granulopoiesis, summarised by a combined score (EGEX), allows to predict mortality with a similar accuracy to that of SOFA, a finding that was confirmed retrospectively by using microarray data from our previous EXPRESS study.

A major strength of the present invention is that patients with infection, sepsis and septic shock were included to cover the full spectrum of organ failure degree caused by an infection. Profiling EGEX could help to estimate the mortality risk of a surgical patient with infection in an objective and easy manner, avoiding the necessity to collect the information of the six items of the SOFA score.

Consequently, the detection of the overexpression of the above cited genes contained in the EGEX score by using ddPCR could help to early identify those infected patients deserving intensive care. EGEX score could also represent a prognostic enrichment tool to selectively recruit the most severe individuals in those trials testing drugs for improving prognosis of patients with infection or sepsis.

In conclusion, the present invention is an improved alternative to the existing methods (mainly SOFA score) used today, because the present invention can be easily implemented by measuring the level of expression of the genes described above, by using known techniques like PCR, it can be carried out not only in ICU but also in the hospital floor unit, and offers an AUC value similar to the gold standard SOFA score.

So, the first embodiment of the present invention refers to an *in vitro* method for predicting mortality risk among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock which comprises: a) Determining in a biological sample obtained from the patient the level of

expression of at least TCN1, and b) wherein a variation or deviation (preferably an overexpression) of the level of expression measured in step a) is identified, with respect to the reference level of expression determined in control survivor patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock, is an indication of mortality risk.

- 5 The second embodiment of the present invention refers to an *in vitro* method for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock (i.e. prognosis enrichment) which comprises: a) Determining in a biological sample obtained from the patient the level of expression of at least TCN1, and b) wherein a variation or deviation (preferably an overexpression) of the level of expression measured in step a) is identified, with respect to the reference level of expression determined in control survivor patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock, is an indication of mortality risk.
- 10

Such as it is indicated in the first and second embodiments of the present invention, the gene TCN1 has been selected as the main biomarker because it offers a good individual AUC value (see **Table 1**) and also it is able to improve the AUC value when it is combined with other biomarkers, such as it can be seen in **Tables 2** and **3**. In any case, although TCN1 is herein defined as a preferred biomarker, any of the biomarkers included in **Table 1**, or any combination thereof, could be used in the context of the present invention, for example the following combinations associated with an $AUC \geq 0.77$ for predicting mortality risk in patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock: [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8], [TCN1 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 + CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF], [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2], [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF], [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 + CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 + STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8], [TCN1 + STOM + MMP8], or even the following combination of eleven biomarkers: [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3].

15

20

25

30

So, in a preferred embodiment of the invention, the step a) of the above defined methods comprises determining the level of expression of: [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8], [TCN1 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 + CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF], [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2], [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF], [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 + CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 + STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8], [TCN1 + STOM + MMP8], or even of the following combination of eleven biomarkers: [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3].

In a preferred embodiment of the invention, the above cited methods comprise a) Determining the level of expression of any of the combinations of biomarkers included in the present invention, in a biological sample obtained from the patient, b) processing the expression level values in order to obtain a risk score and c) wherein if a deviation or variation of the risk score value obtained for any of the above cited combinations of biomarkers is identified, as compared with a reference value, this is indicative of mortality risk.

In a preferred embodiment of the invention, the method is performed within 24 hours from the patient admission.

In a preferred embodiment of the invention, the biological sample is whole blood, serum or plasma.

In a preferred embodiment the above cited genes are overexpressed as compared with the controls.

The third embodiment of the present invention refers to the *in vitro* use of TCN1, [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8], [TCN1 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 +

CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF], [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2],
 5 [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF] , [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 + CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 + STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8], [TCN1 + STOM + MMP8], or even of the following combination of eleven biomarkers: [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 +
 10 LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3] for predicting mortality risk among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock or for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock.

The fourth embodiment of the present invention refers to a kit adapted for predicting mortality
 15 risk among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock or for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock which comprises: a) Tools or media for obtaining a whole blood, serum or plasma sample from the patient, and b) Tools or media for measuring the expression level of TCN1, [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8], [TCN1 + PRTN3],
 20 [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 + CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF],
 25 [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2], [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF] , [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 + CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 + STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8], [TCN1 + STOM + MMP8], or
 30 even of the following combination of eleven biomarkers: [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3].

The fifth embodiment of the present invention refers to a method for treating or for deciding the next steps or measures to be taken with a patient suffering from infection with organ failure,

sepsis or septic shock and having a high mortality risk (for instance recruiting those individuals in trials testing drugs for improving prognosis of patients with infection or sepsis), which comprises a previous or initial step wherein the patient is diagnosed or identified using the above cited methods of the invention.

5 For the purpose of the present invention the following terms are defined:

- The expression “infection with organ failure” refers to the situation where the patient has been invaded by disease-causing agents (pathogens) causing an organ dysfunction. Precisely, “infection with organ failure” refers to the situation where there is a documented or suspected infection and 1 point is scored on SOFA scale.
- 10 • The expression “sepsis” refers to a life-threatening condition that arises when the body's response to infection causes injury to its tissues and organs. Precisely, according to the “Sepsis-3” criteria, “sepsis” refers to the situation where there is a documented or suspected infection in the presence of multiorgan failure, defined as an acute increase of 2 or more points on the SOFA scale, assuming a score of 0 in those patients where the
15 previous existence of organ failure is not known.
- The term “septic shock” is a potentially fatal medical condition that occurs when sepsis, which is organ injury or damage in response to infection, leads to dangerously low blood pressure and abnormalities in cellular metabolism. Precisely, according to the “Sepsis-3” criteria, “septic shock” refers to the situation where there is sepsis associated with
20 persistent hypotension that requires the use of vasopressors to maintain a MAP (Mean Arterial Pressure) > 65 mmHg and the presence of lactate > 2 mmol/L, despite performing correct fluid therapy.
- The expression “reference level of expression determined in control survivor patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock”, refer to a “reference
25 value” of the concentration level of the biomarkers. If the level of expression of the biomarkers measured in patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock is higher or lower, preferably higher, as compared with said “reference value”, this is an indication of mortality risk.
- A “reference value” can be a threshold value or a cut-off value. Typically, a "threshold
30 value" or "cut-off value" can be determined experimentally, empirically, or theoretically. A threshold value can also be arbitrarily selected based upon the existing experimental and/or clinical conditions, as would be recognized by a person of ordinary skilled in the art. The threshold value has to be determined in order to obtain the optimal sensitivity and specificity according to the function of the test and the benefit/risk balance (clinical

consequences of false positive and false negative). Preferably, the person skilled in the art may compare the biomarker levels (or scores) obtained according to the method of the invention with a defined threshold value. Typically, the optimal sensitivity and specificity (and so the threshold value) can be determined using a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve based on experimental data. For example, after determining the levels of the biomarkers in a group of reference, one can use algorithmic analysis for the statistic treatment of the measured concentrations of biomarkers in biological samples to be tested, and thus obtain a classification standard having significance for sample classification. The full name of ROC curve is receiver operator characteristic curve, which is also known as receiver operation characteristic curve. It is mainly used for clinical biochemical diagnostic tests. ROC curve is a comprehensive indicator that reflects the continuous variables of true positive rate (sensitivity) and false positive rate (1-specificity). It reveals the relationship between sensitivity and specificity with the image composition method. A series of different cut-off values (thresholds or critical values, boundary values between normal and abnormal results of diagnostic test) are set as continuous variables to calculate a series of sensitivity and specificity values. Then sensitivity is used as the vertical coordinate and specificity is used as the horizontal coordinate to draw a curve. The higher the area under the curve (AUC), the higher the accuracy of diagnosis. On the ROC curve, the point closest to the far upper left of the coordinate diagram is a critical point having both high sensitivity and high specificity values. The AUC value of the ROC curve is between 1.0 and 0.5. When $AUC > 0.5$, the diagnostic result gets better and better as AUC approaches 1. When AUC is between 0.5 and 0.7, the accuracy is low. When AUC is between 0.7 and 0.9, the accuracy is good. When AUC is higher than 0.9, the accuracy is quite high. This algorithmic method is preferably done with a computer. Existing software or systems in the art may be used for the drawing of the ROC curve, such as: MedCalc 9.2.0.1 medical statistical software, SPSS 19.0.

- The term “mortality risk” refers to the estimation of the likelihood of in-hospital death for a patient. According to the present invention, mortality risk exists when the expression levels of the biomarkers are higher or lower (i.e. there is a variation or deviation), preferably higher, as compared with said “reference value”.
- By "comprising" is meant including, but it is not limited to, whatever follows the word "comprising". Thus, use of the term "comprising" indicates that the listed elements are required or mandatory, but that other elements are optional and may or may not be present.

- By "consisting of" is meant "including, and limited to", whatever follows the phrase "consisting of". Thus, the phrase "consisting of" indicates that the listed elements are required or mandatory, and that no other elements may be present.

5 Description of the figures

Figure 1. AUC analysis for evaluating the accuracy of the EGEX score [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3] to predict hospital mortality in comparison with that of the SOFA score (derivation cohort). EGEX was built based on gene expression results obtained by ddPCR. Hanley and McNeil test was employed to identify significant differences between both AUCs.

Figure 2. Expression levels of the EGEX score [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3] and of the eleven genes composing it. c/ng: copies of cDNA per nanogram of initial mRNA analyzed; Ln: napierian logarithm.

Figure 3. AUC analysis for evaluating the accuracy of the EGEX score [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3] to predict hospital mortality in comparison with that of the SOFA score (validation cohort). EGEX was built based on gene expression results obtained by microarrays. Hanley and McNeil test was employed to identify significant differences between both AUCs.

20 Detailed description of the invention

Example 1. Materials and Methods

Example 1.1. Patients and controls

179 surgical patients with infection and organ failure were prospectively recruited in the surgical ICUs of the three participant hospitals from January 2017 to January 2019. Presence of infection was defined following the CDC/NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infections. Presence of organ failure was assessed by using the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score. Sepsis and septic shock were defined using the SEPSIS-3 consensus. A specific standard survey was employed in the participant hospitals to collect the clinical data, including medical history, physical examination and hematological, biochemical, radiological, microbiological investigations. 16 healthy controls of similar age and sex characteristics of the cases were recruited from the Center of Hemodonation and Hemotherapy of Castilla y León

(CHEMCYL, Valladolid, Spain). A validation cohort composed by 72 patients was used to retrospectively validate the results for the EGEX for predicting mortality.

The study was approved by the respective Committees for Ethics in Clinical Research of the three participating hospitals (Hospital Clínico Universitario de Valladolid, CE-HCUV), (Hospital 5 Universitario Río Hortega de Valladolid, CE-HURH), and (Hospital Clínico Universitario de Salamanca, CE-CAUSA). Methods were carried out in accordance with current Spanish law for Biomedical Research (2007) and fulfill the standards indicated by the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the patients' relatives or their legal representative before enrolment.

10 Standard cultures in biological samples guided by the presumptive source of the infection were performed to assess the presence of bacterial and fungal infection. Potentially contaminant microorganisms were not considered.

Example 2. Quantification of emergency granulopoiesis gene expression levels

15 22 genes encoding granule proteins which are sequentially expressed in the bone marrow by granulocytes paralleling maturation were evaluated for their expression levels in blood. Genes were selected based on the results of our EXPRESS (Gene Expression in Sepsis) microarray study [Almansa R, Heredia-Rodríguez M, Gomez-Sanchez E, Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Rico L, Ortega A, Gomez-Pesquera E, Liu P, Aragón M, Eiros JM, Jiménez-Sousa MÁ, Resino S, 20 Gómez-Herreras I, Bermejo-Martín JF, Tamayo E: *Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. J Infect* 2015; 70:445–56], which compared gene expression profiles of surgical patients with and without sepsis (microarray data from this study are available at the Array Express microarray data repository with code E-MTAB-1548). A sample of 2.5 mL of blood was collected by using PaxGene (BD) venous blood vacuum collection tubes in the first 12 hours 25 following emergence of organ failure. Blood from healthy individuals was collected at the moment of donation. Total RNA was extracted from blood samples using the PAXgene Blood RNA System (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland). The evaluation of concentration and quality was performed by spectrometry (Nano-Drop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). cDNA was generated from each sample on a Techne TC-512 30 thermal cycler (Bibby-Scientific, Staffordshire, OSA, UK) starting from 1000 ng of mRNA by using iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (BioRad, cat:1725038). The obtained volume of cDNA (20 uL) was further diluted (1/25), and 2.5 uL (5 ng of total mRNA) were employed for quantification of target gene expression using ddPCR on a BioRad QX200 platform (California, USA), according to the manufacturer instructions. Expression of the genes selected for the study

was quantified using predesigned TaqMan Assay Primer/Probe Sets, (FAM or VIC labelled MGB probes, Thermo Fisher/Scientific-Life Technologies, Waltham, MA): Matrix metalloproteinase 8 (MMP8): Hs01029057_m1; Lactotransferrin (LTF): Hs00914334_m1; Proteinase 3 (PRTN3):Hs01597752_m1; lipocalin 2/ neutrophil gelatinase associated lipocalin (LCN2/NGAL): Hs01008571_m1; Olfactomedin 4 (OLFM4): Hs00197437_m1; Elastase (ELANE): Hs00236952_m1; Myeloperoxidase (MPO): Hs00924296_m1; cathepsin G (CTSG): Hs00175195_m1; azurocidin 1 (AZU1): Hs00156049_m1; defensin alpha 4 (DEFA4): Hs00157252_m1; Bactericidal / permeability-increasing protein (BPI): Hs01552756_m1; Interleukin 18 Receptor 1 (IL18R1): Hs00977691_m1; Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 8 (CEACAM8): Hs00266198_m1; Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6): Hs03645554_m1; Small Cell Lung Carcinoma Cluster 4 Antigen (CD24): Hs02379687_s1; transcobalamin 1 (TCN1): Hs01055542_m1; Stomatin (STOM): Hs00925242_m1; Interleukin 1 Receptor Type 2 (IL1R2): Hs00174759_m1; Cluster of Differentiation molecule 177 molecule (CD177): Hs00360669_m1; chitinase 1 (CHIT1): Hs00185753_m1; matrix metalloproteinase 9 (MMP9): Hs00957562_m1; matrix metalloproteinase 25 (MMP25): Hs00360861_m1. Briefly, ddPCR was performed using ddPCR Supermix for Probes (no dUTP), and BioRad standard reagents for droplet generation and reading. End-point PCR with 40 cycles was performed by using C1000Touch Thermal Cycler (BioRad) after splitting each sample into approximately 20,000 droplets. Next, the droplet reader used at least 10,000 droplets to determine the percentage of positive droplets and calculation of copy number of cDNA per nanogram of initial mRNA.

