



---

**Universidad de Valladolid**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y  
FARMACOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL:  
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA  
SINAPSIS INMUNOLÓGICA POR PCR DIGITAL: APLICACIONES  
EN LA SEPSIS**

**SILVIA MARTÍN ALFONSO**

Valladolid, 2019





---

**Universidad de Valladolid**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y  
FARMACOLOGÍA

Programa Oficial de Doctorado en Investigación en Ciencias de la  
Salud

**TESIS DOCTORAL:**

**CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA  
SINAPSIS INMUNOLÓGICA POR PCR DIGITAL: APLICACIONES  
EN LA SEPSIS**

Presentado por Dña. Silvia Martín Alfonso para optar al grado de  
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigido por:

Dr. Jesús Bermejo Martín y Dr. Cesar Aldecoa Alvarez-Santullano

Tutor:

Eduardo Tamayo

*Parte de 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].*



## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

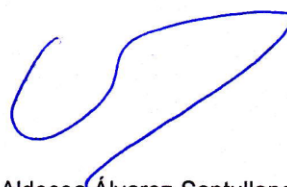
D. JESÚS F. BERMEJO MARTÍN con D.N.I. nº 09344393E Doctor en Medicina y Cirugía, licenciado especialista en Inmunología Clínica. Investigador principal del Laboratory of Biomedical Research in Sepsis (bio.sepsis), D. CESAR ALDECOA ALVAREZ-SANTULLANO con D.N.I. nº 11404508G Doctor en Medicina y Cirugía, licenciado especialista en Anestesiología y Reanimación, jefe de servicio en el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, como directores de la tesis doctoral titulada: "CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA POR PCR DIGITAL: APLICACIONES EN LA SEPSIS" presentada por Dña. SILVIA MARTIN ALFONSO con D.N.I. nº 71163370J , alumna del Programa Oficial de Doctorado en Investigación en Ciencias de la Salud, autorizan la presentación de la misma, 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,...14.....de...JUNIO....de 2019

Los Directores de la Tesis,



Dr. J.F. Bermejo Martín



Dr. C. Aldecoa Álvarez-Santullano



*A mis Padres y Rober*

# Agradecimientos

Pensando en todo el mundo al que quiero dar las gracias me he dado cuenta de la cantidad de gente que me ha ayudado de una manera u otra y lo afortunada que me hace sentir. Así que, ¡gracias! A todas las personas que han puesto su granito de arena para que este trabajo vea la luz.

Gracias a todos mis compañeros de Anestesiología del Hospital Río Hortega que durante muchos meses, varios años de hecho, me han ayudado reclutando pacientes, recogiendo datos, muestras, etc. Gracias sobre todo por vuestra paciencia, pero también por vuestra indispensable y valiosa colaboración.

Gracias a mis directores de tesis, Dr. Jesús F. Bermejo Martín y Dr. César Aldecoa Álvarez-Santullano, en primer lugar, por confiar en mi para llevar este proyecto a cabo, pero también por el tiempo que habéis dedicado a dirigirlo y gracias a ello lo que he aprendido de vosotros. Jesús, siempre te estaré agradecida por permitirme trabajar con vuestro increíble equipo, he descubierto lo apasionante de la investigación a vuestro lado y realmente os admiro por el esfuerzo y dedicación que poneis en todo lo que hacéis. Quiero dar las gracias también al resto del equipo de investigación con el que he trabajado, en especial a Raquel, Marta y Alicia, que como Jesús habéis tenido tanta paciencia y amabilidad conmigo. Y por supuesto, gracias Cesar, por insistir cada en día en que no me conforme, que nuestro trabajo clínico sea mucho más, y darme la oportunidad de que así sea.

Gracias a las personas que más admiro en mi vida, mis padres Javier y Ana, de las que siempre he recibido apoyo y amor incondicional, pero también los valores de esfuerzo, trabajo, fuerza de voluntad, respeto, gratitud, humildad y honestidad. Gracias porque vosotros sois los que me habéis dado la posibilidad en la vida de que alcance lo que me proponga, y porque cuando no ha salido algo bien a la primera siempre habéis sido los primeros en animarme para volver a intentarlo. Estoy infinitamente orgullosa de vosotros, gracias por todo lo que me dais, muchas veces sin nada comparable a cambio.

Gracias al pilar fundamental de mi vida, Rober, mi compañero de vida, gracias porque sin tu ayuda y paciencia día a día nada sería posible. Gracias por mirar siempre hacia adelante y remar en la misma dirección, gracias porque haces que mi vida sea plena. Suerte la mía que apareciste en mi camino y gracias a ti que sigues guiándome en él cuando más lo necesito. De ti he aprendido que la prudencia, paciencia y perseverancia dan sus frutos, también lo importante que es ser feliz cada uno de los días de la vida, y no podría haber elegido mejor persona, de la que me sienta tan orgullosa, ni mejor acompañante en la vida.

Gracias a todos aquellos de los que recibo en el día a día una sonrisa, una buena palabra, a todos aquellos que siempre están en lo bueno y en lo malo. Gracias Laura y Ester que me habéis enseñado tanto y ayudado, gracias por vuestra amistad y porque veros en el hospital me alegra el día.

Gracias Sara, Emilse, Rocio, que buenos momentos hemos vivido, y todos los que vendrán. Gracias porque vuestra amistad no tiene precio, siempre estaréis ahí, como en la facultad, codo con codo ayudándonos en todo.

Solo puedo deciros a todos una vez más GRACIAS, de corazón.

*“Todo el mundo trata de realizar algo grande, sin darse cuenta de que la vida se compone de cosas pequeñas”.*

*Frank Clark.*

*“Todo llega a aquél que se apresura mientras espera”. “No encuentres fallos, encuentra un remedio”.*

*Henry Ford*



## ***Índice***

---

<b><u>INDICE</u></b>	<b>10-12</b>
<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	<b>13-16</b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	<b>17-18</b>
<b><u>I. INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>19-44</b>
<b>I.A) HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA SEPSIS.....</b>	<b>20-24</b>
<b>I.B) CONCEPTOS DE SEPSIS Y GRAVEDAD.....</b>	<b>24-38</b>
<i>I.B.1 Definiciones de consenso.....</i>	<i>24-28</i>
<i>I.B.2 Escalas de gravedad.....</i>	<i>28-34</i>
<i>I.B.3 Biomarcadores.....</i>	<i>34-38</i>
<b>I.C) SISTEMA INMUNE Y SEPSIS.....</b>	<b>38-42</b>
<b>I.D) TECNICAS PCR, PCR DIGITAL.....</b>	<b>42-44</b>
<b><u>II. JUSTIFICACIÓN</u></b>	<b>45-47</b>
<b><u>III. HIPÓTESIS</u></b>	<b>48-49</b>
<b><u>IV. OBJETIVOS</u></b>	<b>50-51</b>
<b>IV. A) OBJETIVO PRINCIPAL.....</b>	<b>51</b>
<b>IV.B) OBJETIVOS SECUNDARIOS.....</b>	<b>51</b>
<b><u>V. MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>52-59</b>
<b><u>VI. RESULTADOS</u></b>	<b>60-82</b>
<b><u>VII. DISCUSIÓN</u></b>	<b>83-96</b>



<b><u>VIII. CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>97-99</u></b>
<b><u>IX. RENDIMIENTO CIENTÍFICO</u></b>	<b><u>100-121</u></b>
<b><u>X. ANEXOS</u></b>	<b><u>122-130</u></b>
<b><u>XI. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>131-138</u></b>

## ***Abreviaturas***

---

## ABREVIATURAS

---

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** copia de cadena simple de Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácidos ribonucleicos

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**APACHE:** Acute physiology and chronic evaluation

**CD40LG:** Ligando Factor de Necrosis Tumoral

**CD3E:** Glicoproteína de superficie de las células T

**CD28:** Glicoproteína de superficie de las células T

**CID:** *Coagulación Intravascular Diseminada*

**CMH:** *Complejo mayor de histocompatibilidad*

**CPA:** *Célula presentadora de antígeno*

**dd PCR:** *Droplet digital PCR*

**EDTA:** *Ácido etilendiamino tetra acético*

**GM-CSF:** *Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos*

**GOT/AST:** *Aspartato aminotransferasa*

**GPT/ALT:** *Alanino aminotransferasa*

**HLA-DRA:** *Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II, DR alfa*

**HURH:** *Hospital Universitario Río Hortega*

**ICOS:** *Coestimulador inducible de las células T*

**IL:** *Interleucinas*

**IFN- $\gamma$ :** *Interferón  $\gamma$*

**Ig:** *Inmunoglobulina*

**LOD:** Logistic organ dysfunction

**MCP-1:** proteína quimiotáctica de monocitos

**MIF:** macrophage migration inhibitory factor

**MOSF:** Multiple organ system failure

**MPM:** Mortality probability model

**NK:** Natural Killers

**ODIN:** Organ dysfunction and/or infection

**OOP:** Optimal operating point

**OSF:** Organ system failure

**PCR:** Polymerasa Chain Reaction

**PCR:** proteína C reactiva

**PCT:** procalcitonina

**PD-1:** *receptor de muerte programada*

**PD-L1:** *Ligando del receptor de muerte programada*

**proADM:** pro-adrenomedulina

**REA:** *Unidad de Reanimación*

**Rpm:** *Revoluciones por minuto*

**qRT-PCR:** *Transcripción reversa en tiempo real Reacción en cadena de la polimerasa*

**SAPS:** *Simplified acute physiologic score*

**SDRA:** *Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo*

**SI:** *Sistema Inmune*

**SOFA:** *Sequential organ failure assessment.*

**TNF- $\alpha$** : *Factor de necrosis tumoral alfa*

**TTPA**: *Tiempo de tromboplastina parcial activado*

**UCI**: *Unidad de cuidados intensivos*

## *Resumen*

---

## RESUMEN

---

La sepsis es uno de los mayores problemas de nuestros días que ha de afrontar la sanidad en todo el mundo, siendo una de las patologías más prevalentes en los servicios de urgencias y cuidados críticos, constituyendo la primera causa de muerte no coronaria a nivel mundial. Debido a su elevada morbilidad y mortalidad, es una grave amenaza cuando se diagnostica y además cuenta con un incremento progresivo en su prevalencia e incidencia, siendo un serio reto para el sistema sanitario también debido a la carga socioeconómica que representa.

En concreto en los pacientes quirúrgicos, algunos de los signos que nos podrían hacer pensar en el diagnóstico de esta enfermedad pueden enmascarse debido a la propia cirugía o a su manejo farmacológico. Debido a esto, es primordial que podamos contar con biomarcadores que puedan diagnosticar la sepsis de la forma más precoz y fiable posible.

En la sepsis vemos cómo coexiste el desarrollo de un inmunofenotipo proinflamatorio, y por otro lado una depresión en los niveles de expresión de los genes que codifican las moléculas implicadas en la sinapsis inmunológica, es decir, los genes codificantes de las moléculas presentadoras de antígeno.

Esta tesis doctoral trata de mostrar la utilidad de la cuantificación del grado de inmunosupresión en el diagnóstico de la sepsis y además cómo puede mejorarse el diagnóstico de la enfermedad gracias a la combinación de un marcador que valora la inmunosupresión con un biomarcador clásico como la procalcitonina. Para ello, cabe destacar que nuestro trabajo es pionero en el uso de una nueva tecnología de PCR de tercera generación para la cuantificación de expresión génica, la PCR digital (ddPCR).

## ***I. Introducción***

---



## I. INTRODUCCIÓN

---

### I.A) HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA SEPSIS

La sepsis es uno de los mayores problemas sanitarios de nuestros días. Esta enfermedad presenta una elevada morbilidad y mortalidad, suponiendo un motivo de actuación urgente cuando se diagnostica. Debido al incremento progresivo en su prevalencia e incidencia, representa una importante carga socioeconómica para el sistema sanitario. Además, es una de las patologías más prevalentes en los servicios de urgencias y en las unidades de cuidados de críticos (UCI), constituyendo la primera causa de muerte no coronaria a nivel mundial.

#### ❖ **EPIDEMIOLOGIA**

La sepsis es una enfermedad frecuente, con una incidencia global estimada del 27%. La mortalidad asociada a shock séptico es elevada, oscilando entre el 40% y el 70% en pacientes independientemente de su edad, tanto si ha sido adquirida en la comunidad o bien en pacientes hospitalizados. Es responsable de más fallecimientos que otras patologías frecuentes como el cáncer de mama, próstata o el infarto agudo de miocardio<sup>1</sup>.

Estudios a nivel mundial afirman que la incidencia de sepsis, sepsis grave o shock séptico continúa aumentando a razón de 750.000 casos por año, con mayor frecuencia en hombres de raza negra y con gran protagonismo microbiológico de las bacterias Gram positivas y hongos<sup>2</sup>. Siguiendo esta estimación se ha pronosticado un aumento de la sepsis grave en Estados Unidos de 800.000 a 1.600.000 casos para el año 2050<sup>3</sup>.

En Europa, cabe destacar el estudio SOAP<sup>4</sup> (*Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients*) realizado en una muestra amplia y heterogénea de pacientes hospitalarios, el cual afirma que la sepsis ya en la actualidad podría ser la enfermedad más frecuentemente atendida en las UCIs, incrementando la mortalidad y el gasto económico comparado con otras patologías de similar prevalencia.

Aunque serían necesarios registros más exhaustivos sobre epidemiología de la sepsis en Europa, la evidencia científica afirma que la incidencia de la enfermedad se incrementa de forma progresiva como ocurre a nivel mundial, estimando en un 40% de media los costes causados por esta patología en las UCIs.

Se estima que hay 18 millones de casos de sepsis que ocurren cada año en el mundo. Sólo en Reino Unido mueren 37.000 personas al año por sepsis<sup>5</sup>, siendo atribuible un 49,7% a la mortalidad debida al desarrollo de shock séptico.

Recientemente, la Sociedad Europea de Medicina de Cuidados Intensivos (ESICM) y la Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos (SCCM) están poniendo en marcha el protocolo llamado IMPRESS para determinar la epidemiología mundial de la sepsis<sup>6</sup>.

En España, extrapolando los datos de los que disponemos, se estima la incidencia de sepsis al año en 74.000 casos, de los cuales un 40% presentarían shock séptico con una mortalidad media asociada de un 35%<sup>7</sup>.

Algunos estudios en nuestro país datan la mortalidad media de los pacientes con shock séptico en el 45,8% y las estimaciones realizadas a partir de ellos dimensionan el problema en 50.000 casos nuevos de sepsis grave cada año, una incidencia de shock séptico de 31 casos/100.000 habitantes año y 17.000 fallecimientos anuales por sepsis, de los cuales el 70% de los casos fallece durante los tres primeros días a partir del diagnóstico<sup>8</sup>.

Además, debemos tener presente el aumento progresivo de la población anciana, en la que existen diversos factores que les predisponen a un mayor riesgo de desarrollar formas graves de sepsis, como las comorbilidades asociadas que padecen, el estado previo al ingreso padeciendo frecuentemente malnutrición, fragilidad, y por supuesto, la alteración del sistema inmune conocido como inmunosenescencia<sup>9</sup>. El porcentaje de personas mayores de 60 años en el año 1950 era entorno el 8% de la población mundial, incrementándose este porcentaje al 10% en el año 2000, y se estima que sea del 21% en el año 2050<sup>10</sup>. Además, en las próximas décadas se prevé que la población más envejecida, por encima de los 80 años, crezca al doble de la actual siendo en el 2050 el 9.6% de la población total en Europa y entorno al 9% en América del Norte<sup>3</sup>.

## ❖ **HISTORIA**

Desde la antigüedad hay tratados médicos en los que se deja constancia del terrible cuadro que sufrían algunas personas y la posible extensión generalizada de una infección, y de los remedios que se utilizaban para evitarlo. Así en el “papiro Ebers”, compuesto en escritura hierática egipcia hacia el año 1550 a.C., se describen 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”<sup>11</sup>.

La palabra sepsis viene del griego σήψις (sipsis) que significa putrefacción: σῆψ- σήπω (gr. ‘pudrir’) más el sufijo -σις σήψις (pudrir-se). Homero fue el primero en usarla hace más de 2700 años, la consideraban una descomposición biológica que ocurría dentro del cuerpo causada por unos “principios internos” capaces de provocar una peligrosa autointoxicación, resultante en una putrefacción maloliente<sup>12</sup>. Este concepto de “generación espontánea” perduró hasta el siglo XIX<sup>13</sup>.

No usó como tal el término sepsis, pero el médico griego Hipócrates (460-370 a.C) fue probablemente el primero en describir el curso clínico del shock séptico y años después el filósofo florentino Niccolò Maquiavelo (1469-1527) describió lo difícil que era diagnosticar la enfermedad así como tratarla<sup>14</sup>.