Example 3. Statistical analysis

For the demographic and clinical characteristics of the patients, differences between groups were assessed using the Chi-square test for categorical variables and the Mann–Whitney U test for continuous variables when appropriate. The accuracy of each gene of emergency granulopoiesis for predicting hospital mortality was evaluated by calculating the area under the curve (AUC). Those genes yielding an $AUC \geq 0.7$ to predict mortality risk were selected to form an additive score (emergency granulopoiesis gene expression score: EGEX). To build EGEX, the optimal operating point (OOP) in the AUC analysis was identified. EGEX assigned one additional point for each one of the genes which expression levels were above the OOP. We employed the Hanley and McNeil test to compare the AUC obtained with EGEX to predict mortality with that obtained with the SOFA score. The ability of EGEX as independent predictor of mortality was confirmed by using a multivariate logistic regression analysis. Those potential confounding

factors which yielded p -values < 0.1 in the univariate analyses were introduced as adjusting variables in the multivariate analysis. Finally, results from our previous EXPRESS study (Arrays Express code E-MTAB-1548) were employed to retrospectively validate the accuracy of EGEX to predict hospital mortality, using an AUC analysis and the Hanley and McNeil test to compare it against the predictive ability of the SOFA score.

Example 2. Results.

Example 2.1. Clinical characteristics of the patients

SOFA ranged from 1 to 14 with a mean of 6 (SD=3.6). Survivors were younger than the non-survivor's group. Patients of both groups were similar in terms of sex composition, surgery type, source of infection and microbiological findings. The profile of comorbidities was also similar between both groups, with the exception of the diabetes mellitus, which was more frequently present in non-survivors. Prevalence of septic shock was higher in those patients who died. As expected, non-survivors showed a higher degree of organ failure as assessed by the SOFA score and they stayed longer at the ICU. Coagulation alterations were more patent in non-survivors, who had prolonged INR and lower platelet counts. In turn, lymphocyte and monocyte counts were lower in patients who did not survive.

Example 2.2. Gene expression levels across groups

The expression levels of emergency granulopoiesis genes were higher in non-survivors compared with survivors, with the exception of those corresponding to DEFA4, MMP9, MMP25. In turn, gene expression levels in both groups were higher than those showed by the healthy controls.

Example 2.3. Gene expression levels for predicting mortality

AUC analysis selected eleven genes to form the EGEX score for prediction of hospital mortality (Table 1). As evidenced by a further analysis, EGEX AUC to predict mortality was similar to that showed by the SOFA score, as evidenced by the absence of differences in the Hanley and McNeil test (Figure 1). Expression levels of the eleven genes forming the EGEX score in healthy controls, survivors and non-survivors are showed in Figure 2. Results from the multivariate analysis evidenced that EGEX was an independent factor for predicting mortality risk in patients with infection and organ failure. The OOP for EGEX in the AUC was 8 points. Those patients with > 8 points in the EGEX score presented a four-fold increase in their risk of mortality (Table 4).

Table 4

	Multivariate analysis				Multivariate analysis for the OOP			
	OR	[CI 95%]		<i>p</i>	OR	[CI95%]		<i>p</i>
Age	1.06	0.99	1.13	0.104	1.05	0.98	1.11	0.170
Diabetes mellitus	2.18	0.68	6.94	0.190	2.32	0.72	7.50	0.159
Abdominal surgery	1.94	0.51	7.38	0.334	1.83	0.48	7.05	0.378
Vascular surgery	4.28	0.27	66.93	0.300	4.19	0.25	70.59	0.320
Respiratory source of infection	3.25	0.84	12.59	0.088	3.45	0.88	13.54	0.076
PCT (ng/mL) Ln	1.34	0.95	1.90	0.098	1.38	0.97	1.96	0.076
SOFA score	1.25	0.99	1.60	0.066	1.23	0.96	1.57	0.098
Septic Shock	2.31	0.63	8.42	0.205	2.66	0.73	9.70	0.139
EGEX	1.22	1.03	1.44	0.022	-	-	-	-
EGEX OOP (>8)	-	-	-	-	4.02	1.27	12.7	0.018

Table 4. Multivariate analysis for evaluating mortality risk. Ln: napierian logarithm; OOP: Optimal Operating Point.

5 Example 2.4. Validation of the results using microarray data

Expression levels of those genes forming EGEX were employed to build the same score using the results from our previous microarray study (the EXPRESS study). Data from 72 patients with infection and organ failure were analyzed for this purpose. As evidenced by using ddPCR, microarray data showed also that the EGEX score predicted hospital mortality with similar accuracy to that of SOFA score (**Figure 3**).

CLAIMS

1. *In vitro* method for predicting mortality risk among patients suffering from infection with organ failure which comprises:
 - a. Determining in a biological sample obtained from the patient the level of expression of at least TCN1, and
 - b. Wherein a variation or deviation of the level of expression measured in step a) is identified, with respect to the level of expression determined in control survivor patients suffering from infection with organ failure, is an indication of mortality risk.
2. *In vitro* method for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from infection with organ failure which comprises:
 - a. Determining in a biological sample obtained from the patient the level of expression of at least TCN1, and
 - b. Wherein a variation or deviation of the level of expression measured in step a) is identified, with respect to the level of expression determined in control survivor patients suffering from infection with organ failure, is an indication of mortality risk.
3. *In vitro* method, according to any of the previous claims, wherein the patients are suffering from sepsis or septic shock.
4. *In vitro* method, according to any of the previous claims, wherein the step a) comprises determining the level of expression of [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8] or [TCN1 + PRTN3].
5. *In vitro* method, according to any of the previous claims, wherein the step a) comprises determining the level of expression of [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 + CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF], [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2], [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF], [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 +

CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 + STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8] or [TCN1 + STOM + MMP8].

6. *In vitro* method, according to any of the previous claims, wherein the step a) comprises determining the level of expression of [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3].
7. *In vitro* method, according to any of the previous claims, which comprises a) Determining the level of expression of any of the combinations of biomarkers of claims 4 to 6, in a biological sample obtained from the patient, b) processing the expression level values in order to obtain a risk score and c) wherein if a deviation or variation of the risk score value obtained for any of the above cited combinations of biomarkers is identified, as compared with a reference value, this is indicative of mortality risk.
8. *In vitro* method, according to any of the previous claims, wherein the method is performed within 24 hours from the patient admission.
9. *In vitro* method, according to any of the previous claims, wherein the biological sample is whole blood, serum or plasma.
10. *In vitro* use of TCN1 for predicting mortality risk among patients suffering from infection with organ failure or for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from infection with organ failure.
11. *In vitro* use of TCN1, according to claim 10, for predicting mortality risk among patients suffering from sepsis or septic shock, or for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from sepsis or septic shock.
12. *In vitro* use, according to any of the claims 10 or 11, of [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8], [TCN1 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 + CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF], [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2], [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF], [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 + CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 +

STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8], [TCN1 + STOM + MMP8], or [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3].

13. Kit adapted for predicting mortality risk among patients suffering from infection with organ failure or for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from infection with organ failure which comprises:

a. Tools or media for obtaining a whole blood, serum or plasma sample from the patient, and

b. Tools or media for measuring the expression level of TCN1, [TCN1 + CEACAM8], [TCN1 + IL1R2], [TCN1 + MMP8], [TCN1 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + IL1R2], [TCN1 + CEACAM8 + MMP8], [TCN1 + IL1R2 + PRTN3], [TCN1 + BPI + IL1R2], [TCN1 + BPI + MMP8], [TCN1 + BPI + CD24], [TCN1 + CD24 + CEACAM8], [TCN1 + CD24 + MMP8], [TCN1 + CD24 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LTF], [TCN1 + CEACAM8 + OLFM4], [TCN1 + CEACAM8 + STOM], [TCN1 + CEACAM8 + PRTN3], [TCN1 + CEACAM8 + LCN2], [TCN1 + LCN2 + IL1R2], [TCN1 + IL1R2 + LTF], [TCN1 + IL1R2 + OLFM4], [TCN1 + IL1R2 + MMP8], [TCN1 + STOM + PRTN3], [TCN1 + MMP8 + PRTN3], [TCN1 + BPI + CEACAM8], [TCN1 + BPI + PRTN3], [TCN1 + CD24 + IL1R2], [TCN1 + LCN2 + PRTN3], [TCN1 + LTF + MMP8], [TCN1 + LTF + PRTN3], [TCN1 + OLFM4 + PRTN3], [TCN1 + BPI + LTF], [TCN1 + BPI + OLFM4], [TCN1 + BPI + STOM], [TCN1 + BPI + LCN2], [TCN1 + CD24 + LTF], [TCN1 + CD24 + OLFM4], [TCN1 + CD24 + LCN2], [TCN1 + IL1R2 + STOM], [TCN1 + OLFM4 + MMP8], [TCN1 + STOM + MMP8], or [TCN1 + BPI + CD24 + CEACAM8 + LCN2 + IL1R2 + LTF + OLFM4 + STOM + MMP8 + PRTN3].

14. Kit, according to claim 13, adapted for predicting mortality risk among patients suffering from sepsis or septic shock, or for selecting patients with a higher mortality risk among patients suffering from sepsis or septic shock.

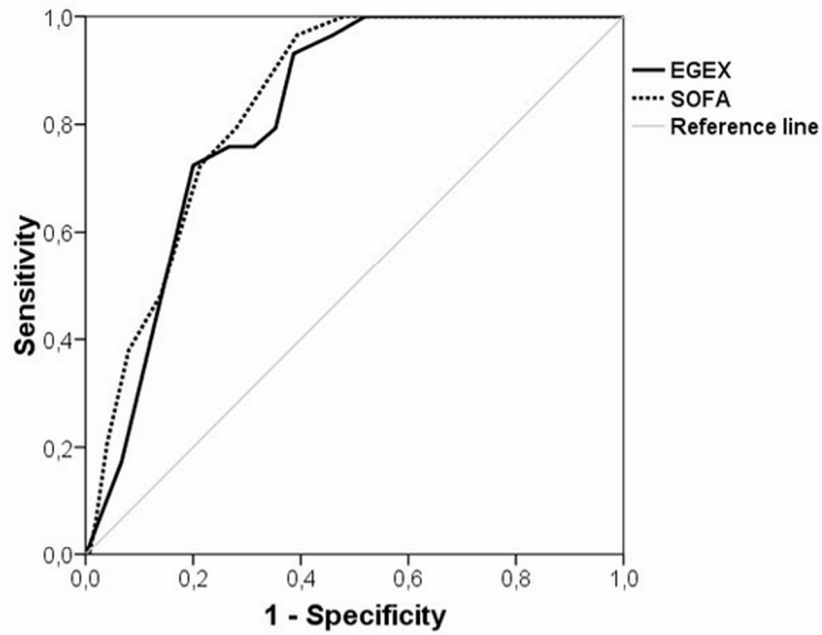
ABSTRACT***IN VITRO* METHOD FOR PREDICTING MORTALITY RISK IN PATIENTS
SUFFERING FROM INFECTION WITH ORGAN FAILURE**

5

In vitro method for predicting mortality risk in patients suffering from infection with organ failure. The present invention refers to an *in vitro* method for predicting mortality risk, or for selecting patients with a higher mortality risk, among patients suffering from infection with organ failure, sepsis or septic shock.

FIGURES

Figure 1



	AUC	[CI 95%]	<i>p</i>	Hanley & McNeil Test
EGEX	0.82	0.75 0.88	< 0.001	n.s.
SOFA score	0.84	0.78 0.90	< 0.001	

Figure 2

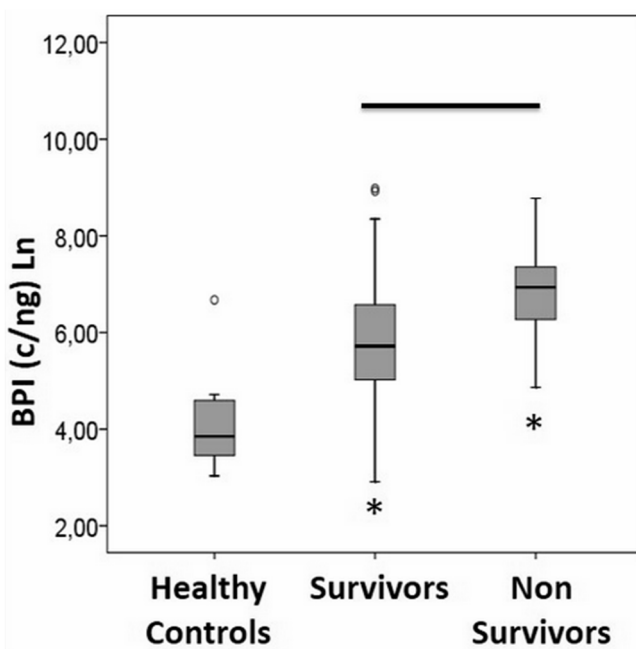


Figure 2 (Cont.)

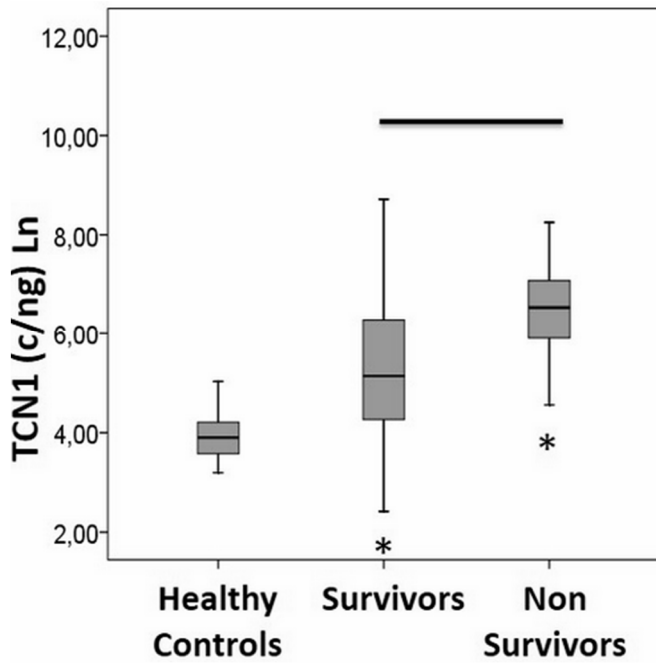
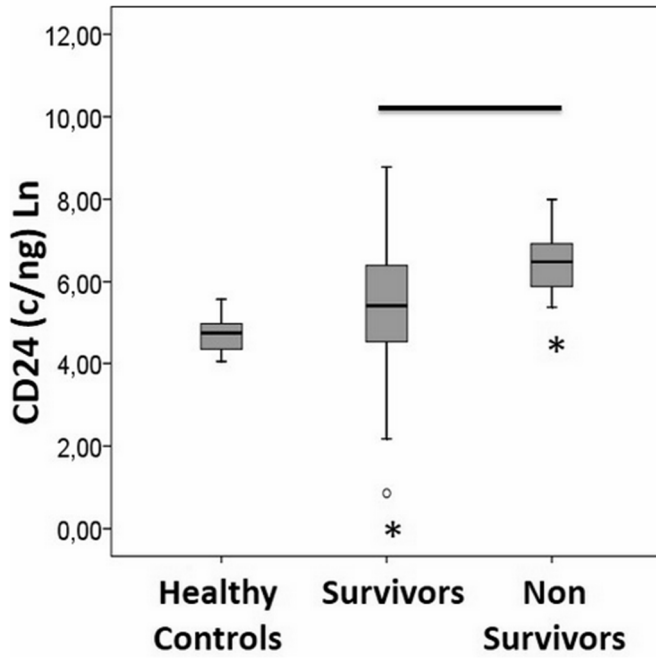


Figure 2 (Cont.)

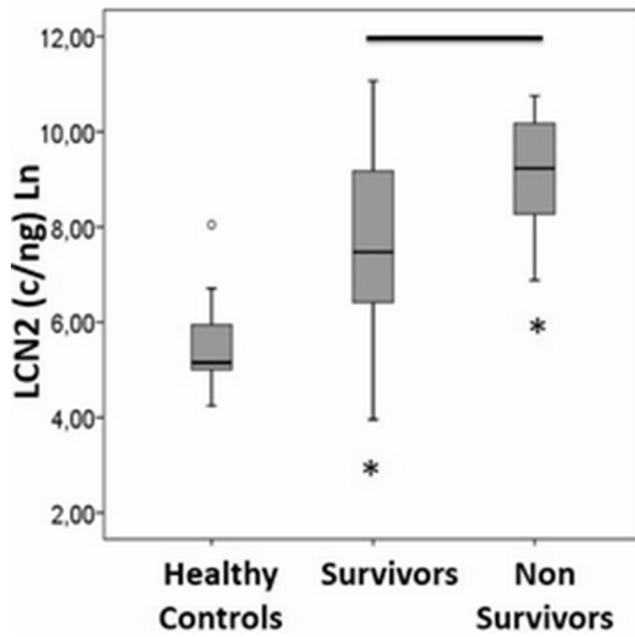
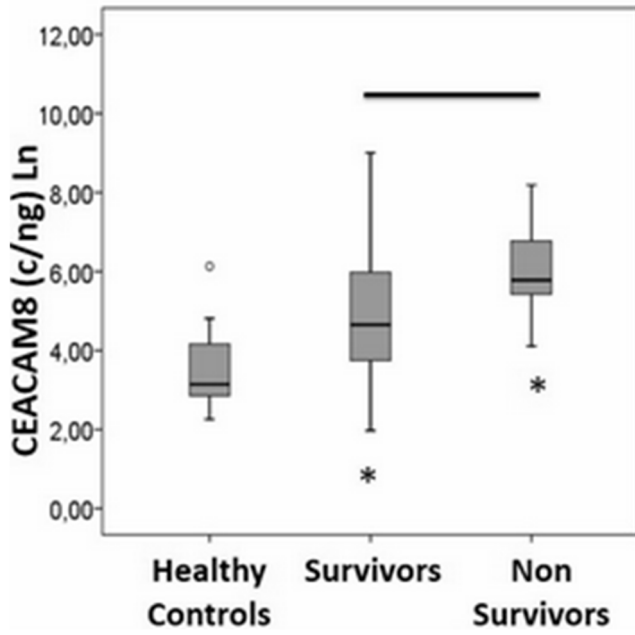


Figure 2 (Cont.)

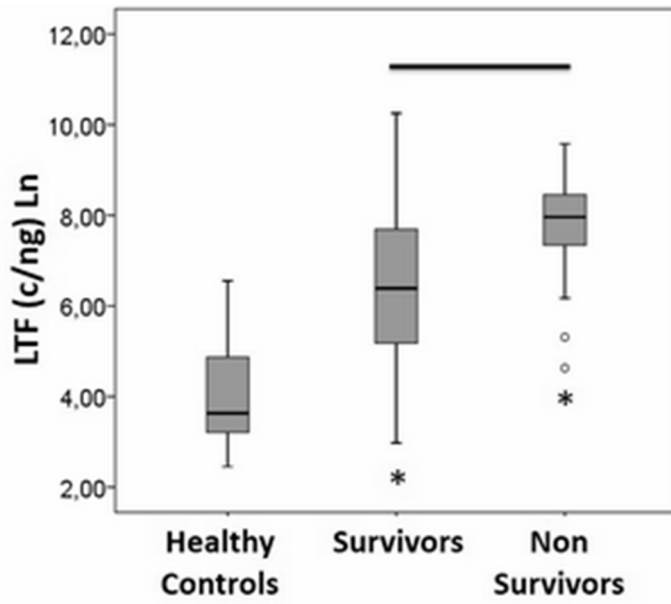
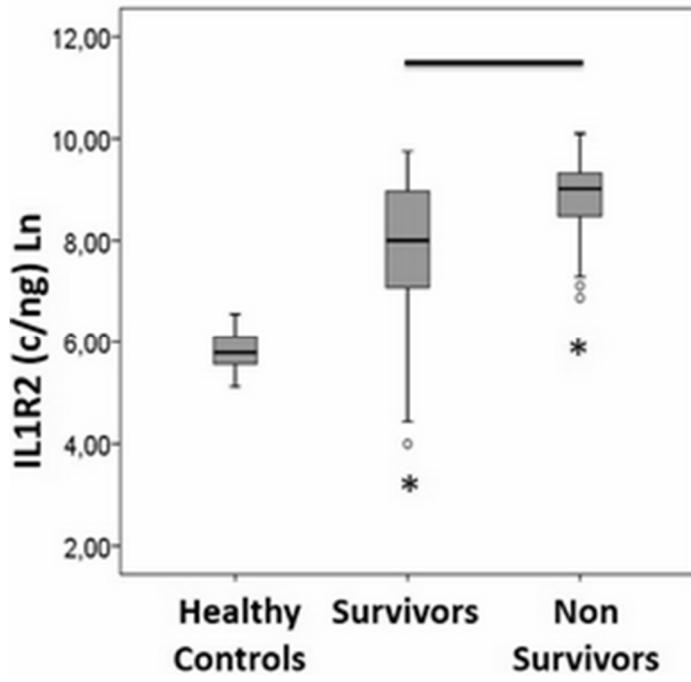


Figure 2 (Cont.)

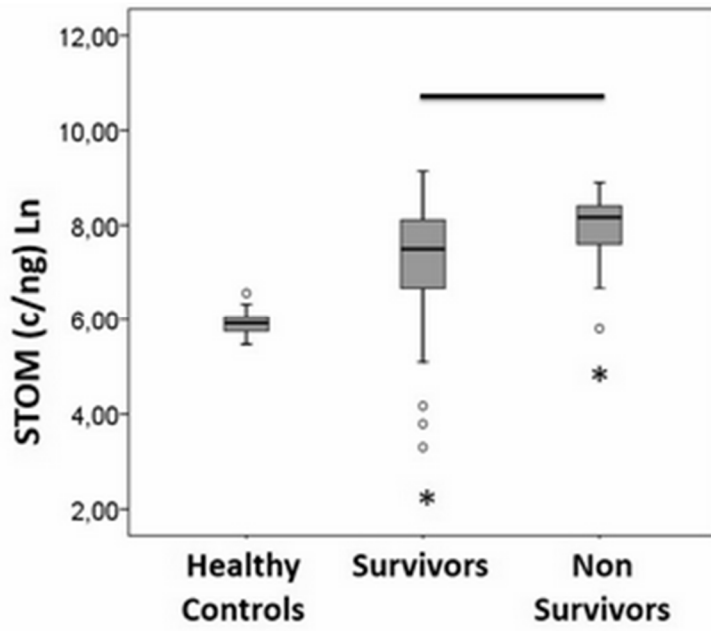
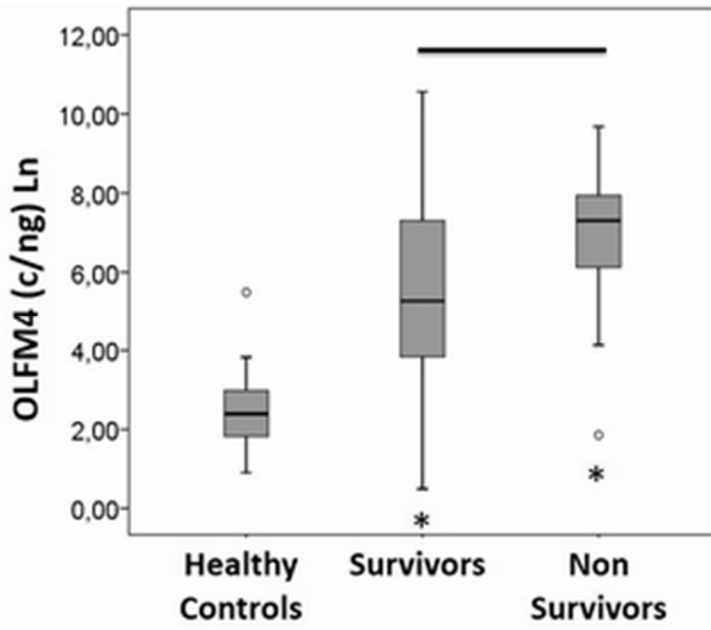


Figure 2 (Cont.)

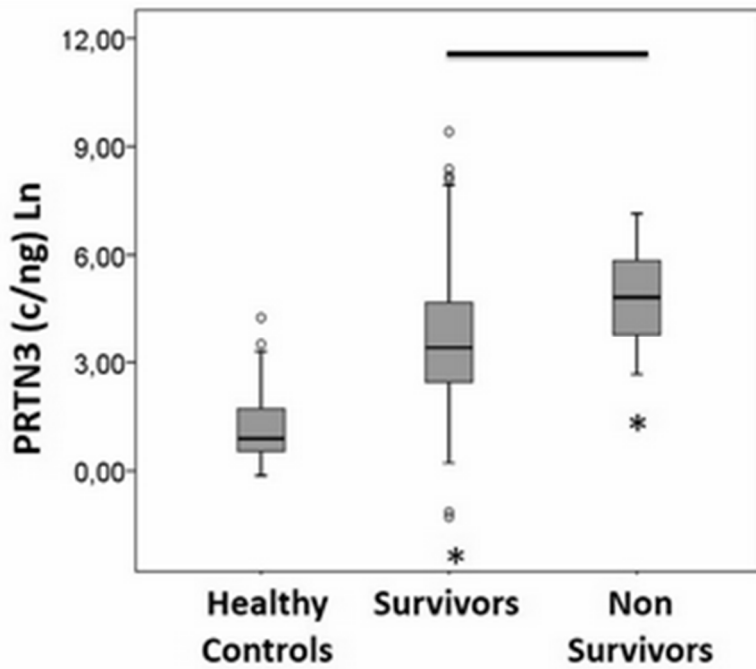
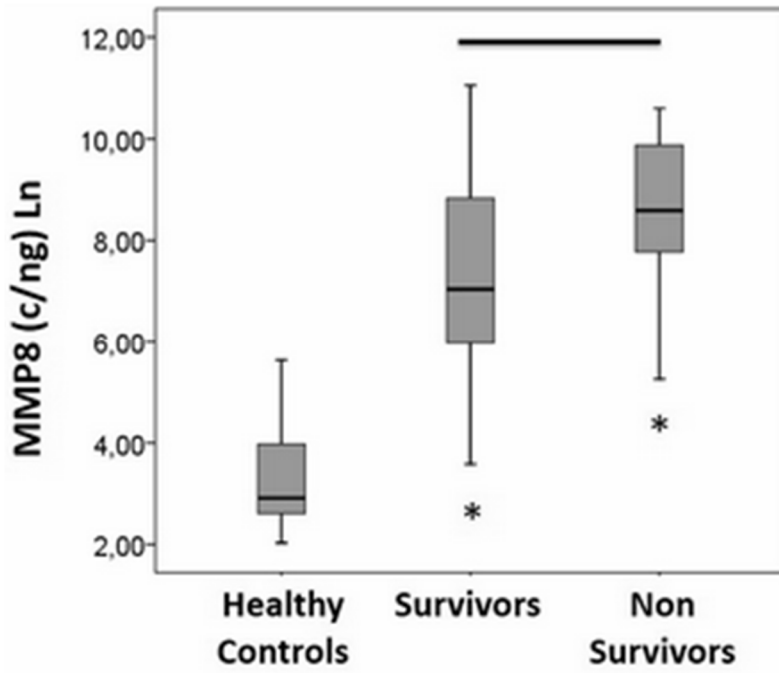


Figure 2 (Cont.)