Por otro lado, el concepto de contagio fue formulado por primera vez en 1546 por el médico italiano Girolamo Fracastoro, proponiendo que las enfermedades epidémicas pueden ser comunicadas por contacto directo o indirecto a través del aire, por semillas o gérmenes invisibles<sup>15</sup>. Sin embargo, no fue hasta 1683 cuando se hicieron posibles las primeras observaciones microscópicas de la mano de Anthony van Leeuwenhoek<sup>16</sup>.

Dos siglos más tarde, en 1847, el médico húngaro Ignaz Semmelweis, gracias a su observación consiguió relacionar la fiebre puerperal desarrollada por las parturientas que eran asistidas durante el parto por los obstetras estudiantes de medicina que habían participado previamente en autopsias, a diferencia de las parturientas atendidas por matronas con

menores casos de ésta enfermedad<sup>17</sup>. Fue un hito fundamental que introdujo las prácticas antisépticas antes de los exámenes de las pacientes. Obligó al lavado de las manos con una solución de cal antes de las exploraciones ginecológicas lo que redujo la tasa de mortalidad de fiebre puerperal del 18% al 3 %. Esto representó el primer ensayo clínico en enfermedades infecciosas jamás realizado<sup>18</sup>.

En la segunda mitad del siglo XIX, Louis Pasteur realizó un elegante experimento demostrando que el proceso de putrefacción no tiene lugar sin la participación de organismos vivos y poco después, en la década de 1870, Robert Koch describió los agentes etiológicos de enfermedades como el ántrax, la tuberculosis o el cólera<sup>19</sup>. Fue el inicio para intentar impedir la entrada de microorganismos en el cuerpo humano, lo que llevó a Joseph Lister, (1827-1912) cirujano del Hospital Real de Glasgow, a desarrollar métodos antisépticos en los procedimientos quirúrgicos al observar que las fracturas abiertas se infectaban más que las cerradas<sup>20</sup>.

En 1892 Richard Pfeiffer (1858-1945) que trabajó con Robert Koch, definió el concepto de "endotoxina" como un veneno bacteriano termoestable y responsable de las consecuencias fisiopatológicas de ciertas enfermedades infecciosas, diferenciando este concepto de las "exotoxinas" que son termolábiles. En 1909 se recogen y publican por primera vez los primeros doce casos de pacientes con sepsis por Gram negativos, causada por *Escherichia coli*, falleciendo el 50% de los infectados<sup>21</sup>.

No fue hasta 1914, cuando el médico alemán Hugo Schottmüller hizo la primera definición científica de sepsis: "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"<sup>22</sup>.

Pero fue William Osler (1849-1919) el primero en reconocer el importante papel de la respuesta del huésped en la sepsis y entenderla tal y como lo hacemos en la actualidad en uno de sus famosos libros "The Evolution of modern Medicine", donde cita: "salvo en contadas ocasiones, el paciente parece morir de la respuesta del cuerpo a la infección en lugar de por la infección"<sup>23</sup>,

<sup>24</sup>.

En 1967 Ashbaugh et al. describe por primera vez un cuadro clínico de inicio agudo que hoy diagnosticamos como Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) y Tilney en 1973 publica por primera vez un síndrome clínico en el que hay fallo progresivo de varios órganos<sup>25</sup>. En los años 90 el Dr. Bone establece que la disregulación de la respuesta inflamatoria sistémica en el contexto de un proceso séptico entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios desencadena la disfunción orgánica<sup>26</sup>.

Es en 1992 cuando el ACCP (*American College of Chest Physicians*) y la SCCM (*Society of Critical Care Medicine*) se reúnen por primera vez en una conferencia con el fin de aunar conceptos y elaborar las definiciones que serían usadas en la clínica y en los trabajos de investigación<sup>27</sup>.

Aún hoy en día, las definiciones de los conceptos clínicos relacionados con la sepsis siguen creando controversia y debate entre los expertos. Además, continúa siendo un reto importante el manejo de la sepsis, requiriendo gran cantidad de recursos y habilidades médicas para el tratamiento satisfactorio del shock séptico. En lo que sí coinciden todos los profesionales médicos es en la vital importancia del diagnóstico precoz y certero como parte fundamental del éxito del tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

## **I.B) CONCEPTOS DE LA SEPSIS Y GRAVEDAD**

### ***I.B.I DEFINICIONES DE CONSENSO***

Debido a la complejidad y ambigüedad para definir la sepsis y los términos relacionados con ella, hasta los años 90 no existió ninguna terminología. En 1980, Roger Bone propone el término de “Síndrome sepsis” definido ya entonces como: hipotermia (< 35°C) o hipertermia (>38,3°C), taquicardia (>90 lpm), taquipnea (>20 rpm), evidencia clínica de foco de infección, y la presencia de al menos disfunción o mala perfusión de un órgano (hipoxemia, lactato elevado, oliguria)<sup>28</sup>. A pesar de que este término ha sido usado como criterios de inclusión para los

estudios clínicos, el síndrome séptico no define satisfactoriamente a un grupo homogéneo de pacientes<sup>29, 30</sup>.

Es en 1992 cuando tienen lugar las conferencias de consenso del *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine* (ACCM/SCCM) con la intención de unificar criterios, y crear nuevas definiciones sobre la sepsis y los procesos relacionados. El resultado de esta conferencia fue la introducción de un nuevo término "*Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica*" (SIRS). El SIRS se define por la presencia de al menos dos de cuatro de los anteriores mencionados criterios clínicos, y representa una respuesta inflamatoria de cualquier etiología, incluida la *Sepsis*, la cual es definida cuando se confirma además infección. Sepsis asociada a disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión, se definió como *Sepsis severa*, y *Shock séptico* fue definido como sepsis severa relacionada además a hipotensión refractaria a tratamiento de resucitación con fluidos<sup>27</sup>.

De la conferencia se propuso otro nuevo termino llamado "*Síndrome de disfunción multiorgánica*" (MODS), definido como "la presencia de disfunción orgánica de forma aguda en los pacientes en los cuales no son capaces de mantener su homeostasis sin tratamiento". Se han creado numerosas escalas desde entonces para intentar cuantificar el grado de fallo orgánico, así como también el grado de morbilidad posterior en los pacientes<sup>27, 31</sup>.

Pronto se crearon nuevas controversias en torno al termino establecido de SIRS tras la conferencia de 1992. Un importante número de investigadores no estaban conformes con esta definición, para los cuales era muy sensible y poco específica. Debido a ello se convocó una nueva reunión en 2001 en la cual se modificó los criterios de SIRS, y se validaron el resto de definiciones (tabla 1).

CONCEPTO	DEFINICIÓN/CRITERIOS
<b>SIRS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura &gt; 38°C o &lt; 36°C</li> <li>• Taquicardia &gt; 90 lpm</li> <li>• Taquipnea &gt; 20 rpm o PaCo2 &lt; 32mmHg</li> <li>• Leucocitosis 12x10<sup>9</sup>/L o Leucopenia &lt;4x10<sup>9</sup>/L o &gt;10% formas inmaduras</li> </ul>
<b>Sepsis</b>	Infección conocida o sospechada + al menos 2 criterios de SIRS
<b>Sepsis Grave</b>	Sepsis más disfunción orgánica o hipoperfusión
<b>Shock Séptico</b>	Sepsis con hipotensión dependiente de vasopresores
<b>Disfunción Multiorgánica</b>	Presencia de disfunción orgánica en paciente con patología aguda cuya homeostasis no puede ser mantenida

Tabla 1: Definiciones de la conferencia internacional 2001

En 2002 se introduce el sistema **PIRO** (**P**redisposición, **I**nfección, **R**espuesta, **D**isfunción **O**rgánica) en base a los factores pronósticos relacionados con la sepsis, pretendiendo hacer una clasificación similar a la TNM tumoral<sup>32</sup> (tabla 2).

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

Tabla 2. Sistema PIRO introducido en 2002

En este sistema si se tuvieron en cuenta las clasificaciones sugeridas por los participantes de las conferencias realizadas para la definición de sepsis y también la estratificación de los pacientes tanto por los datos de laboratorio como por criterios clínicos de acuerdo a los factores que propone.

En 2004, con el objetivo de disminuir la mortalidad causada por la sepsis grave y el shock séptico, diferentes organizaciones como la “Sociedad Europea de Medicina y Cuidados Intensivos”, el “Foro de Sepsis Internacional”, o la “Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos”, pusieron en marcha una serie de iniciativas, como las guías internacionales de la “Campaña para sobrevivir a la Sepsis” (SSC) publicadas en revistas de alto factor de impacto como “*Critical Care Medicine*”<sup>33</sup> e “*Intensive Care Medicine*”<sup>33</sup>, donde se resumen las pautas de actuación clínica sobre sepsis grave y shock séptico, actualizándose en 2012, publicadas en 2013<sup>34, 35</sup> (tabla 3).

Según la modificación de las guías de la SSC del 2012, se definen los criterios de sepsis como:

CONCEPTO	DEFINICIÓN	CRITERIOS
<b>Sepsis</b>	Infección conocida o sospechada asociada a manifestaciones clínicas	<i>Manifestaciones clínicas:</i> -Temperatura > 38°C o < 36°C -Taquicardia > 90 lpm -Taquipnea > 20 rpm o PaCo2 < 32mmHg -Leucocitosis 12x10 <sup>9</sup> /L o Leucopenia <4x10 <sup>9</sup> /L o >10% formas inmaduras
<b>Sepsis Severa</b>	Sepsis + disfunción de un órgano o hipoperfusión tisular secundaria a la infección	<i>Hipoperfusión tisular:</i> -Hipotensión (TAS<90mmHg o disminución de >40mmHg en TAS basal) -Lactato elevado -Oliguria -Confusión, obnubilación del SNC
<b>Shock Séptico</b>	Hipotensión refractaria a pesar de adecuada resucitación con fluidoterapia que precisa de vasopresores	

Tabla 3. Criterios diagnósticos de SSC, publicadas en 2013

En 2016 una nueva conferencia “*The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock*” (SEPSIS-3), remodela las definiciones nuevamente, eliminando el concepto de SIRS y sepsis severa, y pone el foco en la fisiopatología de la sepsis, que cobra una mayor relevancia en las nuevas definiciones<sup>36</sup>:



Además, se introduce un nuevo concepto llamado “q SOFA” (*quick SOFA*) basado en la escala de gravedad más usada por las unidades de cuidados críticos, la escala SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), que trata de poner a los clínicos en la pista con antelación a posibles pacientes que pueden estar desarrollando infección y disfunción orgánica (tabla 4).

CRITERIOS q SOFA (Quick SOFA)
-Frecuencia respiratoria > 22 rpm
-Glasgow Coma Scale (GCS) 13 o <
-Presión arterial sistólica (PAS) < o = 100 mmHg

Tabla 4. Criterios q SOFA. Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)

Así pues, queda definido el fallo multiorgánico como un cambio agudo en la escala SOFA, con un incremento de >2 puntos en la escala SOFA, secundario a un proceso infeccioso, asumiendo una puntuación de 0 en los pacientes en los que se desconoce la existencia previa de disfunción orgánica.

Se define **SEPSIS** como *infección sospechada o documentada asociada a un incremento agudo en > o = 2 puntos en la escala SOFA*, Y **SHOCK SEPTICO** como sepsis asociada a la necesidad del uso de vasopresores para mantener un TAM > o = 65 mm Hg y presencia de lactato >2mmol/L a pesar de una correcta fluidoterapia<sup>37</sup>.

### ***I.B.2 ESCALAS DE GRAVEDAD***

Las escalas de gravedad son instrumentos de diagnóstico, así como pronóstico, y de ayuda también en la toma de decisiones terapéuticas en los pacientes sépticos. Estas escalas son diseñadas a partir de grandes bases de datos donde hay numerosas variables de mayor impacto sobre la gravedad de la sepsis. Las variables que son parte de un específico “score” (escala) deben ser previamente ponderadas tanto por la opinión de expertos como datos estadísticos que las validen.

Fundamentalmente, las escalas de gravedad han de cumplir con dos características; tener capacidad de predecir la supervivencia valorada en función de su curva ROC (*“Receiver Operating Characteristic”*), y en segundo lugar, ser capaz de discriminar o la capacidad de exactitud ante la predicción dada<sup>38</sup>.

Una de las principales dificultades que encuentra la aplicación de estas escalas, es debida principalmente a la variedad de los casos tratados, siendo este un impedimento importante en su utilización real para la toma de decisiones individuales, pero si pudiendo ofrecer una orientación general.

En los índices de gravedad, atendiendo al pronóstico de un paciente tratado en una unidad de cuidados intensivos, las variables podemos clasificarlas en crónicas y agudas. Las crónicas son la edad y las enfermedades crónicas anteriores al primer día de diagnóstico de sepsis. Las agudas son los desórdenes fisiológicos o las disfunciones orgánicas.

Por lo tanto, en líneas generales podemos clasificar las escalas de gravedad según sean objetivas o subjetivas, y en función de si son índices usados durante el primer día de enfermedad o a lo largo de la estancia en UCI (Tabla 5).

		INDICE
Índices “del 1 <sup>a</sup> día”	Objetivos	SAPS II APACHE III MPM II LOD
	Subjetivos	SAPS I APACHE II
Índices durante la estancia	Subjetivos	OSF ODIN MOSF SOFA LOD

*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 organsystem failure; SOFA: Sequential organ failure assessment.*

*Tabla 5. Clasificación de las principales escalas de gravedad.*

Los principales índices de gravedad más usados en las UCI son:

**APACHE-II (“Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II”):** (Imagen 1) Es un sistema de valoración pronóstica de mortalidad a través de la medición de 12 variables fisiológicas que obtienen un valor final que es predictivo de mortalidad. Por tanto, es una escala estática que se mide en el momento de ingreso utilizando los peores valores obtenidos en las primeras 24h de este<sup>39</sup>. Aun existiendo actualizaciones del APACHE, siendo la última versión el APACHE IV, no son tan usadas por las UCI, cuyos especialistas siguen utilizando esta versión.

Las ventajas de los índices denominados del primer día, como la escala APACHE II es que las variables se registran una sola vez durante la estancia: el día del ingreso del paciente. Se anotan las principales características del paciente y de su enfermedad y se evalúan según su importancia en la determinación del pronóstico.

Se considera un índice de primera generación ya que es subjetivo y está basado en un modelo de probabilidad. La puntuación APACHE II refleja la gravedad de la sepsis y se correlaciona adecuadamente durante las primeras 24 horas con la mortalidad, a mayor puntuación mayor mortalidad. Por esta razón, se considera un índice del primer día<sup>40</sup>.

**SAPS III (“Simplified Acute Physiology Score”):** (Imagen 2) Se trata de una escala simplificada similar al APACHE-II, que evalúa la gravedad. Su valor se haya con los peores datos de las primeras 24h tras el ingreso del paciente en la UCI<sup>41</sup>.

**SOFA (“Sequential Organ Failure Assessment”):** (Imagen 3) Al mismo tiempo que las escalas de primer día, se crean escalas para determinar el fallo de órgano durante la estancia en UCI de un mismo paciente. Esta escala es dinámica, y por consiguiente utilizada para la evaluación continua de la situación de seis órganos o sistemas<sup>42</sup>. Es una escala sencilla y fácil de calcular, siendo capaz de independizar el grado de disfunción de cada órgano de una manera secuencial en el tiempo.

**MEDS (“Mortality in Emergency Department Sepsis”):** (Imagen 4) Consiste en una escala que predice mortalidad a los 28 días utilizada fundamentalmente en los servicios de urgencias en los pacientes sépticos, y que se realiza valorando ocho variables<sup>43</sup>.

**IPS (“Infection Probability Score”):** (Imagen 5) En esta escala se predice la infección valorando seis variables fácilmente medibles. Cuando el resultado es inferior a 14 la probabilidad de infección se reduce a un 10%<sup>44</sup>.

**CPIS (“Clinical Pulmonary Infection Score”):** (Imagen 6) Se trata de una escala predictora de NAV, y para ello evalúa seis ítems relacionados con infección<sup>45</sup>. Es una herramienta complementaria a otros marcadores diagnósticos pero no posee buena sensibilidad ni especificidad tanto diagnóstica como pronóstica<sup>46</sup>.