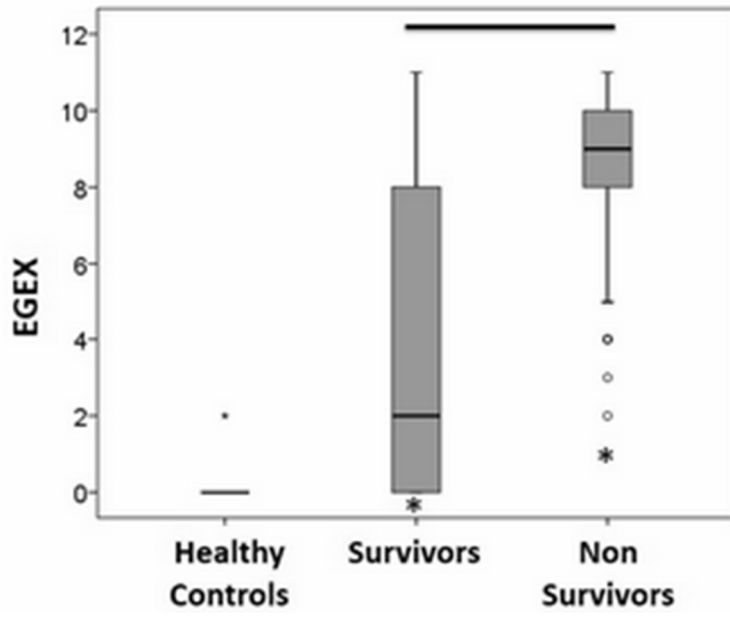
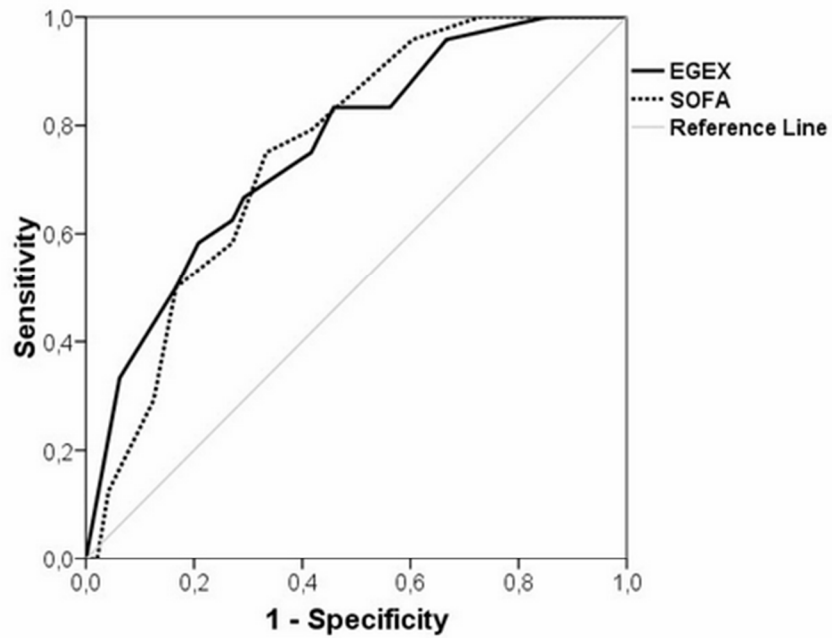


Figure 3



	AUC	[CI 95%]		p	Hanley & McNeil Test
EGEX	0.76	0.64	0.87	< 0.001	n.s.
SOFA score	0.76	0.64	0.87	< 0.001	



Universidad de Valladolid

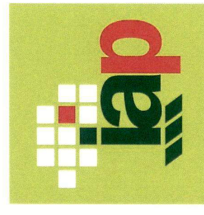
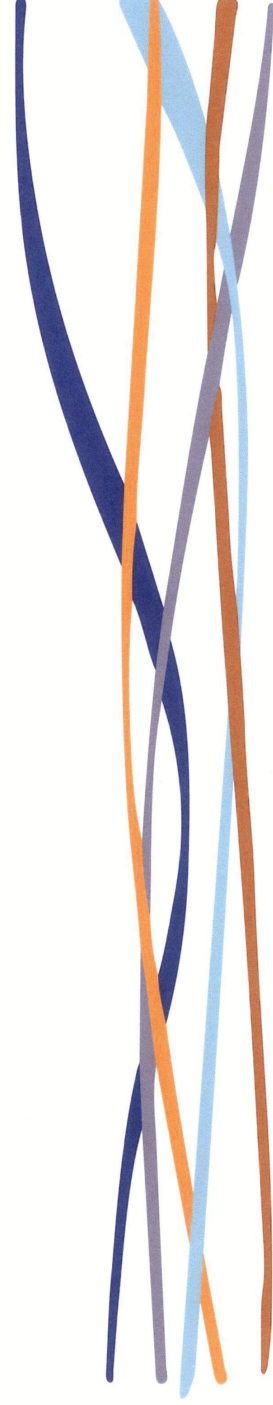


Escuela de Doctorado Universidad de Valladolid

PREMIO DEL PÚBLICO

III Edición Three Minute Thesis (3MT®) EsDUVa

Palencia, 5 de noviembre de 2019



Las luces que acorralan a la sepsis

E. LERA | 17 de mayo de 2020



Marta Martín, investigadora predoctoral del grupo BioSepsis del IBSAL-Hospital Universitario Río Hortega.- EL MUNDO

Una investigadora predoctoral del Río Hortega trabaja para detectar qué biomarcadores en sangre se elevan durante los diferentes estadios de la

enfermedad y cuáles podrían predecir su pronóstico

Los griegos ya buscaban la manera de arrojar luz sobre una infección que complica el sistema inmune del paciente al no ser capaz de montar una respuesta adecuada, provocando un fallo de múltiples órganos y sistemas del organismo, lo que conlleva en muchas ocasiones la muerte. **La sepsis es una enfermedad** que cuanto más tiempo pasa en la persona sin el correspondiente tratamiento, mayor es la probabilidad de fallecimiento. Por este motivo, el diagnóstico precoz es fundamental.

Y es que no tiene un síntoma guía como ocurre en otras patologías. ¿Qué significa? Por ejemplo, si ahora mismo cualquiera presencia que una persona tiene un dolor en el pecho que irradia al brazo izquierdo, automáticamente piensa en que puede ser un infarto; eso es un síntoma guía. En la sepsis no pasa, lo que dificulta mucho su detección y su pronóstico. Esto hace que sea un síndrome con una elevadísima incidencia y mortalidad en todo el mundo.

En este sentido, se estima que en los países desarrollados se producen **31,5 millones de casos de sepsis al año**, 19,4 millones de casos graves y 5,3 millones de muertes. De hecho, es una dolencia que afecta a los países desarrollados debido a la esperanza de vida y a los hábitos. En concreto, en España los datos apuntan a 50.000 casos y 17.000 fallecimientos anuales, lo que establece una ratio de 50 óbitos al día.

La mejor forma de combatir la patología es ser lo más precoces posible, ya que cuánto antes se detecte, antes se iniciará el tratamiento y, por tanto, se podrá mejorar el pronóstico. La sepsis suele originarse a causa de una infección bacteriana, por lo que el antibiótico juega un papel clave. En los casos más graves, que ya requieren un ingreso en unidades de cuidados críticos, se establecen, además, otros tratamientos de soporte vital avanzado.

En este camino de encontrar luces para eliminar las sombras de esta patología aparece **Marta Martín**. Esta **bióloga e investigadora predoctoral en el grupo BioSepsis del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) y el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid** trabaja en un proyecto que se centra en detectar qué biomarcadores en sangre se elevan durante los diferentes estadios de la enfermedad, con el objetivo de poder estratificar a los pacientes con infección, y mejorar tanto el diagnóstico como el pronóstico. También buscan qué biomarcadores podrían predecir el pronóstico de esta dolencia.

En este punto, detalla que han investigado diferentes **biomarcadores asociados a eventos presentes en la fisiopatología de la sepsis**, como son el daño endotelial, la degranulación de los neutrófilos y la granulopoyesis de emergencia. Así, han descubierto que en ese momento crítico en el que una infección pasa de ser una infección normal para complicarse en una sepsis se elevan una serie de biomarcadores en sangre relacionados con el daño endotelial, en especial, una proteína llamada MR-ProADM.

Por otro lado, Martín comenta que han hallado que, en el siguiente escalón de gravedad, cuando **una sepsis deriva en shock séptico**, se elevan una serie de biomarcadores de la sangre relacionados con la degranulación del neutrófilo, principalmente, una proteína conocida como lipocalina 2. A su juicio, implementar una tecnología Point of care que sea capaz de medir estas dos proteínas de forma rápida, sencilla y fiable sería de «muchísima utilidad» para valorar la gravedad de los pacientes con infección, ya que más del 80% de los casos de sepsis se origina en la comunidad y no en el hospital, por lo que necesitan herramientas como estas que puedan aplicarse en cualquier ámbito sanitario, y que permitan a los clínicos realizar un diagnóstico e implementar las medidas de tratamiento necesarias lo antes posible y así, ganar tiempo.

Como es una enfermedad con una **elevadísima mortalidad**, apunta que también han investigado qué biomarcadores podrían servir a los profesionales para conocer el pronóstico de esta patología como alternativa a las escalas clínicas que se emplean en la actualidad, y que solo pueden utilizarse en unidades de cuidados críticos debido a los parámetros que recogen, lo que dificulta su uso en otras unidades de hospitalización.

En esta línea, la investigadora expone que han descubierto una **combinación de 11 genes elevados en sangre** relacionados con la granulopoyesis de emergencia que son capaces de predecir qué pacientes tienen un mayor riesgo de mortalidad con la misma fiabilidad que la escala más utilizada

para dicho propósito, y cuyo uso podría ponerse en funcionamiento en cualquier unidad de hospitalización. Ya han presentado una patente europea.

En su opinión, **es un proyecto innovador porque en un escenario único y utilizando últimas tecnologías**, estudia el papel que desempeñan estos biomarcadores con la meta de estratificar la gravedad y evaluar su capacidad de pronóstico en la infección de forma objetiva, sencilla y rápida.

«Nuestros resultados brindan nuevas herramientas que pueden mejorar los resultados que ofrecen las ya existentes. Por tanto, la implementación de estas nuevas herramientas podría suponer un gran avance en el manejo de la enfermedad», sostiene Marta Martín.

Las ventajas de esta investigación son muchas. En primer lugar, dice que permitiría estratificar la gravedad de una persona con infección, así como valorar su pronóstico esté donde esté.

«Se podría diferenciar qué pacientes pueden evolucionar a una sepsis y cuáles a un shock séptico. Y con esa información tomar decisiones. También se puede usar en cualquier unidad de hospitalización», subraya para, a continuación, añadir que la sepsis es una de las patologías que conlleva un mayor coste sanitario para los sistemas de salud mundiales, incluido el español, ya que los pacientes que la padecen requieren un elevado volumen de recursos.

En este punto, defiende que el proyecto en el que están trabajando ofrece la posibilidad de optimizar el uso de estos recursos al lograr una mayor rapidez y eficacia tanto a la hora de establecer el diagnóstico como en la toma de decisiones y tratamientos, pudiendo evitar alcanzar estadios de mayor gravedad de la dolencia, que requieren estancias más prolongadas en las unidades de cuidados críticos.

En el futuro pretenden validar los resultados mediante nuevas tecnologías que faciliten aún más su aplicación en la rutina clínica y que posibiliten explotar todo el potencial.

«Queremos cada día estar más cerca de nuestro objetivo último que, al fin y al cabo, es conseguir frenar esta terrible enfermedad», concluye la investigadora del grupo BioSepsis.

Puede ver este artículo en la siguiente dirección [/articulo/innovadores/luces-acorralan-sepsis/20200517115525009634.html](https://www.diariocastilla.com/articulo/innovadores/luces-acorralan-sepsis/20200517115525009634.html)

© 2020 Diario Castilla y León

Diario Castilla y León

opennemas | POWERED BY OPENHOST

X. ANEXOS

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

SERVICIO / UNIDAD: SERVICIO DE ANESTESIOLOGÍA Y REANIMACIÓN

INVESTIGADOR RESPONSABLE: JOSE MARÍA CALVO VECINO / JESÚS F BERMEJO

TELÉFONO DE CONTACTO: 983 42 04 00

EMAIL: jcalvovecino@saludcastillayleon.es; jfbermejo@saludcastillayleon.es;

NOMBRE DE LA LÍNEA DE TRABAJO: Desarrollo de un escore molecular de fallo de órgano (mSOFA) para diagnóstico y pronóstico de sepsis

VERSIÓN DE DOCUMENTO: 01/02/2017

I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta: la sepsis es una enfermedad grave que ocurre cuando no se puede controlar una infección. En su grado más extremo puede causar fallo del funcionamiento de varios órganos e incluso la muerte. Esta enfermedad es un problema sanitario de primer orden. El diagnóstico y tratamiento temprano de la misma son la principal arma para evitar sus consecuencias. Nuestra línea de trabajo tiene como finalidad encontrar biomarcadores y huellas moleculares que nos permitan identificar a los pacientes con infección grave que pueda ser una sepsis, y poder valorar adecuadamente el grado de severidad de estos pacientes. Los resultados de estos estudios ayudarán probablemente a diagnosticar y/o tratar de manera más precisa a los enfermos con una enfermedad como la suya.