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

Imagen 1. Escala de gravedad del primer día APACHE II. ( 0-4 puntos; 4% probabilidad mortalidad, 5-9 puntos; 8 % probabilidad de mortalidad, 10-14 puntos; 15% probabilidad de mortalidad, 15-19 puntos; 25% probabilidad de mortalidad, 20-24 puntos; 40% probabilidad de mortalidad, 25-29 puntos; 55% probabilidad mortalidad, 30-34 puntos; 75% probabilidad de mortalidad, >34 puntos: 85% probabilidad de mortalidad)

SAPS 3

SAPS 3, señalar con x y valor												
TABLA 1	Valor	0	3	5	6	7	8	9	11	13	15	18
10. Edad (años)		<40		>40<60				>60 <70		>70 <75	>75 <80	>80
11. Comorbilidades CA (Cáncer) sí/no			Terapia CA		ICC NY IV CA Hematólogo			Cirrosis BIDA		CA		
12. Estancia hospitalaria previa a UCI (días)		<14			>14<28	>28						
13. Procedencia sí/no				urgencias			Otra UCI	Otro lugar del hospital				
14. Uso antes de UCI sí/no			vasoactivos									

TABLA 2, señalar con x y valor	Valor	0	3	4	5	6
15. Admisión a UCI sí/no				No planeada		
16. Cirugía a la admisión sí/no			Cx electiva		No cx	Cx emergencia
17. Infección aguda al ingreso sí/no				Nosocomial	Pulmonar	

TABLA 3. Señalar con x y valor	Valor	15	13	11	10	8	7	5	3	2	0	2	4	5	7	8
20. Glasgow		3-4			5		6			7-12	>13					
21. Bilirubina											<2		3-6	>6		
22. Temperatura							<35				>35					
23. Creatinina											<1,2	1,2-2			>2,5	>3,5
24. Frecuencia cardíaca										<120				>120-160	>160	
25. Leucocitos milés											<15	>15				
26. PH											<7,25	>7,25				
27. Plaquetas en milés			<20			25-35	55-100				>100					
28. Presión sistólica					<40	40-70			70-120		>120					
29. PAFI o PaO2				<100 y VM			>100 y VM	PaO2=60 en VM			>60 en VM					

Imagen 2. Score SAPS III (Hasta 21 puntos; 0% mortalidad, 22-44 puntos; 1-10% probabilidad mortalidad, 44-52 puntos; 10-20 % probabilidad de mortalidad, 53-57 puntos; 20-30% probabilidad de mortalidad, 58-62 puntos; 30-40% probabilidad de mortalidad, 63-67 puntos; 40-50% probabilidad de mortalidad, 68-72 puntos; 50-60% probabilidad mortalidad, 73-78 puntos; 60-70% probabilidad de mortalidad, 79-86 puntos; 70-80% probabilidad de mortalidad, 87-96 puntos; 80-90% probabilidad de mortalidad, 91-112 puntos; 90-95% probabilidad de mortalidad, 113-159 puntos; 95-99% probabilidad de mortalidad, 160-229 puntos; 100% probabilidad de mortalidad)

Escala SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment)

	0	1	2	3	4
Respiración <sup>a</sup> PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> (mm Hg) o SaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	>400	<400 221-301	<300 142-220	<200 67-141	<100 <67
Coagulación Plaquetas 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	>150	<150	<100	<50	<20
Hígado Bilirubina (mg/dL)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Cardiovascular <sup>b</sup> Tensión arterial	PAM ≥70 mmHg	PAM <70mm Hg	Dopamina a <5 o dobutamina a cualquier dosis	Dopamina a dosis de 5,1-15 o Epinefrina a ≤ 0,1 o Norepinefrina a ≤ 0,1	Dopamina a dosis de >15 o Epinefrina > 0,1 o Norepinefrina a > 0,1
Sistema Nervioso Central Escala de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina (mg/dL) o flujo urinario (mL/d)	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 <500	>5,0 <200

PaO<sub>2</sub>: presión arterial de oxígeno; FIO<sub>2</sub>: fracción de oxígeno inspirado; SaO<sub>2</sub>, Saturación arterial de oxígeno periférico; PAM, presión arterial media; <sup>a</sup>PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> es relación utilizada preferentemente, pero si no esta disponible usaremos la SaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>; <sup>b</sup>Medicamentos vasoactivos administrados durante al menos 1 hora (dopamina y norepinefrina como ug/kg/min) para mantener la PAM por encima de 65 mmHg.

Imagen 3. Escala de gravedad durante la estancia SOFA (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)

Variables	Points
Terminal illness	6
Tachypnea or hypoxemia	3
Septic shock	3
Platelet count, < 150,000 cells/mm <sup>3</sup>	3
Bands > 5%	3
Age, > 65 years	3
Lower respiratory infection	2
Nursing home resident	2
Altered mental status	2

MEDS SCORE (Mortality %): 0-4 points = Very Low (0.9%), 5-7 points = Low (2%), 8-12 points = Moderate (7.9%), 13-15 points = High (20%), >15 = Very High (39%)

Imagen 4. MEDS Score

	Puntos IPS						
	0	1	2	3	6	8	12
Temperatura corporal	≤ 37,5		> 37,5				
Frecuencia cardiaca	≤ 80					81-140	> 140
Frecuencia respiratoria	≤ 25	> 25					
Recuento de glóbulos blancos x 10 <sup>3</sup>	5-12	> 12		< 5			
Proteína C reactiva	≤ 6				> 6		
SCORE SOFA	≤ 5		> 5				

Imagen 5. IPS Score. (<14 = 10% infección)

Criteria	Score
Temperature	36.5°C-38.4°C = 0 38.5°C-38.9°C = 1 <36.5°C OR ≥39°C = 2
White Blood Cells	4-11 x 10 <sup>9</sup> /L = 0 <4 OR >11 x 10 <sup>9</sup> /L = 1 Band forms ≥ 50% = plus 1
Tracheal secretions	Absent = 0 Non-purulent = 1 Purulent = 2
Oxygenation	PaO <sup>2</sup> /FiO <sup>2</sup> >240mmHg OR ARDS = 0 PaO <sup>2</sup> /FiO <sup>2</sup> ≤240mmHg and no ARDS = 2
Chest x-ray	No infiltrate = 0 Patchy diffuse infiltrates = 1 Localised or focal changes = 2
Chest x-ray progression (day 2-3)	No change = 0 Change (if not heart failure or ARDS) = 2
Microbiological culture (day 2-3)	No growth or few colonies = 0 Moderate or heavy growth of pathogen = 1 Pathogenic bacteria in Gram film = plus 1

Imagen 6. CPIS SCORE. (>6 puntos sugiere neumonía)

### **I.B.3 BIOMARCADORES**

El diagnóstico precoz y por consiguiente la toma de decisiones temprana en los pacientes con sospecha de sepsis es fundamental para su pronóstico y supervivencia. Por ello es de gran importancia tener a nuestra disposición pruebas diagnósticas rápidas y fiables que nos orienten en el manejo terapéutico diario.

Durante el proceso de la sepsis tiene lugar una compleja y extensa interacción entre mediadores bioquímicos produciendo numerosas moléculas circulantes que podemos usar como marcadores de presencia e incluso gravedad del proceso séptico.

La microbiología, el cultivo microbiológico sigue siendo una herramienta fundamental para conformar la presencia de infección en un paciente con fallo de órgano. Sin embargo, conlleva el consumo de mucho tiempo y a menudo se asocia a resultados falsos negativos<sup>47</sup>. En la actualidad, existen nuevas técnicas más rápidas con buena sensibilidad y que permiten realizar un diagnóstico más individualizado. Entre ellas, cabe destacar a la cabeza de la microbiología



clínica el diagnóstico molecular, la microbiología digital y las técnicas de espectrometría de masas (MALDI-ToF y ESI-ToF). En la sepsis, ante un hemocultivo positivo implementaremos el resultado y el tratamiento con el uso de MALDI-ToF directo junto con la detección de ciertos genes de resistencia así como el uso de técnicas basadas en la PCR<sup>48</sup>.

Así pues, se han evaluado una gran cantidad de moléculas con el fin de encontrar el mejor biomarcador de sepsis<sup>49</sup>. Un marcador ideal ha de tener una alta sensibilidad y especificidad, permitiendo detectar a todos los pacientes enfermos y evitando que los que no lo estén sean diagnosticados erróneamente. Así mismo, ha de ser capaz de reflejar de forma precoz la presencia de infección y reflejar el progreso de la misma y la respuesta al tratamiento<sup>50, 51</sup>. Debemos tener presente las diferencias existentes en cada sujeto, puesto que cada paciente conlleva diferentes características como la edad y el sexo, que influirán en la sensibilidad y especificidad de los marcadores.

Los marcadores más extensamente usados y con un mayor conocimiento a nivel de infección son la [proteína C reactiva \(PCR\)](#) y la [procalcitonina \(PCT\)](#).

La [proteína C reactiva](#) fue descubierta por Tillet y Francis en 1930. Es una proteína no glicosilada, que se encontró en el suero de los pacientes infectados con *S. pneumoniae* al observar que precipitaba con el polisacárido C de la pared del neumococo<sup>52</sup>. Por tanto, se trata de un reactante de fase aguda, que se sintetiza en el hígado por los hepatocitos en respuesta al daño tisular o la infección. Los hepatocitos son estimulados por las citoquinas IL-6 e IL-8 para producir esta proteína<sup>53, 54</sup>. Los valores normales en plasma se sitúan < 10 mg/dl. Su producción aumenta pasadas entre 4 y 6 horas tras la agresión inicial, pudiendo elevarse varios cientos por encima del nivel basal en las primeras 24-48 horas<sup>55</sup>.

La PCR se mantendrá elevada durante la fase aguda de la infección, volviendo a valores normales cuando cese la agresión. El punto de corte para la detección de infección se sitúa en torno a 10 mg/dl teniendo una sensibilidad del 88% y una especificidad del 58%, correlacionándose la concentración plasmática y la gravedad de la infección<sup>56</sup>. Una disminución en sus valores en las primeras 48 horas indica una respuesta eficaz de la terapia antibiótica<sup>57</sup>.

Sin embargo, este biomarcador presenta ciertas limitaciones. Su especificidad moderada conlleva que de falsos positivos en procesos inflamatorios no infecciosos<sup>58</sup>. Además, su



farmacocinética es variable en función del sexo, edad o estilos de vida del paciente (alcohol, tabaquismo, obesidad). Por último, posee una cinética lenta de eliminación que hace que su capacidad pronóstica sea menor en comparación con otros biomarcadores<sup>59</sup>.

La **procalcitonina (PCT)** se describió por primera vez como precursor de la calcitonina, siendo marcador tumoral para el cáncer medular de tiroides. La PCT es una pro hormona sintetizada por las células neuroendocrinas del tiroides y del pulmón que en condiciones normales su concentración plasmática es indetectable<sup>60</sup>. Sin embargo, ante una infección bacteriana grave su concentración se eleva rápidamente en sangre, detectándose a las 4-6h de la agresión, con una concentración máxima entre 6-12h y un aclaramiento de 20-36h, lo cual permite la detección precoz de la infección, permitiendo monitorizar la evolución de la misma y la respuesta al tratamiento antibiótico<sup>61</sup>.

La presencia de endotoxinas y exotoxinas bacterianas hace que se imposibilite la hidrólisis de procalcitonina a calcitonina, de ahí su elevación en infecciones bacterianas graves. Desafortunadamente, no es específica de las mismas puesto que puede verse elevada también en infecciones fúngicas sistémicas, en traumatismos o en pacientes con fallo renal <sup>62</sup>. A pesar de todo ello, cuando se compara con otros biomarcadores, la PCT presenta una mayor sensibilidad y especificidad en sepsis<sup>63</sup>, siendo superior tanto en la diferenciación entre un proceso infeccioso de uno no infeccioso, como en la distinción entre la infección bacteriana de la vírica.

Los valores normales de la PCT en sangre son menores a 0,5 ng/ml. Se consideran anormales valores por encima de esta cifra, pudiendo darse en pacientes con infección pero también en enfermedades crónicas autoinmunes o infecciones leves o moderadas. Valores superiores a 10 ng/dl se asocian a una alta probabilidad de tener sepsis grave y desarrollar síndrome de disfunción multiorgánica<sup>64</sup>.

Además, valores mantenidos de PCT son útiles en la valoración de la efectividad del tratamiento y en este sentido hay estudios que correlacionan los cambios de valor de la PCT con la mortalidad de los pacientes, afirmando que una disminución significativa en los valores de éste marcador pronostica mejores resultados en la supervivencia, cuando además sus

valores habían alcanzado cifras superiores a 10ng/ml, y a su vez también relacionando estas observaciones con el valor del score SOFA<sup>65</sup>.

A parte de la PCR y la PCT, podemos observar otros marcadores biológicos que pueden ayudarnos en la definición y pronóstico de la sepsis:

El **lactato** ha demostrado ser buen marcador para valorar la evolución y la mortalidad del paciente. La elevación de este parámetro se traduce en hipoxia e hipoperfusión tisular como consecuencia del aumento del metabolismo anaerobio que tiene lugar en los procesos sépticos. Su disminución durante las primeras horas del tratamiento ha demostrado correlacionarse con la disminución en la mortalidad de los pacientes<sup>66</sup>.

Recientemente se ha estudiado la **pro-adrenomedulina (proADM)** en sus funciones en los procesos infecciosos. La adrenomedulina fue descrita primeramente como vasodilatador<sup>67</sup>, siendo usada como biomarcador su parte intermedia, la proADM, debido a su mayor estabilidad. Sus niveles en condiciones normales son mínimos, aumentando en procesos patológicos cardíacos, respiratorios, renales y sépticos. Su síntesis y secreción es regulada por citoquinas inflamatorias, LPS, hormonas (glucocorticoides, angiotensina II, aldosterona) y factores de hipoxia, isquemia, estrés oxidativo o la hiperglucemia<sup>68</sup>. En el shock séptico se elevan sus valores debido a la disminución de su aclaramiento y al aumento de su producción por las citoquinas. Funciona como un biomarcador en sepsis tanto de diagnóstico como pronóstico, puesto que niveles más elevados de proADM se correlacionan con pacientes de mayor gravedad y mayor tasa de mortalidad<sup>67-69</sup>.

Otros biomarcadores relacionados con la sepsis son las **citoquinas**: Interleucina 6 y 8 (IL-6 y IL-8), a las que se les atribuye capacidad de predicción de mortalidad<sup>70-72</sup> o bien IL-10, IL-18, TNF  $\alpha$ , MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) o MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos), cuyos niveles se encuentran más elevados en los pacientes sépticos que fallecen en comparación con los que sobreviven<sup>73</sup>. Así pues, vemos en el estudio de Andaluz-Ojeda D.*et al* que evalúan el valor pronóstico de la presencia en el paciente séptico de la combinación de citoquinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias IL-8, IL-6, MCP-1 e IL-10<sup>74</sup>.

Otros biomarcadores como CD64 o suPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*) están en investigación y su validez para diagnóstico y pronóstico en sepsis requieren de estudios de validación<sup>75</sup>.

Hasta el momento presente se han evaluado más de 180 biomarcadores diferentes por su potencial para la detección de infección y sepsis, dando lugar a numerosos estudios clínicos y preclínicos<sup>73, 75, 76</sup>. Sin embargo, no existe todavía ningún marcador que individualmente haya demostrado suficiente sensibilidad y especificidad para su uso clínico.

El **análisis de la expresión génica** está demostrando un gran potencial para mejorar el diagnóstico y la evaluación de pronóstico de la sepsis<sup>77-80</sup>. El problema es que hasta ahora las tecnologías disponibles para analizar el ARNm eran o bien de uso exclusivo en investigación por su alta complejidad (*microarrays*, ultrasecuenciación), o presentaban problemas de estandarización, como la PCR a tiempo real<sup>81, 82</sup>. Estos problemas se han solventado con la aparición de técnicas de PCR de última generación como la PCR digital, sobre la cual se comentará más adelante.

### **I.C) SISTEMA INMUNE Y SEPSIS**

El sistema inmune (SI) juega un papel fundamental en la sepsis, y así se ve reflejado en las últimas definiciones de consenso del año 2016, siendo las alteraciones en la regulación de las respuestas del huésped el evento central de la patogénesis de la enfermedad, entre las cuales está la respuesta inmune<sup>83, 84</sup>. La gran heterogeneidad de la enfermedad pone en juego la alteración a la vez tanto del sistema inmunológico, como el sistema inflamatorio y el sistema de coagulación, con una alta variabilidad de un paciente a otro.

Algunos factores tales como la virulencia del patógeno o el grado de invasión que presenten los tejidos, así como las comorbilidades del paciente, intervienen en la respuesta a la infección<sup>85</sup>. Entre las manifestaciones clínicas que puede desarrollar el paciente están el shock séptico, el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), o el síndrome de disfunción multiorgánica (MODS)<sup>86, 87</sup>.

En un escenario ideal, en el primer contacto del patógeno con el sistema inmune del huésped, éste sistema debería eliminar el microbio y volver a un estado de homeostasis. Cuando la enfermedad séptica se ha desarrollado, esto no ocurre, haciendo que continúe la activación de los neutrófilos, así como los macrófagos y monocitos. Sin embargo, se desarrolla una sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras de linfocitos y una rápida apoptosis de estos, por el contrario, se retrasa la apoptosis de los neutrófilos, contribuyendo así, a la patogénesis de la sepsis.