II) Algunas consideraciones sobre su participación:

Es importante que Vd., como potencial donante de muestras, conozca varios aspectos importantes:

A) La donación de muestras es totalmente voluntaria.

B) Puede plantear todas las dudas que considere sobre su participación en este estudio.

C) Se solicita su autorización para la toma y uso en investigación biomédica de muestras de sangre. En dichas muestras se obtendrán y/o analizarán células, material genético (ADN, ARN), proteínas, metabolitos, microorganismos utilizando los métodos que el investigador principal considere necesarios para avanzar en la línea de trabajo arriba expuesta.

D) Se le tomará un volumen relativamente pequeño (10 ml) de sangre venosa mediante una punción en el brazo en principio en toma única (si el estudio lo requiriera, se le podría solicitar la toma de muestras posteriores, así como muestra de orina o muestras respiratorias). La donación

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días.

E) No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

F) Las muestras y los productos obtenidos de las mismas serán almacenados y custodiados en el Laboratorio de Infección e Inmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, lugar designado para este fin por el Investigador Principal del Estudio. La persona responsable de la custodia es el Dr Jesús F Bermejo (responsable del proyecto). La muestra quedará allí depositada de forma indefinida, al menos hasta la consecución de los fines científicos de la línea de trabajo arriba expuesta (siempre que no se haya consumido en su totalidad en el curso de los trabajos asociados a la misma). Si en dicho momento se propusiera el paso de las muestras a un Biobanco oficialmente reconocido, se le volverá a solicitar su consentimiento para ello.

G) Los datos personales asociados a las muestras serán tratados según lo dispuesto en la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999), de 13 de diciembre) y cualquier otra que resultara aplicable.

H) La información obtenida se almacenará en una base de datos, en soporte informático, registrada en la Agencia Española de Protección de Datos, según la legislación vigente (Ley Orgánica 15/1999). Los datos registrados serán tratados estadísticamente de forma codificada. En todo momento el donante tendrá derecho de acceso, rectificación o cancelación de los datos depositados en la base de datos siempre que expresamente lo solicite. Para ello deberá ponerse en contacto con el investigador principal. Los datos quedarán custodiados bajo la responsabilidad del Investigador Principal del Estudio.

I) Las muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser utilizadas por el grupo del investigador principal en estudios futuros de investigación relacionados con la línea de trabajo arriba expuesta. Dichas muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser cedidas a otros investigadores designados por el Investigador Principal para trabajos relacionados

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE
IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

con esta línea, siempre al servicio de proyectos que tengan alta calidad científica y respeto por los principios éticos. En estos dos últimos casos, se solicitará antes autorización a nuestro Comité Ético de Investigación Clínica.

J) La falta de consentimiento o la revocación de este consentimiento previamente otorgado no supondrá perjuicio alguno en la asistencia sanitaria que Vd. recibe/recibirá.

K) Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Vd. tiene derecho a conocerla y trasmitirla a sus familiares si así lo desea.

L) Sólo si Vd. lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE
IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

Estudio: Desarrollo de un escore molecular de fallo de órgano (mSOFA) para diagnóstico y pronóstico de sepsis

Yo, _____

(Nombre y apellidos del paciente ó representante legal)

He leído la información que me ha sido entregada.

He recibido la hoja de información que me ha sido entregada.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado del estudio con _____

(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.- Cuando quiera.
- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para:

- El fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales según lo recogido en la hoja de información al paciente que me ha sido entregada.

- Accedo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA contacten conmigo en el futuro en caso de que se necesite obtener nuevos datos. ...SI..... NO (marcar con una X lo que proceda)

- Accedo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA contacten conmigo en caso de que los estudios realizados sobre mis muestras / datos aporten información relevante para mi salud o la de mis familiares ...SI..... NO (marcar con una X lo que proceda)

Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL
FECHA

NOMBRE Y APELLIDOS

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE
IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE Y APELLIDOS

FECHA

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

Estudio: Desarrollo de un escore molecular de fallo de órgano (mSOFA) para diagnóstico y pronóstico de sepsis

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)

Yo _____ revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado con fecha _____

Firma:

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE SEPSIS



TOMA DE MUESTRAS: Dentro de las primeras 12 horas del diagnóstico

Criterios de Exclusión:

1. No firmar el consentimiento informado.
2. Pacientes menores de edad.

Muestras para el proyecto



1x EDTA

2x PAX gene

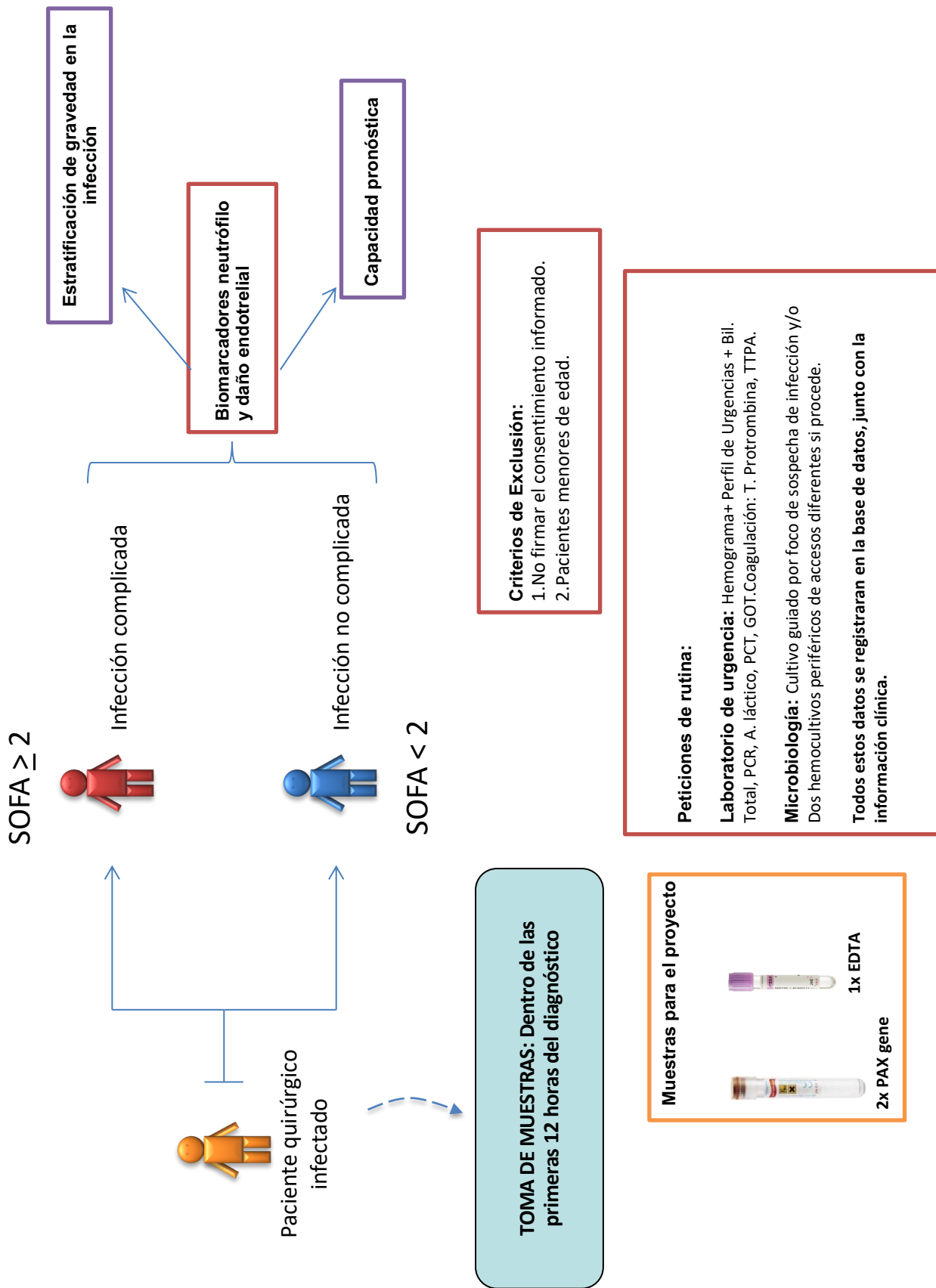
Peticiones de rutina:

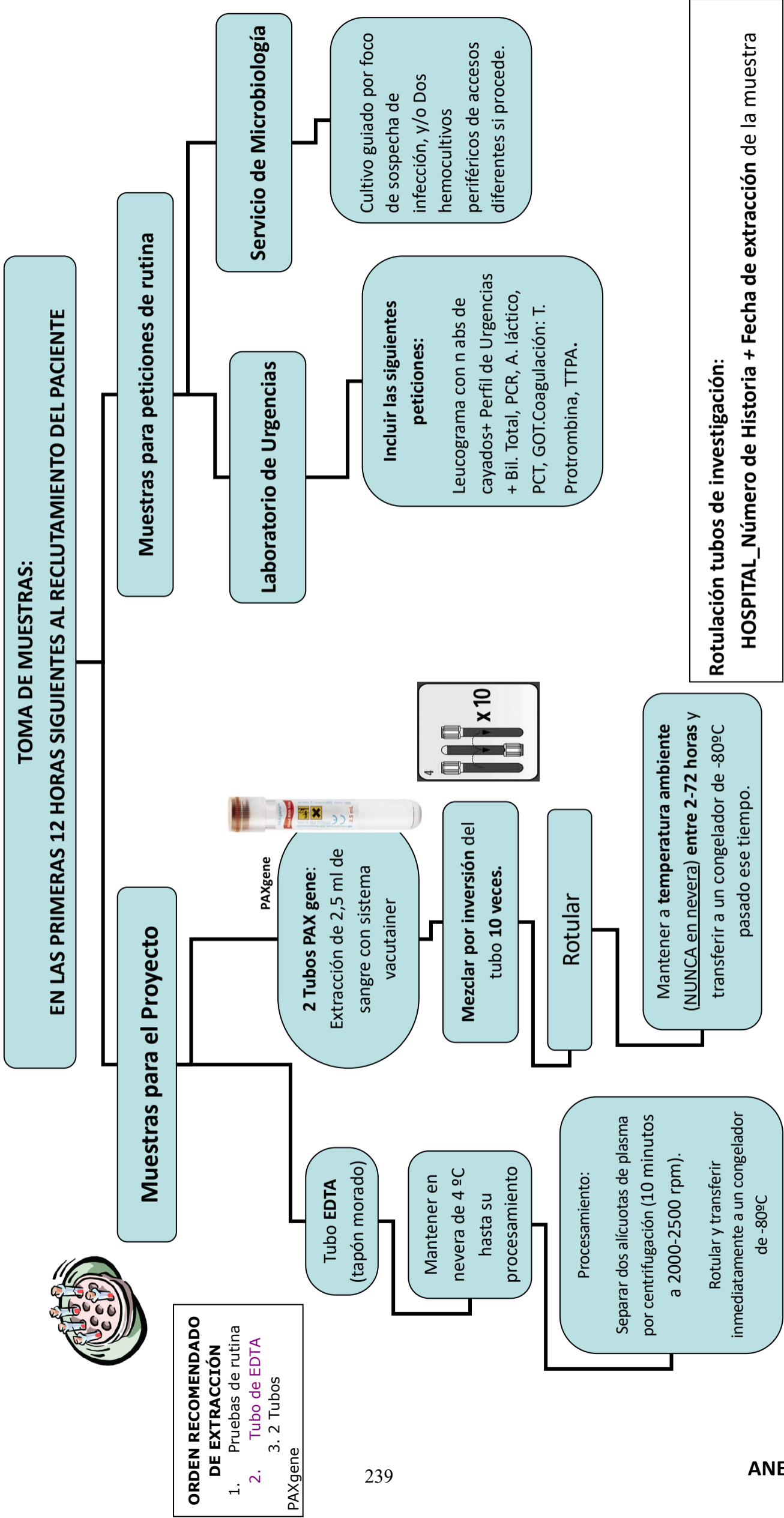
Laboratorio de urgencia: Hemograma+ Perfil de Urgencias + Bil. Total, PCR, A. láctico, PCT, GOT.Coagulación: T. Protrombina, TTPA.

Microbiología: Cultivo guiado por foco de sospecha de infección y/o Dos hemocultivos periféricos de accesos diferentes si procede.

Todos estos datos se registrarán en la base de datos, junto con la información clínica.

ESTRATIFICACIÓN DE GRAVEDAD Y PRONÓSTICO





PROCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS.

ORDEN RECOMENDADO DE EXTRACCIÓN PARA LAS MUESTRAS DEL PROYECTO

1. Pruebas de rutina
2. Tubo EDTA
3. **2 Tubos PAXgene**

El orden de llenado de los tubos mejora la calidad de las muestras y la exactitud y finalidad de los resultados.
La estandarización de las técnicas de extracción permite realizar esta forma protocolizada, lo que ayudará a que se trabaje con criterios de calidad.

DIA DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA: día del reclutamiento.

Los tres tubos se recogerán a todos los pacientes quirúrgicos que cumplan los criterios de diagnóstico.

EDTA: Recoger 1 solo tubo por paciente:

Procedimiento de obtención de la muestra:

- Extraer sangre periférica en un tubo EDTA (3-4ml). [Tapón morado]
- Agitar cuidadosamente para evitar la formación de coágulos.
- Rotular en el tubo: En la pegatina del paciente se pondrá el número de historia y la fecha de extracción de la muestra.
- Conservar a 4°C hasta su procesamiento.

Procesamiento:

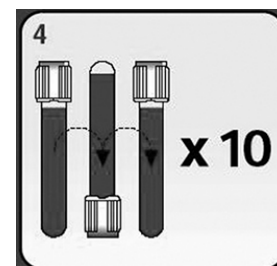
- Centrifugar la muestra unos 10 minutos a 2000-2500 rpm..
- Separar el plasma en 2 alícuotas (eppendorf).
- Rotular los eppendorf de la siguiente manera:
 - CAUSA_ Número de historia + Fecha de extracción
- Congelar en una caja específica de congelación a -80°C.



PAXgene: Recoger 2 tubos por paciente.

Procedimiento de obtención de la muestra:

- Extraer 2,5 ml de sangre con sistema vacutainer si es posible. Para realizar la extracción, declinar el tubo de tal modo que el contenido no toque la vena del paciente.
- Invertir el tubo PAXgene varias veces para favorecer la mezcla. (De 8 a 10 veces)
- Rotular en el tubo: En la pegatina del paciente se pondrá:
 - CAUSA_ Número de historia + Fecha de extracción
- Mantener el tubo a temperatura ambiente durante un mínimo de dos horas y un máximo de 72 horas.
- Transcurrido este tiempo congelar el tubo directamente a -80°C.



HOJA DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.

DATOS PERSONALES

Agregar nuevo paciente +

ID (nº caso):	<input type="text" value="Nuevo"/>	<input type="button" value="A"/>
Nº de Historia Clínica:	<input type="text"/>	<input type="button" value="A"/>
Nombre:	<input type="text"/>	
1º Apellido:	<input type="text"/>	
2º Apellido:	<input type="text"/>	
Sexo:	<input type="text" value="v"/>	
Fecha de Nacimiento:	<input type="text"/>	
Edad:	<input type="text"/>	
Peso (Kg):	<input type="text"/>	
Talla (m):	<input type="text"/>	

Nota: Para copiar el Nº de Historia use: Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

FECHAS:			
Ingreso HOSPITAL:	<input type="text"/>	Fecha de infección:	<input type="text"/>
Ingreso en REA:	<input type="text"/>	Alta en REA:	<input type="text"/>
Fecha Intubación:	<input type="text"/>	Extubación:	<input type="text"/>
Fecha Reintubación:	<input type="text"/>	Fecha Extubación de Reintubación:	<input type="text"/>
Alta HOSPITAL:	<input type="text"/>		
MORTALIDAD			
	Fecha exitus		
Mortalidad hospitalaria:	<input type="text" value="v"/>	Lugar exitus hospital:	<input type="text" value="v"/>
Mortalidad tras el alta:	<input type="text" value="v"/>	Lugar exitus tras el alta:	<input type="text" value="v"/>
Causa exitus:	<input type="text"/>		

MOTIVO DE INGRESO: Cirugía Causa médica Traumatismo

Especificar motivo de ingreso:

Incidencias reseñables:

Reintervención:

Fecha:

Por sangrado

Tipo de cirugía

Nº de Historia Clínica

Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

Cirugía: Fecha de Cirugía: Duración de la cirugía (minutos):

SUEROTERAPIA ADMINISTRADA: Cristaloides (mL): Coloides (mL):

HEMODERIVADOS: Hematíes (mL): Plaquetas (mL): Plasma (mL):

TIPO DE CIRUGÍA:

CX General: **ORL:** **Traumatología:** **Torácica:** **Neurocirugía:**
 Localización:

Etiología:

Cardíaca: **Vascular:** **Ginecología:** **Urología:** **OTRAS:**

DATOS COMPLEMENTARIOS

FE (%): Tº de CEC: Tº CLAMP: EUROSORE: ASA:

Antecedentes Personales y Comorbilidades

Nº de Historia Clínica:

Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

<input type="checkbox"/> NO Comorbilidades <input type="checkbox"/> Antecedentes NO DISPONIBLES	
<input type="checkbox"/> Alergia <input type="checkbox"/> Penicilina Otras alergias <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Fumador <input type="checkbox"/> Alcoholismo <input type="checkbox"/> Abuso de drogas	<input type="checkbox"/> HTA <input type="checkbox"/> Hipertensión pulmonar <input type="checkbox"/> Hepatopatía <input type="checkbox"/> Enfermedad Autoinmune especificar enfermedad autoinmune: <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Obesidad <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Embarazada <input type="checkbox"/> Otra enfermedad digestiva especificar enf digestiva: <input type="text"/>
<u>CARDIOPATÍA:</u> <input type="checkbox"/> Coronaria <input type="checkbox"/> Valvulopatía <input type="checkbox"/> Fibrilación auricular <input type="text"/>	<u>ENF. RESPIRATORIA</u> <input type="checkbox"/> EPOC <input type="checkbox"/> ASMA <input type="checkbox"/> OXÍGENO DOMICILIARIO (CEPAP) <input type="checkbox"/> NOCTURNA
<input type="checkbox"/> Enfermedad Neurológica <input type="checkbox"/> Ictus con secuelas <input type="checkbox"/> Ictus sin secuelas	<input type="checkbox"/> INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA Creatinina Previa: <input type="text"/> <input type="checkbox"/> DIÁLISIS
<u>INMUNOSUPRESIÓN</u> <input type="checkbox"/> CÁNCER últimos 3 meses <input type="checkbox"/> Metástasis <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Espectomizado <input type="checkbox"/> VIH <input type="checkbox"/> Corticoides inhalado últimos 3 meses <input type="checkbox"/> Corticoides orales últimos 3 meses <input type="checkbox"/> Quimioterapia (últimos 3 meses) <input type="checkbox"/> Radioterapia (últimos 3 meses) <input type="checkbox"/> Otros Inmunosupresores	<u>TRATAMIENTOS previos:</u> <input type="checkbox"/> Hormonas tiroideas <input type="checkbox"/> Estatinas previas <input type="checkbox"/> Betabloqueantes <input type="checkbox"/> Otros tratamientos <input type="checkbox"/> Insulina Otros tratamientos especificar: <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Antidiabéticos orales <input type="checkbox"/> Diuréticos <input type="checkbox"/> Anticoagulantes <u>DM:</u> <input type="checkbox"/> Insulin dependiente <input type="checkbox"/> No insulin dependiente
OTRAS: <input type="text"/>	

Variables asociadas a la fecha de reclutamiento

Nº Historia Clínica:



NOTA: Recoger el peor dato del día

Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

Fecha:

VARIABLES GENERALES:

Tº central:
 Frecuencia cardíaca:
 Frecuencia respiratoria (nº de respiraciones):
 Ventilación Mecánica Tipo VM:
 FIO2: PaO2/FIO2:
 Espontánea
 FIO2 con ventimask:
 Litros de Oxígeno:
 Balance de líquidos (24 HORAS):
 Líquidos totales (entradas, 24 HORAS):
 Glucemia:

OTROS:

Hto (%):
 Na (mmol/L):
 K (mmol/L):
 Troponina T (pico máx durante el ingreso):
 MB (pico máx durante el ingreso):
 CPK (pico máx durante el ingreso):
 ProBNP (pico máx durante el ingreso):
 GOT:
 GPT:

VARIABLES INFLAMATORIAS:

Leucocitos (nº/ml):
 Linfocitos (%):
 Monocitos (%):
 Neutrófilos (%):
 Eosinófilos (%):
 Basófilos (%):
 Cayados (% de formas inmaduras):
 Cayados (número absoluto):
 Procalcitonina:
 PCR Plasmática:

FUNCIÓN DE ÓRGANO:

Íleo Paralítico: Presión Arterial Sistólica (mmHg):
 Creatinina (mg/dL): Presión Arterial Diastólica (mmHg):
 Diuresis 24 horas: Dobutamina (mcg/min):
 Bilirrubina total (mg/dL): Dopamina (mcg/min):
 Plaquetas: Adrenalina (mcg/min):
 INR: Noradrenalina (mcg/min):
 Ratio: Levosimendan:
 Fibrinógeno: Milrinona:
 CPIS:
 Radiografía:
 Secreciones:

SHOCK SÉPTICO:

GASOMETRÍA venosa:

Lactato venoso (mmol/L):
 Ph venoso:
 Bicarbonato venoso:
 PvO2:
 PvCO2:
 SvO2:
 GAP CO2:

GASOMETRÍA arterial: (si procede)

Lactato arterial (mmol/L):
 Ph arterial:
 Bicarbonato arterial:
 PaO2:
 PaCO2:
 SaO2:

Notas:

ESCALA:

Glasgow:
 Apache II:

Complicaciones durante la hospitalización

Número de historia clínica:



Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

European Perioperative Clinical Outcome (EPCO) definitions

¿ Ha sufrido alguna de estas complicaciones durante su hospitalización? Complicaciones:

Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA): <input type="text"/> Estratos de SDRA: <input type="text"/> Fecha SDRA: <input type="text"/>	Insuficiencia renal aguda (IRA): <input type="text"/> Estadio IRA (Criterios AKIN): <input type="text"/> Fecha IRA: <input type="text"/>	Embolia pulmonar: <input type="text"/> Fecha embolia pulmonar: <input type="text"/> Gravedad embolia pulmonar (EPCO): <input type="text"/>
Edema pulmonar cardiogénico: <input type="text"/> Fecha edema pulmonar cardiogénico: <input type="text"/> Gravedad edema pulmonar cardiogénico (EPCO): <input type="text"/>	Arritmia: <input type="text"/> Fecha arritmia: <input type="text"/> Gravedad arritmia (EPCO): <input type="text"/>	Paro cardiaco: <input type="text"/> Fecha paro cardiaco: <input type="text"/>
Infarto de Miocardio: <input type="text"/> Fecha Infarto de Miocardio: <input type="text"/> Gravedad Infarto Miocardio (EPCO): <input type="text"/>	Lesión miocárdica tras cirugía no cardiaca (MINS): <input type="text"/> Fecha MINS: <input type="text"/>	Anastomosis: <input type="text"/> Fecha anastomosis: <input type="text"/> Gravedad anastomosis (EPCO): <input type="text"/>
Hemorragia postoperatoria: <input type="text"/> Fecha hemorragia postoperatoria: <input type="text"/> Gravedad hemorragia postop (EPCO): <input type="text"/>	Sangrado gastrointestinal: <input type="text"/> Fecha sangrado gastrointestinal: <input type="text"/> Gravedad del sangrado gastrointestinal (EPCO): <input type="text"/>	Accidente cerebrovascular: <input type="text"/> Fecha del accidente cerebrovascular: <input type="text"/> Gravedad del accidente cerebrovascular (EPCO): <input type="text"/>
Íleo paralítico: <input type="text"/> Fecha íleo paralítico: <input type="text"/> Gravedad íleo paralítico (EPCO): <input type="text"/>	Coagulación intravascular diseminada (CID): <input type="text"/> ISTH score: <input type="text"/> Fecha CID: <input type="text"/>	Insuficiencia hepática aguda: <input type="text"/> Fecha de insuficiencia hepática aguda: <input type="text"/>
Infección secundaria: <input type="text"/> Fecha de infección secundaria: <input type="text"/> FOCO de infección 2ª: <input type="text"/> Tipo de muestra/s de infección 2ª: <input type="text"/> Microorganismo/s de infección 2ª: <input type="text"/>	Trombosis venosa profunda (DVP): <input type="text"/> Fecha DVT: <input type="text"/> Gravedad DVT: <input type="text"/> Delirio postoperatorio: <input type="text"/> Fecha delirio: <input type="text"/>	Otras complicaciones: <div style="border: 1px solid black; height: 100px; width: 100%;"></div>

SOFA Score

Nº de Historia clínica:



Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

SOFA Score al reclutamiento

SOFA Respiratorio:

SOFA Hematológico:

SOFA Hepático:

SOFA Cardiovascular:

SOFA Neurológico:

SOFA Renal:

SOFA Score (TOTAL):

Quick SOFA

Respiratory rate > 22 / min

Systolic blood pressure < 100 mmHg

Glasgow < 13

qSOFA (TOTAL) Ingreso:

Diagnóstico Infección y Tratamiento Nº de Historia Clínica: Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

Fecha del inicio de síntomas:

Tipo de infección: Nosocomial
 Comunitaria

Localización de la infección: FOCO desconocido

Infección del lugar de la intervención quirúrgica

Neumonía:

Infección ojos, nariz, garganta o boca

Infección de vías respiratorias bajas sin neumonía

Infección sintomática del tracto urinario

Bacteriemia

Infección de piel y partes blandas

Infección gastrointestinal

Osteoarticular

Sistema nervioso central

Tratamiento antibiótico al diagnóstico

Tratamiento antibiótico adecuado:

Fecha inicio tratamiento: Fecha fin tratamiento:

Continuación (p.e. endocarditis) Empírico

Antibióticos iniciales 1: Antibióticos iniciales 2:

Antibióticos iniciales 3: Antibióticos iniciales 4:

Cambio tratamiento antibiótico 1: Cambio tratamiento antibiótico 2:

Cambio tratamiento antibiótico 3: Cambio tratamiento antibiótico 4:

Tratamiento antibiótico previo al diagnóstico

Fecha inicio antibiotico previo al diagnóstico: Fecha fin antibiotico previo al diagnóstico:

Motivo

Tratamiento infección: Profilaxis quirúrgica

Antibiótico previo al diagnóstico 1: Antibiótico previo al diagnóstico 2:

Antibiótico previo al diagnóstico 3: Antibiótico previo al diagnóstico 4:

Microbiología al ingreso y durante la hospitalización Nº de Historia Clínica: Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V

Especificar todas las fechas de petición, tipo de muestras, resultados positivo o negativo y microorganismos aislados

Especificar:

Si no se ha solicitado ninguna petición a microbiología seleccionar la siguiente casilla

AUSENCIA DE CULTIVOS

Muestras de Investigación:

Nº de Historia Clínica:

Copiar CTRL+C y Pegar CTRL+V



Código de la muestra:

Fecha Toma de la muestra:

EDTA:

Número de alícuotas de plasma:

Observaciones EDTA:

PaxGene:

Número de tubos PaxGene:

Observaciones PaxGene:

XI. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía:

1. Fleischmann, C. *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 259–272 (2015).
2. Liu, V. *et al.* Hospital Deaths in Patients With Sepsis From 2 Independent Cohorts. *JAMA* **312**, 90–92 (2014).
3. Rhee, C. *et al.* Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *JAMA* **318**, 1241–1249 (2017).
4. Trends in Hospital Readmissions for Four High-Volume Conditions, 2009-2013 #196. <https://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb196-Readmissions-Trends-High-Volume-Conditions.jsp>.
5. Kumar, A. *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* **34**, 1589–1596 (2006).
6. Winters, B. D. *et al.* Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit. Care Med.* **38**, 1276–1283 (2010).
7. Lund-Sørensen, H. *et al.* A Nationwide Cohort Study of the Association Between Hospitalization With Infection and Risk of Death by Suicide. *JAMA Psychiatry* **73**, 912–919 (2016).
8. Torio, C. M. & Moore, B. J. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief #204. in *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs* (Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2006).
9. Arefian, H. *et al.* Hospital-related cost of sepsis: A systematic review. *J. Infect.* **74**, 107–117 (2017).