La activación de los receptores de las células que participan en el SI innato reconociendo moléculas asociadas a los patógenos, produce una gran cascada de activación de mediadores inflamatorios como son TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, y IFN- $\gamma$ . Esta reacción no sólo produce daño al patógeno sino que también produce alteraciones en el endotelio vascular, en la síntesis de proteínas en el hígado, en la quimiotaxis leucocitaria o incluso en la activación del sistema de coagulación<sup>88</sup>.

El sistema de coagulación está íntimamente ligado al sistema inflamatorio, generando activación y consumo de trombina que acaba desarrollando una coagulación intravascular diseminada (CID)<sup>89</sup>.

El rápido consumo de factores de la coagulación produce el desarrollo de una hemorragia de tipo difuso en la enfermedad séptica. Los receptores de las proteasas, que se encuentran en células endoteliales, neutrófilos y monocitos, se activan uniéndose a la trombina, factor Xa y factor tisular, lo que conlleva una activación del factor VIIa que activa la vía extrínseca de la coagulación, pero también la producción de mediadores proinflamatorios (IL-6, IL-8), y la adhesión molecular. Esta adhesión hace que se reclute en la vasculatura endotelial leucocitos activados, fundamentalmente neutrófilos que producen enzimas de lisis, así como radicales de oxígeno y nitrógeno que facilitan el fallo microcirculatorio y de órgano<sup>90 91</sup>.

En los últimos años, son numerosos los estudios que han intentado esclarecer y cuantificar esta disregulación inmunológica, incluso establecer un perfil inmunológico que permita distinguir un paciente séptico de uno no infectado<sup>84, 92-94</sup>.

El estudio EXPRESS (Gene Expression In Sepsis) evaluó los perfiles de expresión génica que se daban en los pacientes sépticos ingresado en UCI durante un año de 2012 a 2013,

realizando un análisis transcriptómico de estos genes y relacionándolos con scores pronósticos como el SOFA<sup>95</sup>. Así, identificaron 2396 genes que se expresaban de manera diferente en un paciente con sepsis de un paciente quirúrgico sin la enfermedad. De ellos, 1394 se expresaban de forma mayor y 1032, por contrario, sufrían menores niveles de expresión, en comparación con un paciente sano.

Aquellos genes que se observaron que sufrían una sobreexpresión estaban relacionados con la inmunidad innata codificando proteasas de neutrófilo y receptores de las interleuquinas IL-1 y IL-18, así como genes relacionados en la síntesis de las inmunoglobulinas. Estos genes pueden estar relacionados también con el daño endotelial y tisular. Los genes principalmente involucrados son: MMP8 (Metalopeptidasa 8), LCN2 (Lipocalina 2), OLFM4 (Olfactomedina), LTF (Lactotransferrina), PRTN3 (Polimorfonuclear leucocito serin proteasa), MPO (Mieloperoxidasa)

Por el contrario, los genes cuya expresión está deprimida son aquellos asociados a la inmunidad adaptativa, con funciones que afectan a la presentación de antígeno (Imagen 7), fundamentalmente moléculas de clase HLA II, siendo de ellas la más significativa el HLA-DRA<sup>92, 96, 97</sup>, pero también aquellos genes relacionados con la expresión de la respuesta de las células T y Natural Killers (NK). Los genes detectados relacionados con sinapsis inmunológica, que sufren una disminución de su expresión en la sepsis son fundamentalmente: HLA-DRA (Complejo mayor de histocompatibilidad clase II, DR alfa), CD40LG (Ligando de factor de necrosis tumoral), CD3E (glicoproteína CD3 de superficie células T) CD28 (glicoproteína CD28 de superficie células T), ICOS (coestimulador inducible células T). Todos estos genes están asociados a la presentación de antígeno, y en la sepsis vemos como la expresión de estas moléculas esta disminuída tanto en tejidos linfoides como no linfoides, alterando la regulación inmune y la respuesta antimicrobiana de las células T, así como la respuesta de anticuerpos<sup>96</sup> (Imagen 7).

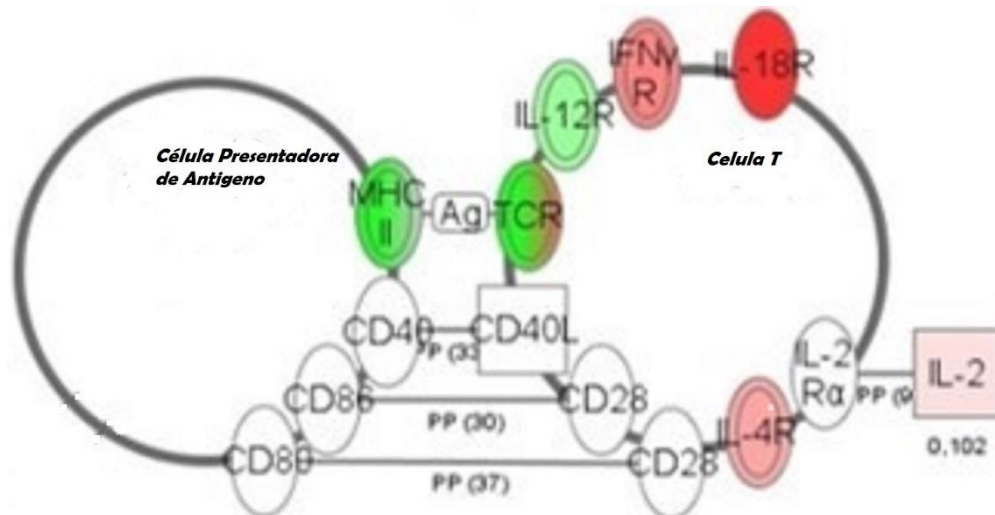


Imagen 7. Presentación de Antígeno. Genes implicados en la sinapsis inmunológica.

Así pues, como bien sabemos ahora, los pacientes con sepsis grave poseen una importante depleción de las células linfocitarias B , T , y de las células dendríticas<sup>98</sup>. En las primeras 24h del diagnóstico de sepsis, podemos observar en los pacientes una marcada linfopenia debida al desplazamiento de estas células del sistema circulatorio al sitio de infección, y también debido a la importante apoptosis que causa un déficit tanto de células T CD4 como CD8 en el torrente sanguíneo<sup>99, 100</sup>.

Estudios que analizan los nódulos linfáticos de los pacientes fallecidos de sepsis observan y confirman la marcada depleción de células T CD4 y CD8. Además, las células T son considerablemente más susceptibles a la apoptosis en estados inflamatorios como es el desarrollo de un shock séptico y se encuentran por lo consiguiente todavía más deplecionadas en la sepsis<sup>101</sup>.

En diversos estudios se observó esta misma respuesta del SI, en la que coexiste un incremento de la inmunidad innata frente a una depresión de la respuesta de la inmunidad adaptativa, demostrando lo inexacto de la teoría clásica que abogaba por una consecución de

fases de reacción inflamatoria exuberante dando paso posteriormente a un estado de depresión inmunitaria<sup>102-104</sup>.

Además, el estudio EXPRESS demuestra la correlación significativa de un grupo de estos genes con la escala SOFA de fallo de órgano, así como su asociación con el pronóstico final de los pacientes sépticos.

Así pues, la cuantificación de los niveles de expresión de estos genes representa una herramienta muy prometedora en la mejora de la detección y el pronóstico de la sepsis.

#### **I.D) TÉCNICAS DE PCR (*Polymerasa Chain Reaction*), PCR DIGITAL.**

La PCR es una de las técnicas que podemos emplear para el estudio de los perfiles de expresión de los genes. La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1998, consistiendo en el aislamiento y amplificación de fragmentos determinados de ADN, gracias a la acción de la ADN-polimerasa.

La transcriptómica se encarga del estudio del conjunto de ácidos ribonucleicos (ARN) o transcritos, presentes en una célula o tejido, siendo el más importante el ARN mensajero (ARNm) puesto que es esencial en la producción de proteínas<sup>105</sup>. Por lo tanto, cada célula o tejido podrá activar o inhibir la expresión de determinados genes, y además a su vez estos patrones de expresión pueden modificarse a lo largo del tiempo y de igual modo frente a una enfermedad. Para la detección de ARN por la PCR, se realiza un paso previo que transforma ARN en ADN copia de cadena simple (ADNc), mediante la enzima llamada transcriptasa inversa. Así, esta nueva cadena de ADNc podrá ser detectada y amplificada por la PCR.

Actualmente, se puede cuantificar el número de transcritos que expresa una célula o tejido y así conocer que genes se encuentran activos o no. Así pues, la transcriptómica ofrece aplicaciones para la clínica<sup>106</sup>, útiles en enfermedades como la sepsis, permitiéndonos comprender mejor la fisiopatología, también la identificación de nuevas dianas terapéuticas, así como la estratificación de pacientes o el descubrimiento de biomarcadores tanto diagnósticos (FRCR1A, LTF), como pronósticos (HLA-DRA).

Los avances en el campo de la biología molecular han permitido que la PCR haya evolucionado en gran medida a lo largo de los últimos años (Tabla 6). La primera generación de PCR es conocida como *PCR convencional*, detectando el producto de la ampliación mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, siendo una medición cualitativa, es decir podemos decir sí hemos detectado un transcrito, positivo o negativo, pero no la cantidad de este en ninguno de los puntos de la reacción.

La segunda generación, *PCR cuantitativa a tiempo real (q PCR)*, detecta la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado utilizando sondas fluorescentes, lo que permite medir la amplificación del producto mientras progresa la reacción. Realiza una medición cuantitativa relativa, puesto que determina la cantidad de copia detectadas interpolando en una curva de referencia. Por lo tanto puede verse afectada por muchos factores como la eficiencia de la reacción o el ruido de fondo.

Y por último, la tercera generación, *PCR digital*, es una combinación de las anteriores manteniendo el uso de sondas fluorescentes, que permite conocer los niveles de expresión de un gen en particular, y todo ello de forma más sensible y precisa que las anteriores, con unas tasas de error menores<sup>107</sup>. Se trata de una cuantificación absoluta, realiza una lectura de punto final, positivos o negativos, siendo capaz de darnos una medida exacta del número de copias detectadas, lo que la hace muy útil en el análisis de la expresión génica.

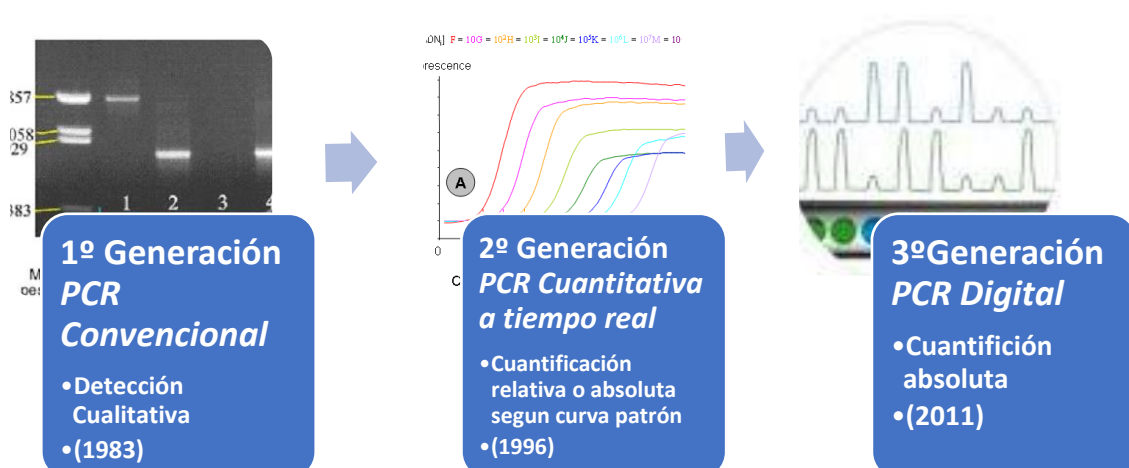


Tabla 6. Evolución de la técnica PCR



La PCR digital funciona mediante la partición de una o varias muestras de ADN o ADNc en muchas reacciones de PCR individuales que se realizan en paralelo. Algunas de estas reacciones contienen la molécula objetivo (positivo, habrá amplificación), y otras por el contrario no (negativo), determinándose también la cantidad de moléculas de ADNc presente en cada partición en función de su nivel de fluorescencia<sup>108</sup>.

Las aplicaciones que tiene esta técnica son numerosas pues permite la cuantificación absoluta de una secuencia de ADN o ARN, así como la detección de secuencias escasas pudiendo amplificar genes individuales de una muestra compleja, y también siendo capaz de detectar la variación en el número de copias de un gen asociado a una determinada enfermedad.

Tiene 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 en concreto de gran utilidad cuando los transcritos son poco abundantes o las muestras son complejas<sup>107-109</sup>.

Por lo tanto, en nuestro trabajo pretendemos evaluar la cuantificación de los niveles de expresión en sangre de genes involucrados en la sinapsis inmunológica mediante PCR digital y su utilidad como herramienta diagnóstica para diferenciar al paciente quirúrgico con sepsis del paciente quirúrgico que no presenta la enfermedad, así como evaluar su capacidad para predecir el riesgo de mortalidad. Además hemos estudiado si la combinación con los valores de procalcitonina puede mejorar el rendimiento de esta última para el diagnóstico de la sepsis.

## ***II. Justificación***

---

## II. JUSTIFICACIÓN

---

La sepsis es una enfermedad prevalente en los pacientes quirúrgicos, en los cuales causa una gran morbimortalidad. Los casos quirúrgicos constituyen un tercio del total de los casos de sepsis<sup>3</sup>. La alta prevalencia e incidencia de sepsis a nivel mundial y la alta probabilidad de mortalidad en más de un 39%, cuando se presenta en su forma más grave, hace que su diagnóstico y tratamiento precoz cobren una relevancia fundamental<sup>110, 111</sup>.

Así pues, en los pacientes quirúrgicos que sufren sepsis, es de vital importancia el control del foco infeccioso, pero sigue siendo un reto identificar a la mayor brevedad posible a estos pacientes<sup>112, 113</sup>. En estos pacientes algunos de los signos precoces que nos harían sospechar del desarrollo de sepsis, puede confundirse un estado proinflamatorio con el desarrollo de hipertermia debido a la propia cirugía o un estado mental alterado producido por la administración de potentes analgésicos, o bien una reducción en la diuresis fruto de la necesidad de mayor aporte de fluidos postoperatorios, incluso se podría asociar la hipoxia a múltiples causas que no sean la sepsis.

El uso de biomarcadores nos ayuda en el diagnóstico ante la sospecha de sepsis en los pacientes quirúrgicos<sup>49</sup>. En la sepsis vemos la presencia de una inflamación exacerbada a la vez que coexiste una depresión en las moléculas involucradas en la participación de la sinapsis inmunológica<sup>114</sup>. Por lo tanto, la combinación de biomarcadores que reflejen el estado proinflamatorio, con aquellos que muestran inmunosupresión podría ser una herramienta de utilidad en la compleja tarea de la detección precoz de los pacientes sépticos<sup>74, 115, 116</sup>.

La procalcitonina (PCT), como biomarcador en el contexto de sospecha de sepsis ante un paciente con antecedentes, clínica compatible, y pruebas microbiológicas que confirmen el diagnóstico, sigue siendo una herramienta valiosa y una de las más usadas para alcanzar un diagnóstico precoz de la enfermedad. Por otra parte, la medición la expresión génica en sangre de la molécula HLA-DR es una herramienta prometedora en la evaluación del grado inmunosupresión, así como de predicción de mortalidad en la sepsis<sup>92, 117, 118</sup>. Para la cuantificación de la expresión génica de los niveles de HLA-DR en sangre hemos empleado la última generación de la reacción en cadena de la polimerasa llamada droplet digital PCR

(ddPCR), la cual permite conocer los niveles de expresión de un gen en particular, y todo ello de forma más sensible y precisa que las anteriores generaciones, con menores tasas de error<sup>96, 107</sup>.

Nuestro trabajo es el primero que estudia la cuantificación de los genes alterados de la sinapsis inmunológica analizando sus niveles de expresión mediante una tecnología novedosa como la PCR digital en pacientes con sepsis y que además analiza la combinación de un biomarcador que refleja la fase proinflamatoria como la PCT con la fase de inmunosupresión representada por los niveles de HLA-DRA.

### ***III. Hipótesis***

---

### III. HIPÓTESIS

---

En la sepsis existe disfunción de la sinapsis inmunológica. La cuantificación de la expresión de genes que codifican proteínas participantes en la misma mediante PCR digital puede ser una buena herramienta para la identificación de sepsis en pacientes quirúrgicos, así como para la predicción de su pronóstico. La combinación de la cuantificación de la expresión de estos genes con los niveles de procalcitonina podría mejorar el rendimiento de esta última para diagnosticar la presencia de sepsis.

## ***IV. Objetivos***

---

## IV. OBJETIVOS

---

### OBJETIVO PRINCIPAL

- Evaluar si la cuantificación de niveles de expresión en sangre de genes de la sinapsis inmunológica mediante PCR digital permite diferenciar al paciente quirúrgico con sepsis del paciente quirúrgico que no presenta sepsis.
- Evaluar si la combinación de la cuantificación de los niveles de expresión de genes de la sinapsis inmunológica junto con los valores de procalcitonina puede mejorar el rendimiento de esta última para el diagnóstico de la sepsis en pacientes quirúrgicos.
- Evaluar si los niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica se asocian al riesgo de mortalidad en estos pacientes.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Reclutar prospectivamente una cohorte derivación y una cohorte de validación de pacientes en los hospitales colaboradores con el estudio en Valladolid procedentes del Hospital Universitario Río Hortega, Hospital Clínico Universitario y de Salamanca del Hospital Clínico Universitario.
- Describir las características clínicas de los pacientes reclutados.
- Desarrollar un método de cuantificación de la expresión de genes de la sinapsis inmunológica basado en la PCR digital.



## ***V. Material y Métodos***

---

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

---

- **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio observacional prospectivo donde se recogieron datos demográficos, clínicos y de laboratorio de pacientes quirúrgicos ingresados en la planta de los servicios de cirugía general, Unidades de Reanimación y Unidades de Cuidados Críticos del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, Hospital Universitario Clínico de Valladolid y Hospital Universitario Clínico de Salamanca durante el periodo de abril 2013 a enero de 2018 y que desarrollaron signos de infección, así como también pacientes quirúrgicos control sin infección. También se reclutaron donantes sanos, no habiendo sido sometidos a cirugía, que procedieron del centro de hemoterapia de Castilla y León.

- **Pacientes**

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 y sospecha de sepsis que ingresaron en las plantas de los servicios de cirugía general, REA o UCI del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, Hospital Clínico Universitario de Valladolid y Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

***Grupo control sanos:*** 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 ingresados con signos de infección, sospecha o confirmación de sepsis, reclutados en las primeras 24h desde el inicio de los signos de infección (de acuerdo a la definición propuesta por “*the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference*”)<sup>27, 119</sup>.

***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*”)<sup>27, 119</sup>.

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

Se reclutaron dos cohortes de pacientes diferentes, una inicial a la que llamamos *cohorte I* o *derivación*, y una cohorte posterior llamada *cohorte II* o *de validación*, en la que confirmamos nuestros resultados obtenidos en la primera cohorte (Imagen 8).

- Cohorte I o derivación: se reclutaron 101 pacientes adultos ( $\geq 18$  años) hospitalizados en el servicio de Cirugía 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*”)<sup>27, 119</sup> prospectivamente en el estudio desde Abril de 2013 hasta Enero de 2016. Se reclutó un grupo control, constituido por 53 pacientes quirúrgicos sin signos de infección. Finalmente, se reclutaron 16 donantes de sangre, todos ellos de edades similares a las de los pacientes. Se utilizó un protocolo estándar de recogida de datos clínicos, incluyendo la historia clínica, examen físico, análisis hematológico, bioquímico, microbiológico y pruebas radiológicas. Las decisiones de tratamiento se tomaron de forma individual no estandarizada por un médico especialista.
- Cohorte II o validación. Esta cohorte estaba constituida por un total de 74 pacientes adultos ( $\geq 18$  años) hospitalizados en el servicio de Cirugía o en las Unidades de Reanimación Quirúrgica de los hospitales participantes, con el diagnóstico de sepsis (de acuerdo a la definición propuesta por “*the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference*”)<sup>27, 119</sup> incluidos prospectivamente en el estudio en las fechas de Enero 2017 a Enero 2018. Se reclutó además un grupo control formado por 21 pacientes quirúrgicos sin signos de infección.

Se diseñó un protocolo estándar de recogida de datos clínicos, incluyendo la historia clínica, examen físico, análisis hematológico, bioquímico, microbiológico y pruebas radiológicas. Las decisiones de tratamiento se llevaron a cabo de forma individual no estandarizada pero todas ellas realizadas por un médico especialista.



Imagen 8. Esquema pacientes reclutados.

- **Comite ético y Consentimiento informado:**

El estudio fue aprobado por los respectivos Comités de ética para la investigación clínica de los hospitales participantes (Hospital Universitario Río Hortega, Hospital Clínico Universitario de Valladolid y Hospital Clínico Universitario de Salamanca). Los métodos utilizados siguen la legislación española para la investigación Biomédica del 2007. 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 Genes**

Los genes seleccionados participan en la presentación de antígeno, es decir, en la sinapsis inmunológica entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T CD4<sup>+</sup>: HLA-DRA, CD40LG, CD3E, CD28 y ICOS (tabla 7).

<b>Moléculas presentadoras de antígeno</b>	<i>Disminuidas en los tejidos linfoides y no linfoides, disregulación de células T y anticuerpos.</i>
<i>HLA-DRA</i> (Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II, DR alfa)	Presentación de péptidos de los antígenos para que sean reconocidos en su la superficie por las células T CD4
<i>CD40LG</i> (Ligando Factor de Necrosis Tumoral)	Expresado en la superficie de las células T. Regula la función de las células B, uniéndose a ellas en superficie
<i>CD3E</i> (Glicoproteína de superficie de las células T)	Forma el complejo CD3-receptor en las células T activando vías de transducción al reconocer señales activadas por el antígeno
<i>CD28</i> (Glicoproteína de superficie de las células T)	Este gen está involucrado en la activación de la célula T, su proliferación, la producción de citoquinas y la supervivencia de las células T.
<i>ICOS</i> (Coestimulador inducible de las células T)	Promueve la respuesta de la célula T ante el estímulo de un antígeno extraño y la secreción de anticuerpos por las células B.

*Tabla 7. Genes seleccionados para el estudio, implicados en la sinapsis inmunológica que ven disminuida su expresión en la sepsis.*

- **Recogida de muestras:**

Todas las muestras se recogieron en las primeras 24h a la sospecha o diagnóstico de infección o en las siguientes 12h en el caso de los controles quirúrgicos. Se tomaron de cada paciente y de cada control dos tubos PaxGene para el análisis de expresión génica y un tubo EDTA para cuantificación de procalcitonina en plasma. Además se realizaron las siguientes peticiones de rutina en el laboratorio de análisis clínicos de cada hospital (Imagen 9):

- Laboratorio de urgencia: Leucograma con cayados más el perfil de Urgencias al que se añade la medición de bilirrubina Total, PCR, ácido láctico, PCT, 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)

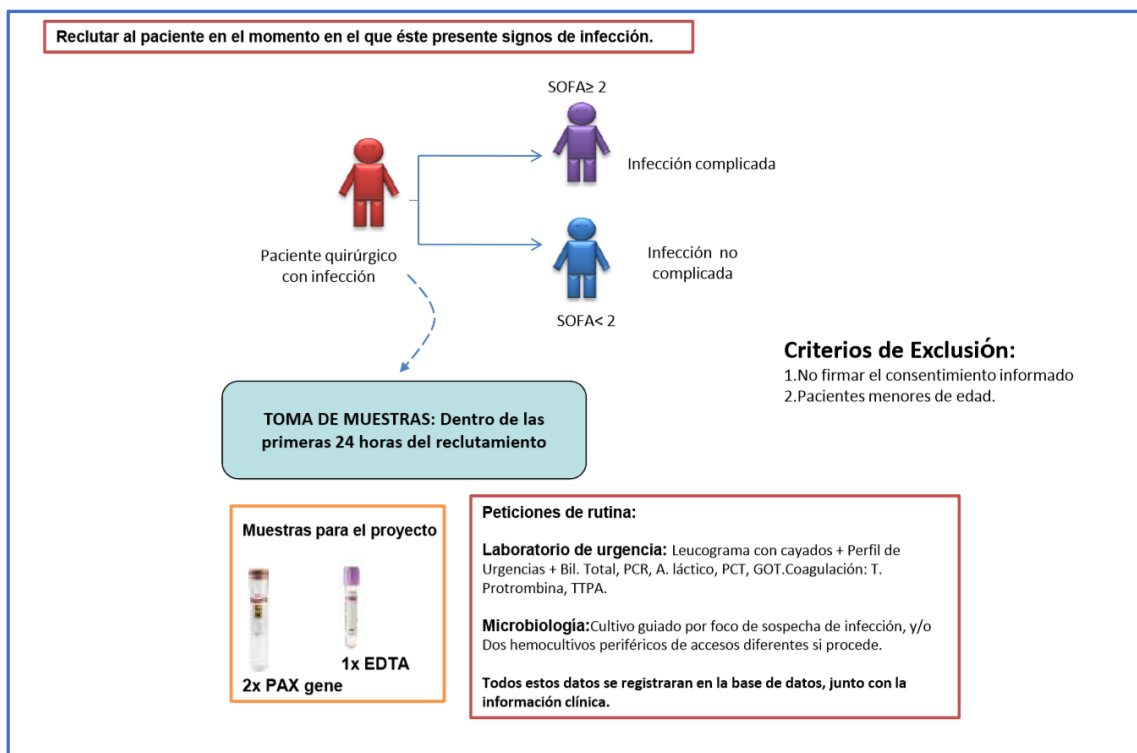


Imagen 9. Esquema reclutamiento y recogida de muestras.

- **Cuantificación de la expresión génica y procalcitonina:**

Para el análisis de la expresión génica se recogieron muestras de 2,5 mL de sangre usando los tubos especiales de colección de sangre Pax Gene, en las primeras 24 horas al diagnóstico de sepsis o en las 12 horas siguientes a la cirugía en el caso de los grupos quirúrgicos control. Las muestras de los donantes sanos fueron recogidas en el momento de la donación de sangre. El ARNm total fue extraído de las muestras sanguíneas usando el PAXgene Blood RNA System (PreAnalytix, Hombrechtikon, Suiza). Se evaluó la concentración y la calidad de las muestras por espectrometría (Nano-Drop ND 1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) y RNA Experion Bioanalyzer (BioRad, CA). Sólo las muestras de buena calidad y concentración fueron evaluadas por PCR digital. La expresión de los genes fue cuantificada por PCR digital (BioRad) usando sondas TaqMan Assay marcadas en FAM con MGB como “quencher” (Thermo Fisher/Scientific-Life Technologies, Waltham, MA): HLA-DRA (Hs00219575\_m1), ICOS (Hs04261471\_m1), CD40LG (Hs00163934\_m1), CD28 (Hs01007422\_m1), CD3E (Hs01062241\_m1). Se generó ADNc de cada muestra utilizando un termociclador Techne TC-512 (Bibby-Scientific, Staffordshire, OSA, UK) comenzando desde 1000 ng de ARNm usando el kit “iScript Advanced cDNA Synthesis Kit” de BioRad. El volumen obtenido de ADNc (20uL) se diluyó (1/25) y se utilizaron 2,5 uL (5ng de mRNA total) para la cuantificación de la expresión de cada gen, según las especificaciones del fabricante. El análisis de PCR digital, fue realizado mediante la plataforma BioRad QX200 ddPCR system, utilizando reactivos estándar de BioRad para la generación y lectura de las gotas.

La medición de procalcitonina en plasma se realizó mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia en un analizador químico (Cobas 6000, Roche Diagnostics Meylan, France) en las muestras recogidas durante las primeras 12 horas del diagnóstico de sepsis o en las primeras 12 horas posteriores a la cirugía en el caso de los controles, con un límite de detección de 0,02 ng/mL. Los niveles de PCR fueron medidos mediante un método inmunoturbidimétrico (e501 Module Analyzer, Roche Diagnostics), con un límite de detección de 0,15 mg/dL.

Ambas muestras, tanto las destinadas a la cuantificación de HLA-DRA como a la de PCT fueron almacenadas a -80°C para ser procesadas en el mismo momento con las mismas plataformas para evitar así sesgos debidos al análisis en diferentes plataformas.

- **Análisis Estadístico:**

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  $\chi^2$ . Para calcular la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores para distinguir entre presencia / ausencia de sepsis o para distinguir supervivientes de no supervivientes se utilizó el test del área bajo la curva. Se calculó el punto del área bajo la curva más próximo a la esquina superior izquierda (“*optimal operating point*”) utilizando la siguiente fórmula:

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

Para calcular diferencias entre áreas bajo la curva se utilizaron los test de Hanley - McNeil o el de DeLong.

Para evaluar la capacidad de los niveles de expresión de HLA-DRA para predecir mortalidad, así como la capacidad del ratio PCT/HLA-DRA y de la 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, con punto de corte  $p = 0.1$ . Para estos modelos se crearon variables categóricas en base a los OOPs calculados en las áreas bajo la curva.

Para evaluar el impacto de los niveles de expresión de HLA-DRA en el tiempo de supervivencia se utilizó una curva de Kaplan Meier y el test del logaritmo del rango.



## ***VI. Resultados***

---

## VI. RESULTADOS

---

- **Características clínicas de los pacientes de la cohorte I**

En nuestra cohorte I o derivación predominan los hombres de edad avanzada con comorbilidades, siendo la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares crónicas, la diabetes mellitus y el cáncer los antecedentes más comunes<sup>120-122</sup>. La cirugía abdominal fue la más frecuente en esta cohorte. De los 62 pacientes sometidos a cirugía abdominal, 46 pacientes presentaron un foco infeccioso de origen abdominal, 3 pacientes presentaron el foco en la herida quirúrgica, 2 pacientes sufrieron infección urológica como origen de la sepsis, 2 pacientes tuvieron un foco respiratorio, 1 paciente tuvo Gangrena de Fournier, mientras que en los 8 pacientes restantes no se evidenció el origen del foco. La necesidad de cirugía urgente fue más frecuente entre los pacientes con sepsis. La enfermedad fue de origen nosocomial en 60 casos. En estos casos la sepsis siguió a la cirugía. En 41 pacientes, la sepsis se originó en la comunidad, siendo la causa de la cirugía. Los pacientes con sepsis más grave, evidenciada por la escala SOFA, presentaron estancias hospitalarias más largas. Además, la mortalidad hospitalaria en el grupo de sepsis fue del 24,7%, no habiendo ningún caso de fallecimiento en los pacientes no sépticos (tabla 8).

- **Microbiología**

En la cohorte I, en el 84% de los pacientes con sepsis (n=85) se consiguió demostrar al menos una identificación microbiológica positiva. En el 39,5% de los casos positivos, los cultivos mostraron anaerobios facultativos Gram negativos bacilos de la familia de los *Enterobacteriaceae*, siendo el microorganismo más común *Escherichia coli* (n=31). En el 32,93% se detectó la presencia de aerobios o facultativos anaerobios Gram positivos cocos, siendo *Staphylococcus epidermidis* (n=10) y *Enterococcus faecium* (n=10) los microorganismos más frecuentes. Los hongos representaron el 5,99% de los cultivos positivos, siendo *Candida*

*albicans* el más común de ellos (n=6). Del resto de las muestras positivas, el 21,7%, pertenecieron a otras especies microbiológicas (tabla 9).

MICROORGANISMO	N (%)
GRAM-NEGATIVOS	(39,5%)
<i>Escherichia Coli</i>	31
GRAM-POSITIVOS	(32,93%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
<i>Enterococcus faecium</i>	10
HONGOS	(5,99%)
<i>Candida Albicans</i>	6
OTROS	(21,57%)
<b>TOTAL</b>	<b>(84,2%)</b>

Tabla 9. Microorganismos aislados en los pacientes quirúrgicos sépticos en la cohorte I

- **Características clínicas de los pacientes de la cohorte II**

En cuanto a la cohorte II o de validación, los pacientes sépticos reclutados tienen un perfil similar siendo en su mayoría hombres de edad avanzada con comorbilidades, siendo las más frecuentes la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y el cáncer. Como observamos en la cohorte I, la cirugía abdominal fue el tipo de cirugía más frecuente también en esta cohorte, así como la cirugía urgente en el grupo de pacientes quirúrgicos con sepsis. La sepsis fue de origen nosocomial en 33 casos siendo la causa de la cirugía, y la escala SOFA obtuvo una puntuación más elevada en el grupo de los pacientes quirúrgicos sépticos, aunque sin diferencias significativas con respecto al grupo control. Los pacientes con sepsis tuvieron estancias más largas tanto en UCI como hospitalarias, y el 12,2% de los pacientes con sepsis murieron durante la hospitalización, no observándose ninguna muerte entre los grupos de

pacientes sin sepsis (tabla 10). En cuanto a la microbiología de esta cohorte, se obtuvieron resultados similares a los de la cohorte derivación.