10. Pfuntner, A., Wier, L. M. & Steiner, C. Costs for Hospital Stays in the United States, 2010: Statistical Brief #146. in *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs* (Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2006).
11. Vincent, J.-L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* **34**, 344–353 (2006).
12. Vincent, J.-L. *et al.* Comparison of European ICU patients in 2012 (ICON) versus 2002 (SOAP). *Intensive Care Med.* **44**, 337–344 (2018).
13. Esteban, A. *et al.* Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit. Care Med.* **35**, 1284–1289 (2007).
14. Álvaro-Meca, A. *et al.* Epidemiological trends of sepsis in the twenty-first century (2000-2013): an analysis of incidence, mortality, and associated costs in Spain. *Popul. Health Metr.* **16**, 4 (2018).
15. Martín, S., Pérez, A. & Aldecoa, C. Sepsis and Immunosenescence in the Elderly Patient: A Review. *Front. Med.* **4**, (2017).
16. Rusinova, K. & Guidet, B. “Are you sure it’s about ‘age’?” *Intensive Care Med.* **40**, 114–116 (2014).
17. Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Read Online Crit. Care Med. Soc. Crit. Care Med.* **29**, 1303–1310 (2001).
18. Güemez-Sandoval, D. E. El papiro Ebers y la oftalmología. 3.
19. Geroulanos, S. & Douka, E. T. Historical perspective of the word ‘sepsis’. *Intensive Care Med.* **32**, 2077 (2006).
20. Majno, G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J. Infect. Dis.* **163**, 937–945 (1991).
21. Baron, R. M., Baron, M. J. & Perrella, M. A. Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 129–134 (2006).

22. Funk, D. J., Parrillo, J. E. & Kumar, A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit. Care Clin.* **25**, 83–101, viii (2009).
23. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
24. Thurston, A. J. Of Blood, Inflammation and Gunshot Wounds: The History of the Control of Sepsis. *Aust. N. Z. J. Surg.* **70**, 855–861 (2000).
25. Miranda C, M. & Navarrete T, L. [Simmelweis and his outstanding contribution to medicine: washing hands saves lives]. *Rev. Chil. Infectologia Organo Of. Soc. Chil. Infectologia* **25**, 54–57 (2008).
26. Semmelweis, K. [Ignaz Philipp Semmelweis -- remembrance and assessment of his achievement by the discovery of the causes of puerperal fever, in Austria in the 20th and 21st centuries]. *Orvostorteneti Kozlemenyek* **61**, 19–27 (2015).
27. Nau, J.-Y. [Louis Pasteur, science and the return of ‘belief’]. *Rev. Med. Suisse* **11**, 1626–1627 (2015).
28. Jessney, B. Joseph Lister (1827-1912): a pioneer of antiseptic surgery remembered a century after his death. *J. Med. Biogr.* **20**, 107–110 (2012).
29. Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 169–176 (2003).
30. Jacob L. Über Allgemeininfektion durch Bacterium coli commune. *1909* **97**, 303–347.
31. Budelmann, G. [Hugo Schottmüller, 1867-1936. The problem of sepsis]. *Internist* **10**, 92–101 (1969).
32. van Vught, L. A. *et al.* The Host Response in Patients with Sepsis Developing Intensive Care Unit-acquired Secondary Infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 458–470 (2017).
33. Bryan, C. S. The influence of Sir Andrew Clark (1826-93) on William Osler (1849-1919). *J. Med. Biogr.* **13**, 195–200 (2005).

34. Ashbaugh, D. G., Bigelow, D. B., Petty, T. L. & Levine, B. E. Acute respiratory distress in adults. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 319–323 (1967).
35. Rabuel, C. & Mebazaa, A. Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med.* **32**, 799–807 (2006).
36. Bone, R. C., Sibbald, W. J. & Sprung, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* **101**, 1481–1483 (1992).
37. Bone, R. C. *et al.* Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit. Care Med.* **17**, 389–393 (1989).
38. Bone, R. C. *et al.* A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **317**, 653–658 (1987).
39. Panacek, E. A. *et al.* Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit. Care Med.* **32**, 2173–2182 (2004).
40. Larsen, R. [Sepsis, SIRS, MODS--new findings, unanswered questions]. *Anaesthetist* **45**, 311 (1996).
41. Chen, Y.-X. & Li, C.-S. Risk stratification and prognostic performance of the predisposition, infection, response, and organ dysfunction (PIRO) scoring system in septic patients in the emergency department: a cohort study. *Crit. Care Lond. Engl.* **18**, R74 (2014).
42. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **32**, 858–873 (2004).
43. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* **30**, 536–555 (2004).
44. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* **41**, 580–637 (2013).

45. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* **39**, 165–228 (2013).
46. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
47. Shankar-Hari, M. *et al.* Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 775–787 (2016).
48. Moreno, R. *et al.* The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med.* **25**, 686–696 (1999).
49. Lee, W. L. & Slutsky, A. S. Sepsis and endothelial permeability. *N. Engl. J. Med.* **363**, 689–691 (2010).
50. Bermejo-Martin, J. F., Martín-Fernandez, M., López-Mestanza, C., Duque, P. & Almansa, R. Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *J. Clin. Med.* **7**, (2018).
51. Radeva, M. Y. & Waschke, J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **222**, (2018).
52. Gane, J. & Stockley, R. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. *Thorax* **67**, 553–561 (2012).
53. Colbert, J. F. & Schmidt, E. P. Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis. *Clin. Chest Med.* **37**, 263–275 (2016).
54. Wallez, Y. & Huber, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 794–809 (2008).

55. Hattori, Y., Hattori, K., Suzuki, T. & Matsuda, N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacol. Ther.* **177**, 56–66 (2017).
56. Ince, C. *et al.* THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga* **45**, 259–270 (2016).
57. Pool, R., Gomez, H. & Kellum, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit. Care Clin.* **34**, 63–80 (2018).
58. Lubkin, A. & Torres, V. J. Bacteria and endothelial cells: a toxic relationship. *Curr. Opin. Microbiol.* **35**, 58–63 (2017).
59. Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 517–528 (2017).
60. Martin, L., Koczera, P., Zechendorf, E. & Schuerholz, T. The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis. *BioMed Res. Int.* **2016**, 3758278 (2016).
61. Saffarzadeh, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* **7**, e32366 (2012).
62. Fox, E. D., Heffernan, D. S., Cioffi, W. G. & Reichner, J. S. Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R226 (2013).
63. Fortin, C. F., McDonald, P. P., Fülöp, T. & Lesur, O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock Augusta Ga* **33**, 344–352 (2010).
64. Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* **38**, S26-34 (2010).
65. Gardiner, E. E. & Andrews, R. K. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev.* **26**, 255–259 (2012).
66. Crouser, E. D. & Matthay, M. A. Endothelial Damage During Septic Shock: Significance and Implications for Future Therapies. *Chest* **152**, 1–3 (2017).

67. Clark, D. V. *et al.* Biomarkers of endothelial activation/dysfunction distinguish sub-groups of Ugandan patients with sepsis and differing mortality risks. *JCI Insight* **5**, (2019).
68. Amalakuhan, B. *et al.* Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with severe sepsis. *Cytokine* **88**, 267–273 (2016).
69. García Hernández, A. M. & Jarque Ramos, I. LEUCOCITOS. PATOLOGÍA DE LOS GRANULOCITOS. AGRANULOCITOSIS. in *Pregrado de Hematología* (Luzán 5, 2017).
70. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**, (2018).
71. Valenti, P. & Antonini, G. Lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2576 (2005).
72. Cowland, J. B. & Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* **273**, 11–28 (2016).
73. Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N. H. H. & Borregaard, N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 711–721 (2013).
74. Bermejo-Martin, J. F. *et al.* Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. *J. Infect.* **72**, 525–536 (2016).
75. Alves-Filho, J. C., Spiller, F. & Cunha, F. Q. NEUTROPHIL PARALYSIS IN SEPSIS. *Shock* **34**, 15–21 (2010).
76. Bermejo-Martín, J. F. *et al.* Circulating neutrophil counts and mortality in septic shock. *Crit. Care Lond. Engl.* **18**, 407 (2014).
77. Brown, K. A. & Treacher, D. F. Neutrophils as potential therapeutic targets in sepsis. *Discov. Med.* **6**, 118–122 (2006).

78. Mare, T. A. *et al.* The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit. Care Lond. Engl.* **19**, 57 (2015).
79. Demaret, J. *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 1081–1090 (2015).
80. Kalupov, T. *et al.* Structural characterization of mouse neutrophil serine proteases and identification of their substrate specificities: relevance to mouse models of human inflammatory diseases. *J. Biol. Chem.* **284**, 34084–34091 (2009).
81. Gabelloni, M. L., Trevani, A. S., Sabatté, J. & Geffner, J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin. Immunopathol.* **35**, 423–437 (2013).
82. Brown, K. A. *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet Lond. Engl.* **368**, 157–169 (2006).
83. Almansa, R. *et al.* Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J. Infect.* **70**, 445–456 (2015).
84. van den Berg, C. W. *et al.* Mechanism of neutrophil dysfunction: neutrophil serine proteases cleave and inactivate the C5a receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 1787–1795 (2014).
85. Xu, R. *et al.* Complement 5a receptor-mediated neutrophil dysfunction is associated with a poor outcome in sepsis. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 103–109 (2016).
86. Meyer-Hoffert, U. & Wiedow, O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr. Opin. Hematol.* **18**, 19–24 (2011).
87. Reinhart, K., Bauer, M., Riedemann, N. C. & Hartog, C. S. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 609–634 (2012).
88. Vincent, J.-L. Management of sepsis in the critically ill patient: key aspects. *Expert Opin. Pharmacother.* **7**, 2037–2045 (2006).
89. Kibe, S., Adams, K. & Barlow, G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J. Antimicrob. Chemother.* **66 Suppl 2**, ii33-40 (2011).

90. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
91. Schuetz, P., Christ-Crain, M. & Müller, B. Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. *Curr. Opin. Crit. Care* **13**, 578–585 (2007).
92. Lobo, S. M. A. *et al.* C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest* **123**, 2043–2049 (2003).
93. Baidoshvili, A., Nijmeijer, R., Lagrand, W. K., Hack, C. E. & Niessen, H. W. M. Localisation of C reactive protein in infarcted tissue sites of multiple organs during sepsis. *J. Clin. Pathol.* **55**, 152–153 (2002).
94. Tillett, W. S. & Francis, T. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J. Exp. Med.* **52**, 561–571 (1930).
95. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* **111**, 1805–1812 (2003).
96. Póvoa, P. *et al.* C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 101–108 (2005).
97. Schmit, X. & Vincent, J. L. The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection* **36**, 213–219 (2008).
98. Lavrentieva, A. *et al.* Inflammatory markers in patients with severe burn injury. What is the best indicator of sepsis? *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **33**, 189–194 (2007).
99. Fraunberger, P. *et al.* Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock Augusta Ga* **26**, 10–12 (2006).
100. Almansa, R. *et al.* Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Sci. Rep.* **8**, (2018).

101. Meisner, M. Update on procalcitonin measurements. *Ann. Lab. Med.* **34**, 263–273 (2014).
102. Müller, B. *et al.* Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 396–404 (2001).
103. Dandona, P. *et al.* Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 1605–1608 (1994).
104. Nakamura, A. *et al.* Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit. *Shock Augusta Ga* **31**, 586–591 (2009).
105. Limper, M., de Kruif, M. D., Duits, A. J., Brandjes, D. P. M. & van Gorp, E. C. M. The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infectious from non-infectious fever. *J. Infect.* **60**, 409–416 (2010).
106. Self, W. H. *et al.* Procalcitonin as a Marker of Etiology in Adults Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **65**, 183–190 (2017).
107. Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F. M. & Schlattmann, P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 426–435 (2013).
108. Yunus, I., Fasih, A. & Wang, Y. The use of procalcitonin in the determination of severity of sepsis, patient outcomes and infection characteristics. *PloS One* **13**, e0206527 (2018).
109. Müller, B. *et al.* Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* **28**, 977–983 (2000).
110. Wirz, Y. *et al.* Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on clinical outcomes in intensive care unit patients with infection and sepsis patients: a patient-level meta-analysis of randomized trials. *Crit. Care Lond. Engl.* **22**, 191 (2018).
111. Guan, J., Lin, Z. & Lue, H. Dynamic change of procalcitonin, rather than concentration itself, is predictive of survival in septic shock patients when beyond 10 ng/mL. *Shock Augusta Ga* **36**, 570–574 (2011).