		Pacientes sépticos (n=101)	Controles quirúrgicos(n=53)	p
Características	Edad [años, mediana IQR]	72.0 (15.0)	64.0 (18.0)	0.006
	Hombres	65.3 (66)	71.7 (38)	n.s.
Comorbilidades% (n)	Hipertensión arterial	55.4 (56)	60.0 (30)	n.s.
	Enfermedad crónica	47.5 (48)	34.0 (18)	n.s.
	Enfermedad crónica	14.8 (15)	21.1 (11)	n.s.
	Enfermedad crónica renal	14.9 (15)	2.0 (1)	n.s.
	Enfermedad crónica	3.0 (3)	5.8 (3)	n.s.
	Enfermedad neurológica	5.0 (5)	3.7 (2)	n.s.
	Enfermedad	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
	Inmunosupresión	18.0 (17)	13.9 (5)	n.s.
Tipo de cirugía, % (n)	Cirugía urgente	63.4 (64)	3.8 (2)	<
	Cardio-toracica	30.0 (30)	39.6 (21)	n.s.
	Abdominal	62.0 (62)	43.4 (23)	n.s.
	Neurocirugía	1.0 (1)	1.9 (1)	n.s.
	Vascular	3.0 (3)	3.7 (2)	n.s.
	Urológica/Renal	1.0 (1)	9.4 (5)	0.011
	Otros	3.0 (3)	1.9 (1)	n.s.
Evolución y pronóstico	Estancia hospitalaria [días, mediana IQR]	26.5 (23.5)	10.0 (7.0)	<
	Estancia en UCI [días, mediana IQR]	14.0 (17.0)	4.0 (3.0)	<
	SIRS, % (n)	100.0 (101)	56.6 (30)	<
	Shock séptico, % (n)	61.4 (62)	n.a	n.a.
	No supervivencia a día 28,	19.8 (20)	0	<
	Mortalidad hospitalaria, %	24.7 (25)	0	<
Origen de infección, % (n)	Desconocido	14.8 (15)	n.a.	n.a.
	Tracto Respiratorio	18.8 (19)	n.a.	n.a.
	Abdomen	45.5 (46)	n.a.	n.a.
	Tracto urinario	4.9 (5)	n.a.	n.a.
	Herida quirúrgica	5.9 (6)	n.a.	n.a.
	Bacteriemia	4.9 (5)	n.a.	n.a.
	Otros	4.9 (5)	n.a.	n.a.
Microbiología, % (n)	Gram +	46.5 (47)	n.a.	n.a.
	Gram -	60.4 (61)	n.a.	n.a.
	Hongos	9.9 (10)	n.a.	n.a.
	Virus	2.0 (2)	n.a.	n.a.
	Polimicrobianos	44.6 (45)	n.a.	n.a.
Datos al diagnóstico, [mediana (IQR)]	SOFA score	8 (6)	1 (3)	<
	Total bilirubina (mg/dl)	0.7 (1.3)	0.8 (0.5)	n.s.
	Glucosa (mg/dl)	152.0 (78.0)	135.0 (55.0)	n.s.
	Contaje plaquetario	180000 (194.7)	155000 (740000)	n.s.
	INR	1.3 (0.4)	1.2 (0.4)	n.s.
	ScvO2 (%)	73.1 (19.0)	68.8 (80.0)	n.s.
	PCR (mg/L)	232.3 (169.2)	57.7 (77.7)	<
	Procalcitonina (ng/mL)	5.5 (17.5)	0.5 (0.9)	<
	Células blancas	14465 (10257.5)	12290 (4875.0)	0.023
	Linfocitos (cells/mm3)	944.32 (818.6)	1008 (894.3)	n.s.
	Monocitos (cells/mm3)	1068.48 (51887.6)	781.8 (1327.8)	n.s.
	Neutrófilos (cells/mm3)	12337.0 (9220.5)	10016.0 (4704.5)	0.017
	Eosinófilos (cells/mm3)	49.9 (2052.6)	12.3 (70.4)	0.019
Basófilos (cells/mm3)	78.4 (1593.2)	28.8 (68.9)	0.006	

**Tabla 8. Características descriptivas de los pacientes de la cohorte derivación.** Variables continuas representadas por mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas (% , n). ICU: unidad de cuidados críticos; SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; INR, ratio internacional normalizado; ScvO2: saturación central venosa de oxígeno; n.s: no significación; n.a: no aplicable

		Pacientes sépticos (n=74)	Controles quirúrgicos(n=21)	p
Características	Edad [años, mediana IQR]	70.50 (20)	70.00 (12)	n.s
	Hombres	58.10 (43)	61.90 (13)	n.s.
Comorbilidades% (n)	Hipertensión arterial	45.94 (34)	61.90 (13)	n.s.
	Enfermedad crónica cardiovascular	9.46 (7)	9.52 (2)	n.s.
	Enfermedad crónica respiratoria	5.41 (4)	4.76 (1)	n.s.
	Enfermedad crónica renal	8.11 (8)	9.52 (2)	n.s.
	Enfermedad crónica hepática	2.70 (2)	0 (0)	n.s.
	Diabetes mellitus	14.86 (11)	19.04 (4)	n.s
	Cancer	18.91 (14)	42.86 (9)	0.024
	Inmunosupresión	9.46 (7)	4.76 (1)	n.s.
Tipo de cirugía, % (n)	Cirugía urgente	79.73 (59)	9.52 (2)	< 0.001
	Abdominal	47.30 (35)	23.81(5)	n.s.
	Vascular	2.70 (2)	9.52 (2)	n.s.
	Urológica/Renal	1.35 (1)	14.29 (3)	0.009
	Otros	4.05 (3)	0 (0)	n.s.
Evolución y pronóstico	Estancia hospitalaria [días,medianaIQR]	16 (17)	10 (10)	0.048
	Estancia en UCI [días, mediana IQR]	3 (5)	2 (2)	0.050
	SIRS, % (n)	100 (74)	23.81 (5)	0.003
	Shock séptico, % (n)	48.64 (36)	0 (0)	<0.001
	Mortalidad hospitalaria, % (n)	12.16 (9)	0 (0)	n.s
	Tracto Respiratorio % (n)	14.86 (11)	n.a.	n.a.
	Abdomen % (n)	40.54 (30)	n.a.	n.a.
	Tracto urinario % (n)	5.41 (4)	n.a.	n.a.
	Herida quirúrgica % (n)	25.68 (19)	n.a.	n.a.
	Bacteriemia % (n)	14.86 (11)	n.a.	n.a.
Microbiología, % (n)	Otros % (n)	10.81 (8)	n.a.	n.a.
	Cultivo positivo	45.94 (34)	n.a.	n.a.
	Gram +	18.92 (14)	n.a	n.a
	Gram -	32.43 (24)	n.a.	n.a.
	Hongos	1.35 (1)	n.a.	n.a.
	Virus	0 (0)	n.a.	n.a.
Datos al diagnóstico, [mediana (IQR)]	Polimicrobianos	18.92 (14)	n.a.	n.a.
	SOFA score	6 (7)	2.50(5)	n.s
	Total bilirubina (mg/dl)	0.82 (1.06)	0.83 (0.59)	n.s.
	Glucosa (mg/dl)	160.0 (73)	162 (39)	n.s.
	Contaje plaquetario (cell/mm <sup>3</sup> )	135000 (191.5)	209000 (146000)	n.s.
	INR	1.22 (0.33)	1.11 (1.20)	0.023
	PCR (mg/L)	216.84 (179.83)	103.34 (98.85)	< 0.001
	Procalcitonina (ng/mL)	2.70 (9.35)	0.29 (0.71)	< 0.001
Células blancas (cells/mm <sup>3</sup> )	Células blancas (cells/mm <sup>3</sup> )	14960 (10600)	11280 (8075)	n.s
	Neutrófilos (cells/mm <sup>3</sup> )	13358.50 (11962.50)	10341(9362)	n.s

**Tabla 10. Características descriptivas de los pacientes de la cohorte II o validación.**

Variables continuas representadas por mediana, (rango intercuartil, IQR); variables categóricas representadas (% , n). ICU: unidad de cuidados críticos; SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; INR, ratio internacional normalizado; ScvO<sub>2</sub>: saturación central venosa de oxígeno; n.s: no significación; n.a: no aplicable

## I. Niveles de expresión en sangre de genes de la sinapsis inmunológica para identificar la presencia de sepsis y predecir mortalidad.

*Resultados publicados en el artículo “Quantification of Immune Dysregulation by Next-generation Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients” publicado en Annals of Surgery<sup>83</sup>.*

### I.1 Niveles de expresión de genes de la sinapsis inmunológica entre los diferentes grupos

Como se puede observar en los siguientes diagramas de cajas, los controles quirúrgicos presentaron niveles menores de expresión de los genes relacionados con la sinapsis inmunológica en comparación con los controles sanos, demostrando así la existencia de depresión de la inmunidad adaptativa en estos pacientes por el mero hecho de someterse a la agresión quirúrgica. Esto se observa en todos los genes y de manera significativa, como se puede comprobar en sus respectivos diagramas de cajas (Imagen 11, Imagen 12, Imagen 13, Imagen 14, Imagen 15).

En comparación con los controles sanos, los pacientes quirúrgicos sépticos presentaron niveles significativamente menores de expresión de todos los genes estudiados (tabla 11).

Con respecto a los controles quirúrgicos, es decir aquellos pacientes quirúrgicos que no presentan infección, todos los genes de la sinapsis inmunológica presentaron niveles menores de expresión génica de forma significativa, excepto en el caso del gen ICOS, que no demuestra significación en la disminución de los niveles de expresión de este gen entre el grupo control quirúrgico y el grupo de pacientes quirúrgicos sépticos pero con menor fallo de órgano (tabla 11).

Los pacientes quirúrgicos sépticos presentaron una depresión todavía mayor de los genes de la sinapsis inmunológica analizados. El gen que presentó una mejor capacidad para diferenciar entre pacientes quirúrgicos sépticos y pacientes sin sepsis atendiendo a sus niveles de



expresión en sangre fue el HLA-DRA (Imagen 11). Observamos diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de HLA-DRA entre todos los grupos a excepción de la comparación entre el grupo de pacientes sépticos con menor fallo de órgano y aquel con mayor fallo de órgano (tabla 11).

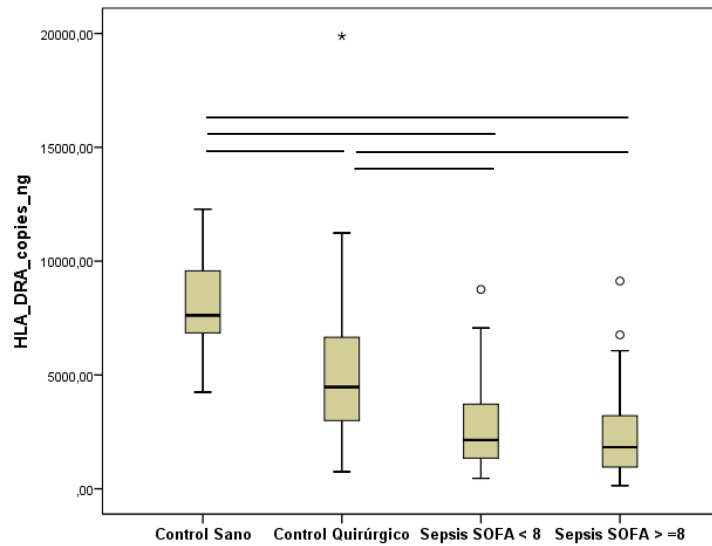


Imagen 11. Diagrama de cajas de HLA-DRA según sus niveles de expresión en los diferentes grupos. La presencia de una línea denota diferencias significativas entre grupos.

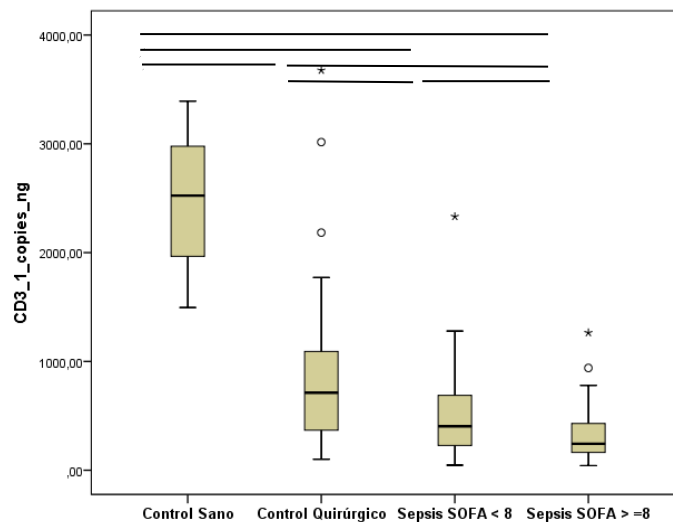


Imagen 12. Diagrama de cajas de CD3E según sus niveles de expresión en los diferentes grupos. La presencia de una línea denota diferencias significativas entre grupos.

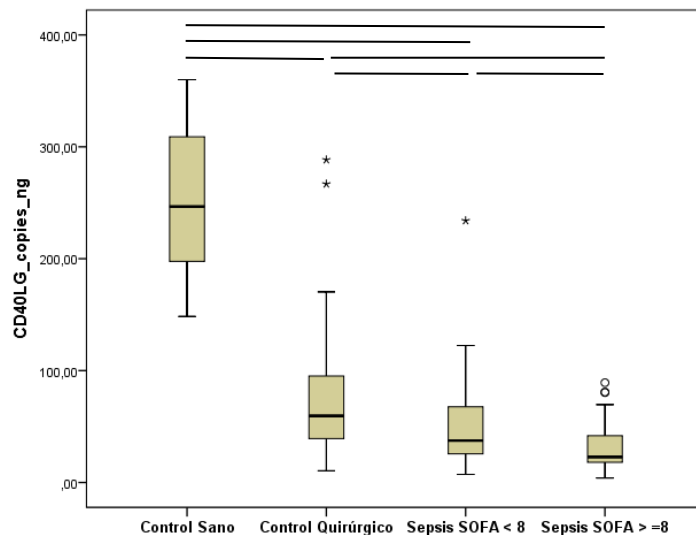


Imagen 13. Diagrama de cajas de CD40LG según sus niveles de expresión en los diferentes grupos. La presencia de una línea denota diferencias significativas entre grupos.

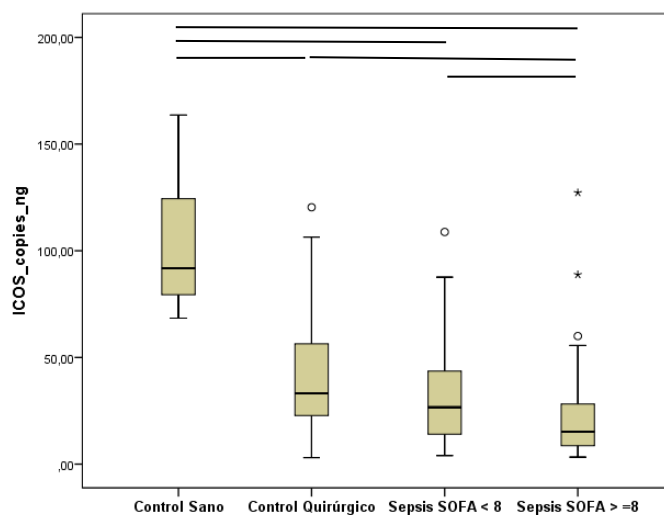


Imagen 14. Diagrama de cajas de ICOS según sus niveles de expresión en los diferentes grupos. La presencia de una línea denota diferencias significativas entre grupos.

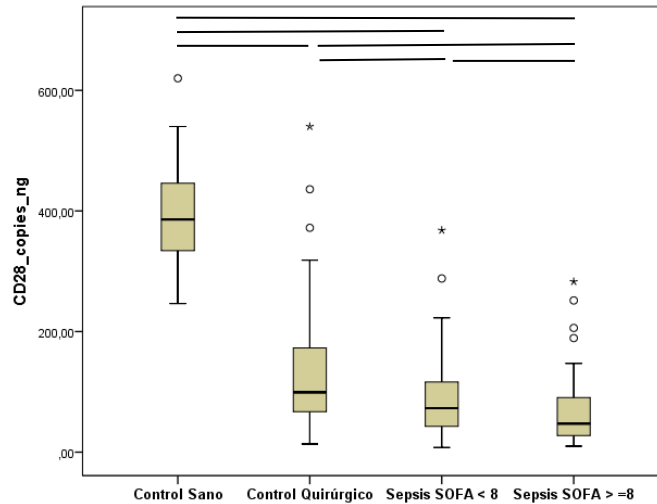


Imagen 15. Diagrama de cajas de CD28 según sus niveles de expresión en los diferentes grupos. La presencia de una línea denota diferencias significativas entre grupos.

Observamos como varía la expresión de los genes de la sinapsis en la sepsis de forma paralela con el grado de disfunción de órgano, objetivado por la escala SOFA. A mayor fallo de órgano, menor expresión en los niveles de los genes de la sinapsis inmunológica.

En el análisis de Mann Whitney (tabla 11) podemos objetivar como la expresión de los genes de la sinapsis inmune disminuye de forma significativa conforme al fallo de órgano y también cuando comparamos entre grupos. De igual manera, ocurre en los diferentes grupos de nuestros pacientes con la determinación de los valores en sangre del biomarcador clásico procalcitonina, que asciende de forma significativa a mayor fallo de órgano. Observamos como la procalcitonina también varía su valor, en este caso aumenta, al comparar el grupo control de pacientes sanos con respecto a los pacientes controles quirúrgicos que no están infectados, atribuyendo este aumento al propio hecho de haberse sometido a la cirugía. Como ocurre en el caso de los genes, sus valores se ven alterados de manera significativa al comparar las diferencias de sus niveles en todos los grupos, con un gran aumento en el grupo de pacientes sépticos con más fallo de órgano.

	Controles	Controles	Sepsis	Sepsis	p	p	p	P	p	p
--	-----------	-----------	--------	--------	---	---	---	---	---	---

	sanos (0)	quirúrgicos (1)	SOFA<8 (2)	SOFA≥8 (3)	(0 vs 1)	(0 vs 2)	(0 vs 3)	(1 vs 2)	(1 vs 3)	(2 vs 3)
<b>PCT</b>	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
<b>HLA-DRA</b>	7618 [2973]	4468 [3884]	2142 [2449]	1824 [2320]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	n.s
<b>CD40LG</b>	247 [119]	60 [59]	37 [43]	23 [26]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.006	< 0.001	0.008
<b>CD3E</b>	2524 [1054]	712 [754]	404 [461]	243 [278]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.001	0.005
<b>CD28</b>	386 [117]	99 [109]	73 [75]	47 [68]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.017	< 0.001	0.014
<b>ICOS</b>	92 [47]	33 [36]	27 [30]	15 [20]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	n.s	< 0.001	0.015

Tabla 11. Mann Whitney. Niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica en los diferentes grupos de pacientes. Mediana [Rango Intercuartil] n.s: no significativo

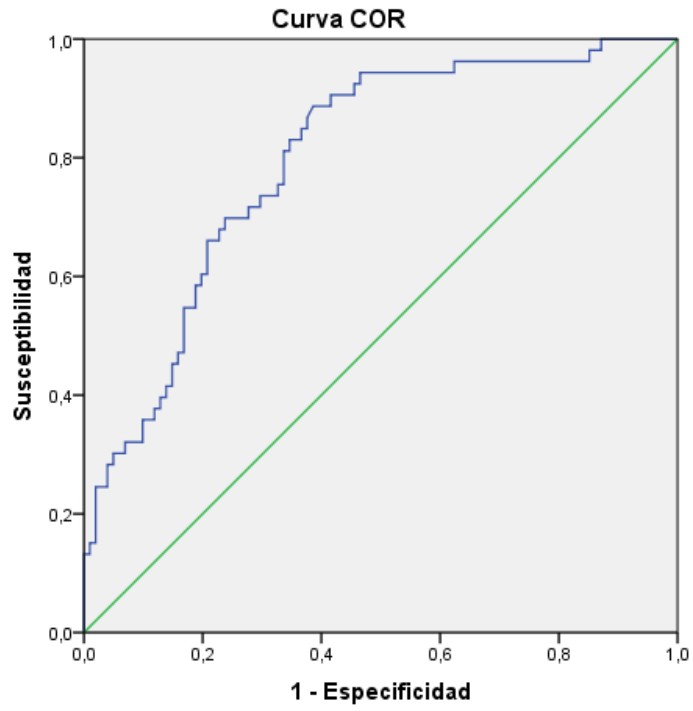
## **I.2 Sensibilidad y Especificidad para identificar la presencia de sepsis**

En un siguiente paso utilizamos curvas ROC para evaluar la precisión de la expresión de los niveles de los genes de la sinapsis inmunológica para el diagnóstico diferencial entre pacientes quirúrgicos con sepsis y los no sépticos.

Todos los genes de la sinapsis inmunológica estudiados presentaron AUROC significativas para el diagnóstico diferencial de pacientes quirúrgicos con sepsis de aquellos que no padecían sepsis.

De entre los genes de la sinapsis inmunológica, el que presentó un mejor balance entre sensibilidad y especificidad para diferenciar entre la presencia o ausencia de sepsis fue el HLA-DRA (figura 16)

Al gen HLA-DRA, le siguieron los genes CD3E (figura 17), CD40LG (figura 18), CD28 (figura 19) y por último el gen ICOS (figura 20).



*Imagen 16. AUROC expresión del gen HLA-DRA para el diagnóstico diferencial de pacientes sépticos y no sépticos (ausencia de sepsis)*

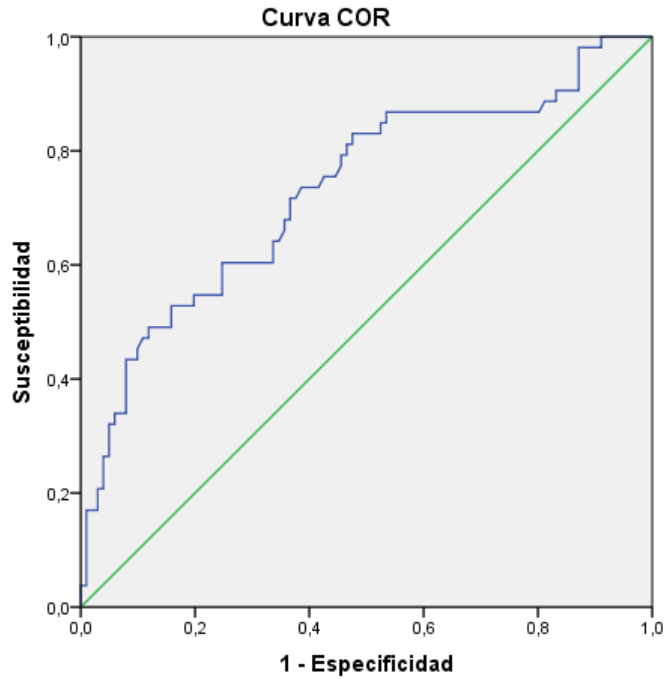


Imagen 17. AUROC expresión del gen CD3E para el diagnóstico diferencial de pacientes sépticos y no séptico (ausencia de sepsis)

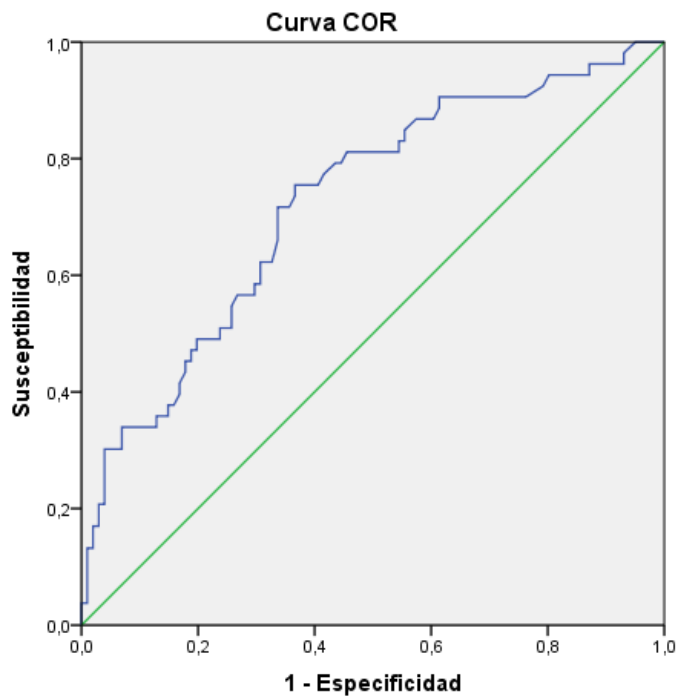


Imagen 18. AUROC expresión del gen CD40LG para el diagnóstico diferencial de pacientes sépticos y no sépticos (ausencia de sepsis)

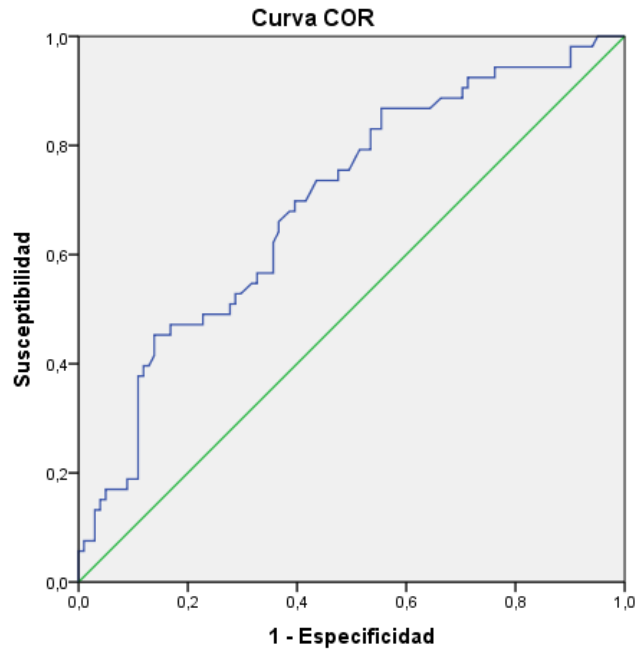


Imagen 19. AUROC expresión del gen CD28 para el diagnóstico diferencial de pacientes sépticos y no sépticos (ausencia de sepsis)

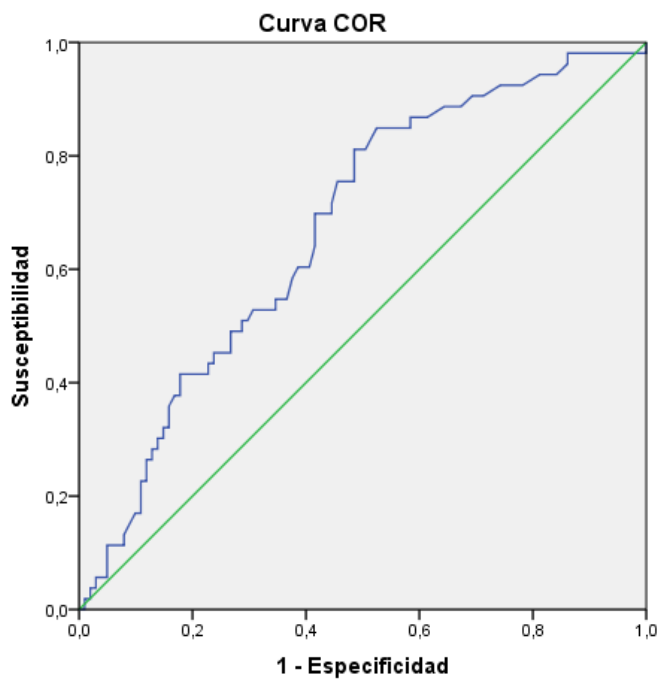


Imagen 20. AUROC expresión del gen ICOS para el diagnóstico diferencial de pacientes sépticos y no sépticos (ausencia de sepsis)

	AUROC diagnóstico de sepsis						
	Area	[IC95%]		$p$	OOP	Se (%)	Es (%)
<i>PCT</i>	0.80	0.73	0.88	< 0.001	1.115	73.3	75.5
<i>HLA-DRA*</i>	0.80	0.73	0.87	< 0.001	3464	69.8	76.2
<i>CD3E*</i>	0.73	0.64	0.82	< 0.001	414	71.7	63.4
<i>CD40LG*</i>	0.72	0.64	0.81	< 0.001	42.2	71.7	66.3
<i>CD28*</i>	0.70	0.61	0.78	< 0.001	72.2	69.8	60.4
<i>ICOS*</i>	0.67	0.59	0.76	< 0.001	25.4	69.8	58.4

Tabla 12. Áreas bajo la curva (AUROC) de niveles de expresión de HLA-DRA, CD40LG, CD3E, CD28, ICOS para diferenciar pacientes sépticos y controles. IC: Intervalo de confianza, Se: Sensibilidad, Es: Especificidad \* AUROC para detectar ausencia de sepsis. OOP (optimal operating point): punto de corte óptimo.

En la tabla 12 observamos los datos numéricos de las AUROC, nivel de significación y puntos de corte óptimos recogidos de todos los genes estudiados. El gen que mejor diferencia a pacientes controles quirúrgicos no sépticos de pacientes quirúrgicos con sepsis es HLA-DRA, obteniendo como vemos en las gráficas un área bajo la curva de 0.80, similar a los valores obtenidos para la procalcitonina.

Sin embargo, como ya hemos remarcado, el resto de genes también presentan AUROC significativas para el diagnóstico diferencial entre pacientes con sepsis y no sépticos.

Además, se calcularon los puntos de corte óptimos (OOP) tanto de los diferentes genes como de la procalcitonina para el diagnóstico diferencial entre pacientes sépticos y no sépticos, observándose nuevamente que HLA-DRA es el gen que posee el mejor balance entre sensibilidad (69,8%) y especificidad (76,2%).



### I.3 Asociación entre niveles de expresión génica y mortalidad hospitalaria

El análisis multivariante demostró que los niveles bajos de expresión génica de HLA-DRA se asociaron de manera inversa e independiente a un mayor riesgo de mortalidad hospitalaria. Las variables de ajuste fueron la escala SOFA, antecedente personal de padecer diabetes mellitus, presencia de gérmenes Gram +, presencia de infección fúngica. Así pues, el hecho de tener menos de 1976 copias/ng de HLA-DRA al diagnóstico de la enfermedad séptica multiplica por cinco la probabilidad de muerte hospitalaria de manera significativa en los pacientes quirúrgicos con sepsis. También observamos como la diabetes mellitus como antecedente o el aumento en la escala SOFA de daño de órgano, incrementan el riesgo de mortalidad hospitalaria en estos pacientes (tabla 13).

	Sig.	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
SOFA	,000	1,431	1,197	1,710
DM	,014	4,443	1,344	14,681
Gram_pos	,555	,704	,219	2,258
Hongos	,401	2,093	,374	11,717
HLA-DRA (<1976 copias/ng)	<b>,007</b>	<b>5,162</b>	<b>1,551</b>	<b>17,177</b>

Tabla 13. Análisis multivariante. Variables de ajuste: SOFA, DM (diabetes mellitus), Gram pos, Hongos, HLA-DRA(1976).

El análisis de Kaplan-Meier mostró que la presencia de niveles de expresión de HLA-DR por debajo de 1976 copias se tradujo en un menor tiempo de supervivencia. Estos pacientes ven acortada su supervivencia en 3 días de media, (23 vs 26 días )(Imagen 21 y Tabla 14).

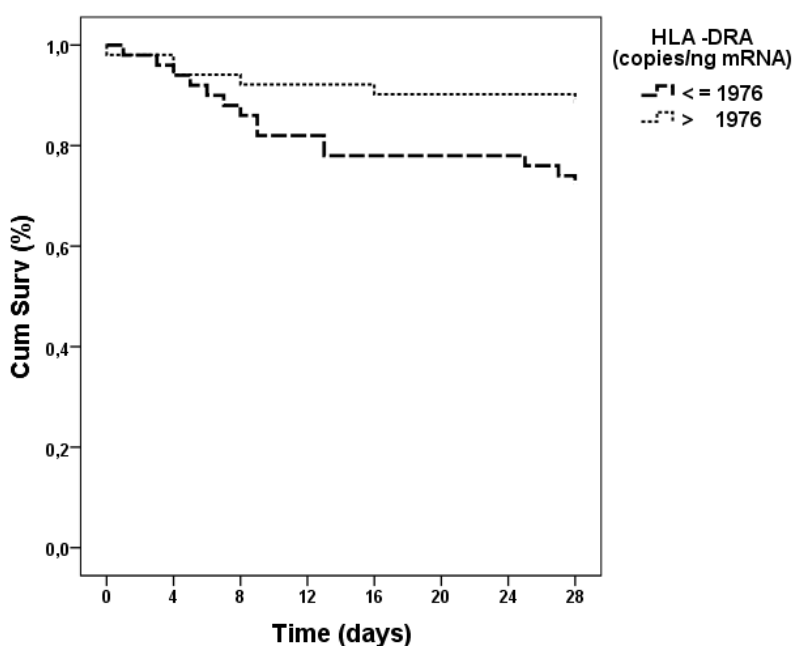


Imagen 21. Kaplan-Meier, análisis de supervivencia a los 28 días posteriores al diagnóstico de sepsis según los niveles de expresión génica de HLA-DRA

HLA-DRA	Estimación (días)	Error típico	IC 95%
< 1976 copias/ng	23,58	1,22	21,17-25,99
≥1977 copias/ng	26,93	0,52	25,89-27,96

Tabla 14. Tabla datos Kaplan Meier disminución de días de supervivencia según niveles de expresión génica de HLA-DRA al diagnóstico de sepsis.