112. Casserly, B. *et al.* Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Crit. Care Med.* **43**, 567–573 (2015).
113. Mebazaa, A. *et al.* Circulating adrenomedullin estimates survival and reversibility of organ failure in sepsis: the prospective observational multinational Adrenomedullin and Outcome in Sepsis and Septic Shock-1 (AdrenOSS-1) study. *Crit. Care Lond. Engl.* **22**, 354 (2018).
114. Bełtowski, J. & Jamroz, A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol. J. Pharmacol.* **56**, 5–27 (2004).
115. Andaluz-Ojeda, D. *et al.* Sustained value of proadrenomedullin as mortality predictor in severe sepsis. *J. Infect.* **71**, 136–139 (2015).
116. Martin-Fernandez, M. *et al.* Endothelial dysfunction is an early indicator of sepsis and neutrophil degranulation of septic shock in surgical patients. *BJS Open* (2020) doi:10.1002/bjs5.50265.
117. Saeed, K. *et al.* The early identification of disease progression in patients with suspected infection presenting to the emergency department: a multi-centre derivation and validation study. *Crit. Care Lond. Engl.* **23**, 40 (2019).
118. Menéndez, R. *et al.* Simultaneous Depression of Immunological Synapse and Endothelial Injury is Associated with Organ Dysfunction in Community-Acquired Pneumonia. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
119. Andaluz-Ojeda, D. *et al.* A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine* **57**, 332–336 (2012).
120. Pierrakos, C. & Vincent, J.-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care Lond. Engl.* **14**, R15 (2010).
121. Samraj, R. S., Zingarelli, B. & Wong, H. R. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock Augusta Ga* **40**, 358–365 (2013).
122. Bloos, F. & Reinhart, K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* **5**, 154–160 (2014).

123. Sweeney, T. E., Shidham, A., Wong, H. R. & Khatri, P. A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Sci. Transl. Med.* **7**, 287ra71 (2015).
124. Sweeney, T. E., Wong, H. R. & Khatri, P. Robust classification of bacterial and viral infections via integrated host gene expression diagnostics. *Sci. Transl. Med.* **8**, 346ra91 (2016).
125. Sweeney, T. E. *et al.* A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nat. Commun.* **9**, 694 (2018).
126. Sweeney, T. E. *et al.* Unsupervised Analysis of Transcriptomics in Bacterial Sepsis Across Multiple Datasets Reveals Three Robust Clusters. *Crit. Care Med.* **46**, 915–925 (2018).
127. Davenport, E. E. *et al.* Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **4**, 259–271 (2016).
128. Scicluna, B. P. *et al.* Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **5**, 816–826 (2017).
129. Almansa, R. *et al.* Quantification of Immune Dysregulation by Next-generation Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients. *Ann. Surg.* **269**, 545–553 (2019).
130. Reddy, B. *et al.* Point-of-care sensors for the management of sepsis. *Nat. Biomed. Eng.* **2**, 640–648 (2018).
131. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).
132. Wong, H. R. Genome-wide expression profiling in pediatric septic shock. *Pediatr. Res.* **73**, 564–569 (2013).
133. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273 (1986).
134. Baker, M. Digital PCR hits its stride. *Nat. Methods* **9**, 541–544 (2012).

135. Hindson, C. M. *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* **10**, 1003–1005 (2013).
136. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* **29**, 530–538 (2003).
137. Xing, K., Murthy, S., Liles, W. C. & Singh, J. M. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis--a systematic review. *Crit. Care Lond. Engl.* **16**, R7 (2012).
138. Paulus, P., Jennewein, C. & Zacharowski, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* **16 Suppl 1**, S11-21 (2011).
139. Walczak, M. *et al.* Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol. Rep. PR* **67**, 771–777 (2015).
140. Opal, S. M. & van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* **277**, 277–293 (2015).
141. Hsiao, S.-Y. *et al.* Concentration and value of endocan on outcome in adult patients after severe sepsis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **483**, 275–280 (2018).
142. Schmidt, E. P. *et al.* Urinary Glycosaminoglycans Predict Outcomes in Septic Shock and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 439–449 (2016).
143. Andaluz-Ojeda, D. *et al.* Superior accuracy of mid-regional proadrenomedullin for mortality prediction in sepsis with varying levels of illness severity. *Ann. Intensive Care* **7**, 15 (2017).
144. Shen, Z.-G., Guo, J.-L. & Li, D.-S. Screening of differentially expressed genes related to severe sepsis induced by multiple trauma with DNA microarray. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **18**, 734–739 (2014).
145. Cajander, S. *et al.* Preliminary results in quantitation of HLA-DRA by real-time PCR: a promising approach to identify immunosuppression in sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R223 (2013).

146. Cheng, Y., Dong, L., Zhang, J., Zhao, Y. & Li, Z. Recent advances in microRNA detection. *The Analyst* **143**, 1758–1774 (2018).
147. Postel, M., Roosen, A., Laurent-Puig, P., Taly, V. & Wang-Renault, S.-F. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **18**, 7–17 (2018).
148. Giannakopoulos, K. *et al.* The Use of Biomarkers in Sepsis: A Systematic Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **18**, 499–507 (2017).
149. Yazdan-Ashoori, P. *et al.* Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J. Crit. Care* **26**, 556–565 (2011).
150. Wong, H. R. *et al.* Testing the prognostic accuracy of the updated pediatric sepsis biomarker risk model. *PloS One* **9**, e86242 (2014).
151. Solan, P. D. *et al.* A novel role for matrix metalloproteinase-8 in sepsis. *Crit. Care Med.* **40**, 379–387 (2012).
152. Kangelaris, K. N. *et al.* Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L1102-1113 (2015).
153. Basu, R. K. *et al.* Identification of candidate serum biomarkers for severe septic shock-associated kidney injury via microarray. *Crit. Care Lond. Engl.* **15**, R273 (2011).
154. Alder, M. N., Opoka, A. M., Lahni, P., Hildeman, D. A. & Wong, H. R. Olfactomedin-4 Is a Candidate Marker for a Pathogenic Neutrophil Subset in Septic Shock. *Crit. Care Med.* **45**, e426–e432 (2017).
155. Wang, M., Zhang, Q., Zhao, X., Dong, G. & Li, C. Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the Emergency Department: an observational study. *Crit. Care Lond. Engl.* **18**, 634 (2014).
156. Zhang, A. *et al.* Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* **20**, 41 (2016).

157. Parnell, G. P. *et al.* Identifying key regulatory genes in the whole blood of septic patients to monitor underlying immune dysfunctions. *Shock Augusta Ga* **40**, 166–174 (2013).
158. Nelson, A., Berkestedt, I., Schmidtchen, A., Ljunggren, L. & Bodelsson, M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock Augusta Ga* **30**, 623–627 (2008).
159. Sallisalmi, M., Tenhunen, J., Yang, R., Oksala, N. & Pettilä, V. Vascular adhesion protein-1 and syndecan-1 in septic shock. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **56**, 316–322 (2012).
160. Struck, J., Tao, C., Morgenthaler, N. G. & Bergmann, A. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides* **25**, 1369–1372 (2004).
161. Leung, B. P. *et al.* A role for IL-18 in neutrophil activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 2879–2886 (2001).
162. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
163. Standish, A. J. & Weiser, J. N. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 2602–2609 (2009).
164. Cramer, E. P. *et al.* Lipocalin-2 from both myeloid cells and the epithelium combats *Klebsiella pneumoniae* lung infection in mice. *Blood* **129**, 2813–2817 (2017).
165. Atkinson, S. J. *et al.* Matrix Metalloproteinase-8 Augments Bacterial Clearance in a Juvenile Sepsis Model. *Mol. Med. Camb. Mass* **22**, 455–463 (2016).
166. Miethke, M. & Skerra, A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1580–1589 (2010).
167. Blázquez-Prieto, J., López-Alonso, I., Huidobro, C. & Albaiceta, G. M. The Emerging Role of Neutrophils in Repair after Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **59**, 289–294 (2018).

168. González-López, A. *et al.* MMP-8 deficiency increases TLR/RAGE ligands S100A8 and S100A9 and exacerbates lung inflammation during endotoxemia. *PLoS One* **7**, e39940 (2012).
169. Okubo, K. *et al.* Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* **10**, 204–215 (2016).
170. Bauzá-Martínez, J. *et al.* Proteolysis in septic shock patients: plasma peptidomic patterns are associated with mortality. *Br. J. Anaesth.* **121**, 1065–1074 (2018).
171. Becker, B. F., Jacob, M., Leipert, S., Salmon, A. H. J. & Chappell, D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 389–402 (2015).
172. Kuravi, S. J. *et al.* Neutrophil serine proteases mediate inflammatory cell recruitment by glomerular endothelium and progression towards dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **27**, 4331–4338 (2012).
173. Schubert-Unkmeir, A. *et al.* Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog.* **6**, e1000874 (2010).
174. Macdonald, S. P. J. *et al.* Resistin and NGAL are associated with inflammatory response, endothelial activation and clinical outcomes in sepsis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **66**, 611–619 (2017).
175. Patterson, E. K., Cepinkas, G. K., Inoue, K. & Fraser, D. D. Sepsis-Associated Elastase and Proteinase 3 Induce Endothelial Permeability. *FASEB J.* **31**, 978.11-978.11 (2017).
176. Wong, H. R. *et al.* A Multibiomarker-Based Model for Estimating the Risk of Septic Acute Kidney Injury. *Crit. Care Med.* **43**, 1646–1653 (2015).
177. Macdonald, S. P. J. *et al.* Sustained elevation of resistin, NGAL and IL-8 are associated with severe sepsis/septic shock in the emergency department. *PLoS One* **9**, e110678 (2014).

178. Wang, B. *et al.* Increased Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin is Associated with Mortality and Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Shock Augusta Ga* **44**, 234–238 (2015).
179. Chang, W. *et al.* Predictive utilities of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in severe sepsis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **481**, 200–206 (2018).
180. Daix, T. *et al.* Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* **154**, 617–627 (2018).
181. Cowland, J. B. & Borregaard, N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 989–995 (1999).
182. Salzer, U., Mairhofer, M. & Prohaska, R. Stomatin: A New Paradigm of Membrane Organization Emerges. 14.
183. Dunning, J. *et al.* Progression of whole-blood transcriptional signatures from interferon-induced to neutrophil-associated patterns in severe influenza. *Nat. Immunol.* **19**, 625–635 (2018).
184. Almansa, R. *et al.* Transcriptomic depression of immunological synapse as a signature of ventilator-associated pneumonia. *Ann. Transl. Med.* **6**, 415 (2018).
185. Daiber, A. *et al.* Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 1591–1619 (2017).
186. Darwish, I. & Liles, W. C. Emerging therapeutic strategies to prevent infection-related microvascular endothelial activation and dysfunction. *Virulence* **4**, 572–582 (2013).
187. Tarbell, J. M. & Cancel, L. M. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J. Intern. Med.* **280**, 97–113 (2016).
188. Marik, P. E., Khangoora, V., Rivera, R., Hooper, M. H. & Catravas, J. Hydrocortisone, Vitamin C, and Thiamine for the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock: A Retrospective Before-After Study. *Chest* **151**, 1229–1238 (2017).

189. Barabutis, N., Khangoora, V., Marik, P. E. & Catravas, J. D. Hydrocortisone and Ascorbic Acid Synergistically Prevent and Repair Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Endothelial Barrier Dysfunction. *Chest* **152**, 954–962 (2017).
190. Soehnlein, O., Lindbom, L. & Weber, C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* **114**, 4613–4623 (2009).
191. Song, E. *et al.* Deamidated lipocalin-2 induces endothelial dysfunction and hypertension in dietary obese mice. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e000837 (2014).
192. Manchanda, K. *et al.* MPO (Myeloperoxidase) Reduces Endothelial Glycocalyx Thickness Dependent on Its Cationic Charge. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 1859–1867 (2018).
193. Safaeian, L., Javanmard, S. H., Mollanoori, Y. & Dana, N. Cytoprotective and antioxidant effects of human lactoferrin against H₂O₂-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Adv. Biomed. Res.* **4**, 188 (2015).
194. Cheng David *et al.* Inhibition of MPO (Myeloperoxidase) Attenuates Endothelial Dysfunction in Mouse Models of Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1448–1457 (2019).
195. Qiu, Z. *et al.* Inhibition of neutrophil collagenase/MMP-8 and gelatinase B/MMP-9 and protection against endotoxin shock. *J. Immunol. Res.* **2014**, 747426 (2014).
196. Dey, T., Kalita, J., Weldon, S. & Taggart, C. C. Proteases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Clin. Med.* **7**, (2018).
197. Oeschger, T., McCloskey, D., Koppaarth, V., Singh, A. & Erickson, D. Point of Care Technologies for Sepsis Diagnosis and Treatment. *Lab. Chip* **19**, 728–737 (2019).
198. Fischer, S. K., Williams, K., Wang, L., Capio, E. & Briman, M. Development of an IL-6 point-of-care assay: utility for real-time monitoring and management of cytokine release syndrome and sepsis. *Bioanalysis* **11**, 1777–1785 (2019).
199. Cao, J., Seegmiller, J., Hanson, N. Q., Zaun, C. & Li, D. A microfluidic multiplex proteomic immunoassay device for translational research. *Clin. Proteomics* **12**, 28 (2015).

200. Gupta, V. *et al.* Bioanalytical qualification of clinical biomarker assays in plasma using a novel multi-analyte Simple Plex™ platform. *Bioanalysis* **8**, 2415–2428 (2016).