## **II. Utilidad de la combinación de la cuantificación de los niveles de expresión de genes de la sinapsis inmunológica junto con los valores de procalcitonina para el diagnóstico de la sepsis en pacientes quirúrgicos.**

***Resultados publicados en el artículo “Combined quantification of procalcitonin and HLA-DRA improves sepsis detection in surgical patients”. Scientific Reports<sup>123</sup>***

Como comprobamos en el trabajo anterior, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica es una herramienta valiosa en la detección de sepsis en los pacientes quirúrgicos, siendo el HLA-DRA el que mejores resultados ofrece tanto en el diagnóstico diferencial de la enfermedad como incluso su asociación al riesgo de mortalidad hospitalaria.

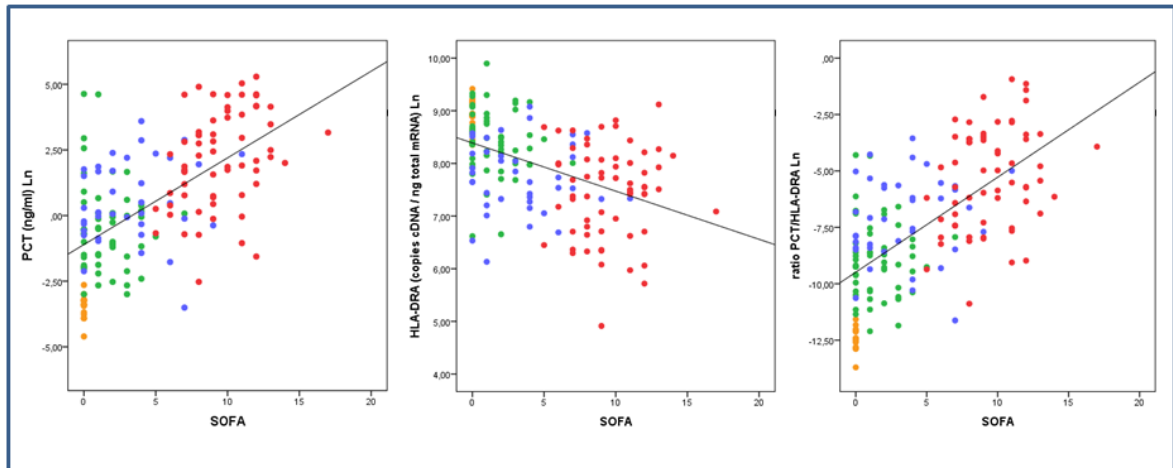
Por este motivo, en un segundo paso evaluamos la precisión diagnóstica de la combinación de los niveles plasmáticos de biomarcadores clásicos como procalcitonina y los niveles de expresión de HLA-DRA en sangre para detectar sepsis en pacientes quirúrgicos.

Las características clínicas de los pacientes se describen las tablas 8 y 10.

### **II.1 Concentración de PCT y HLA-DRA en los grupos de la cohorte**

En la siguiente imagen (Imagen 22), se muestra como los valores de procalcitonina aumentan con el fallo de órgano medido por la escala SOFA en los pacientes quirúrgicos diagnosticados de sepsis. Por el contrario, los niveles de expresión de HLA-DRA disminuyen conforme aumenta la puntuación en la escala SOFA en estos pacientes.

En consecuencia, el ratio entre ambos biomarcadores aumenta con la gravedad de la enfermedad. Los niveles de procalcitonina y HLA-DRA muestran una correlación inversa y significativa.



Controles Sanos Controles Quirúrgicos Sepsis Shock Séptico

Imagen 22. Gráfica de puntos de la distribución de los pacientes en función de la escala SOFA, niveles de PCT, niveles de HLA-DRA, y el ratio PCT/HLA-DRA.

## **II.2 Sensibilidad y Especificidad para identificar la presencia de sepsis**

El área bajo la curva obtenido de la procalcitonina para la diferenciación entre pacientes quirúrgicos sépticos de los no infectados se comparó con el obtenido del ratio PCT/HLA-DRA. Como evidencia el test DeLong, el ratio PCT/HLA-DRA es capaz de mejorar la precisión diagnóstica de la PCT de manera significativa (Imagen 23).

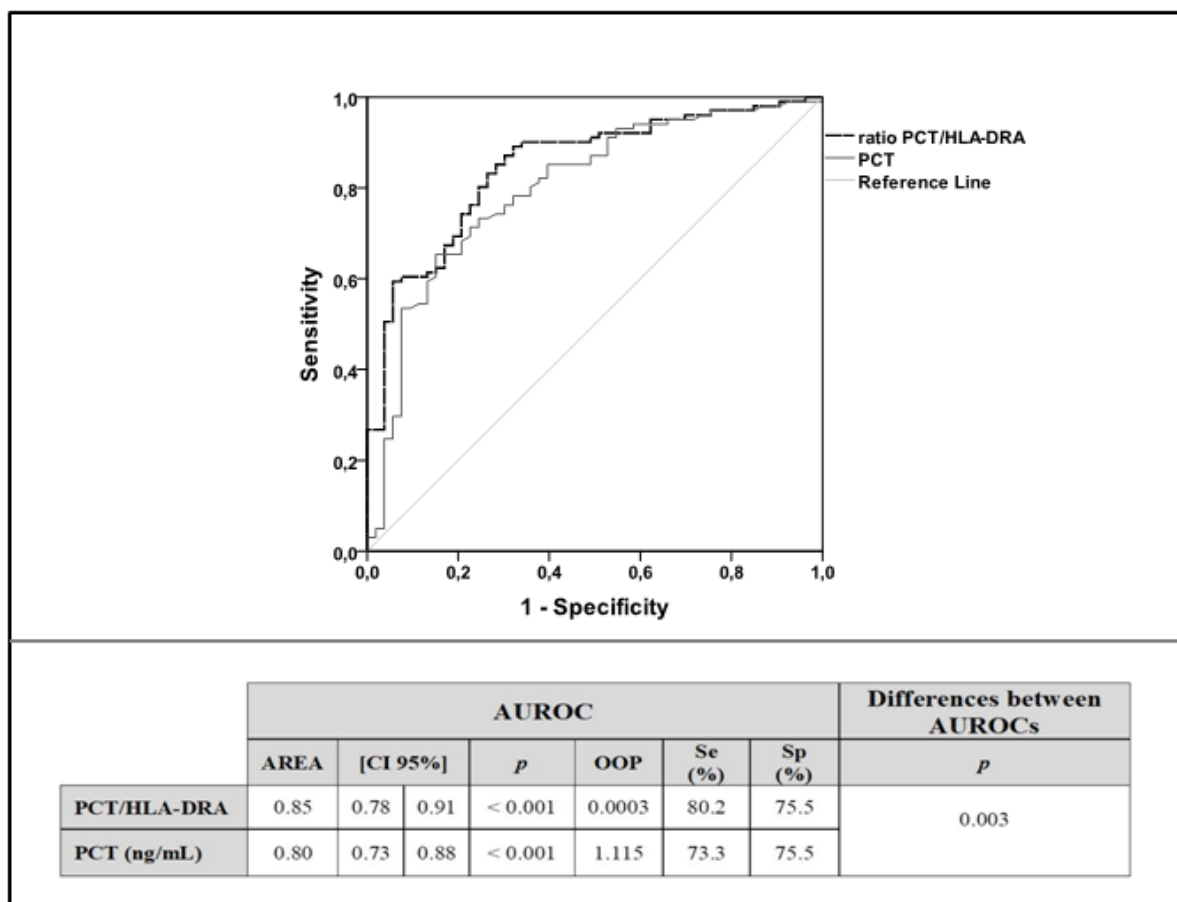


Imagen 23. Análisis AUROC para el diagnóstico diferencial entre pacientes quirúrgicos sépticos y los controles quirúrgicos sin sepsis. OOP: optimal operating point, Se: sensibilidad, Sp: especificidad.

El ratio PCT/HLA-DRA mejora la capacidad diagnóstica del uso aislado de la PCT al tener mejor balance sensibilidad y especificidad con una AUROC de 0.85 en comparación con la PCT en solitario de AUROC 0.80. Además, observamos que esta diferencia es significativa con una  $p$  0,003. Como podemos observar en la tabla de la imagen 23, ambas curvas ROC poseen muy buenos valores tanto de sensibilidad como especificidad, siendo capaz de alcanzar el ratio propuesto de PCT/HLA-DRA una sensibilidad mayor de 0.8.

Además, calculamos el punto de corte óptimo (OOP) para la procalcitonina y el ratio que combina ambos biomarcadores, obteniendo de nuevo muy buenos valores de sensibilidad y especificidad y demostrando mejores resultados para la combinación de PCT/HLA-DRA en comparación de los resultados de la procalcitonina de forma aislada.

El análisis multivariable demostró que el ratio PCT/HLA-DRA mejora la precisión diagnóstica de la procalcitonina en solitario (tablas 15 y 16). La asociación entre este ratio y sepsis fue independiente de la gravedad de la enfermedad o de otros factores de confusión como las comorbilidades que pudiese padecer el paciente previamente, como también el estado inflamatorio basal valorado por los niveles de proteína C reactiva en plasma y la cantidad de neutrófilos en sangre.

En nuestros resultados también observamos que tanto el aumento en la escala SOFA, como que la cirugía sea urgente o la proteína C reactiva son marcadores independientes de sepsis, incrementando el riesgo de padecer la enfermedad en los pacientes quirúrgicos.

Por lo tanto, tener ratio PCT/HLA-DRA > 0,0003 multiplica por siete la probabilidad de padecer sepsis de manera significativa en los pacientes quirúrgicos. En cuanto a la procalcitonina en solitario, vemos que valores >1.115 ng/ml aumentan por cuatro el riesgo de padecer sepsis entre los pacientes sometidos a cirugía (tablas 15 y 16).

	<i>Análisis multivariante ratio PCT/HLA-DRA</i>			<i>Análisis multivariante PCT</i>		
	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p</i>
<i>SOFA score</i>	1,47	1,16-1,87	0,002	1,49	1,17-1,90	0,001
<i>Edad</i>	1,00	0,94-1,06	0,873	1,01	0,96-1,07	0,714
<i>Cirugía urgente</i>	45,70	7,02-297,33	<0,001	41,57	6,77-255,39	<0,001
<i>Enfermedad crónica renal</i>	8,09	0,40-165,00	0,174	4,74	0,26-86,12	0,293
<i>Cáncer</i>	1,08	0,29-4,00	0,908	1,24	0,33-4,60	0,748
<i>Diabetes Mellitus</i>	2,89	0,69-12,22	0,149	2,41	0,61-9,57	0,210
<i>Concentración de neutrófilos en sangre</i>	1,00	1,00-1,00	0,467	1,00	1,00-1,00	0,436
<i>Proteína C Reactiva</i>	1,00	1,00-1,01	0,026	1,00	1,00-1,01	0,021
<i>PCT/HLA-DRA&gt;OOP (0,0003)</i>	7,66	1,82-32,29	0,006	-	-	-
<i>PCT&gt;OOP (1.115ng/ml)</i>	-	-	-	4,21	1,15-15,43	0,030

Tabla 15. Análisis multivariante para evaluar el riesgo de padecer sepsis en la cohorte I basado en el ratio PCT/HLA-DRA o en función de los niveles de PCT. (Concentración de neutrófilos en sangre; cel/mm<sup>3</sup>)

Los resultados fueron validados en una segunda cohorte:

	Análisis multivariante ratio PCT/HLA-DRA			Análisis multivariante PCT		
	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
SOFA score	0,94	0,7-1,25	0,690	1,00	0,77-1,30	0,992
Cirugía urgente	45,68	2,8-744,81	<0,007	31,87	2,95-344,67	<0,004
Cáncer	0,17	0,02-1,34	0,092	0,20	0,03-1,34	0,097
Concentración de neutrófilos en sangre	1,00	1,00-1,00	0,471	1,00	1,00-1,00	0,754
Proteína C Reactiva	1,00	0,98-1,02	0,941	1,01	0,99-1,02	0,503
PCT/HLA-DRA>OOP (0,0003)	34,86	1,22-995,08	0,038	-	-	-
PCT>OOP (1.115ng/ml)	-	-	-	5,52	0,40-75,78	0,201

Tabla 16. Análisis multivariante para evaluar el riesgo de padecer sepsis en la cohorte II basado en el ratio PCT/HLA-DRA o en función de los niveles de PCT. (Concentración de neutrófilos en sangre; cel/mm<sup>3</sup>)

## ***VII. Discusión***

---



## VII. DISCUSIÓN

---

La detección precoz de la sepsis es vital para el éxito del tratamiento y evolución de la enfermedad. Es un reto particularmente importante en los pacientes sometidos a cirugía, donde una pronta intervención y control del foco infeccioso es crucial para aumentar la supervivencia de éstos.

En los pacientes quirúrgicos, algunos de los signos que nos podrían hacer pensar en el diagnóstico de sepsis, pueden enmascarse debido a la propia cirugía o del manejo perioperatorio analgésico que precisan. Por lo tanto, es fundamental que en este tipo de pacientes podamos contar con biomarcadores que puedan diagnosticar la enfermedad de la forma más precoz y fiable posible.

En la sepsis observamos la coexistencia de una respuesta inflamatoria exacerbada con la depresión de la expresión de los genes de la sinapsis inmunológica <sup>114</sup>. Los biomarcadores clásicos hasta ahora utilizados nos ayudan en el diagnóstico ante la sospecha de sepsis<sup>49</sup>, pero ante esta realidad parece razonable apostar por la combinación de biomarcadores que reflejen el estado proinflamatorio con aquellos que muestran inmunosupresión<sup>71, 115, 116</sup>.

Esta tesis doctoral trata de mostrar la utilidad de la cuantificación del grado de inmunosupresión en el diagnóstico de la sepsis y cómo este diagnóstico mejora gracias a la combinación de un marcador que valora la inmunosupresión con los biomarcadores clásicamente utilizados como la PCT.

### **Utilidad de la PCR digital**

Un punto importante a remarcar en nuestro trabajo es el uso pionero de una nueva tecnología de PCR de tercera generación para la cuantificación de expresión génica, la PCR digital (ddPCR) <sup>96, 107</sup>, (Imagen 24). Cabe destacar también que para este trabajo desarrollamos una nueva forma de reportar los resultados de cuantificación de los niveles de expresión génica,

consistente en referir los mismos a copias de ADNc por nanogramo de ARNm de partida, método que evita utilizar genes *housekeeping* de referencia y que ha sido refrendado por una publicación en *Annals of Surgery*, primera revista en impacto en el área de la Cirugía<sup>83</sup>.

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

La cuantificación de la expresión génica mediante *microarrays* o **PCR en tiempo real** (2ª generación) ha sido muy utilizada para la identificación de biomarcadores en sepsis. Como referencia encontramos los trabajos de Cajander y col.<sup>92, 124</sup> en los cuales esta tecnología ha sido utilizada para medir HLA-DR. Sin embargo, el uso de ddPCR para este fin es novedoso, siendo nuestro trabajo el primero realizado mediante PCR digital en sepsis.

La PCR en tiempo real es una técnica que precisa de un gen de referencia *housekeeping*, a partir del cual crea una curva patrón, lo que crea problemas en la estandarización y además la medición que ofrece es semicuantitativa, a diferencia de la PCR digital que es cuantitativa absoluta y no precisa de genes de referencia.

La PCR digital es capaz de dar resultados de cuantificación de ARNm en menos de cuatro horas, con un coste aproximado de veintiseis euros por determinación. A diferencia de la PCR en tiempo real, la PCR digital es una técnica fácilmente reproducible, muy exacta y rápida, que además posee gran sensibilidad y evita problemas de otras generaciones anteriores como la necesidad de utilizar curvas patrón<sup>108</sup>. Por lo tanto, pensamos que es buen método para ser aplicado en clínica (tabla 17).



Imagen 24. PCR digital

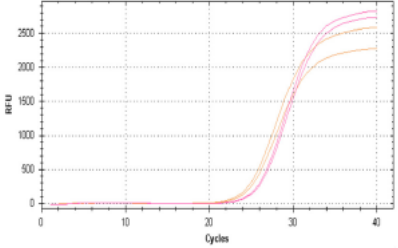
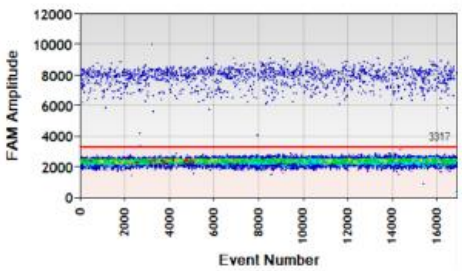
PCR tiempo real (2ª generación, 1996)	PCR digital (3ª generación, 2011)
<p>Determina la cantidad relativa, determina el número de copias interpolando en una curva estándar, comparando con una referencia</p>	<p>Mide cantidades absolutas de RNA o DNA, proporciona niveles de expresión cuantificación absoluta, en pocas abundantes, muestras complejas</p>
<p>Los datos son una curva con una forma determinada que puede ser afectada por muchos factores (eficiencia de la reacción, ruido de fondo...)</p> 	<p>Es una lectura de punto final, positivos o negativos, con menor impacto de ruido biológico o fluorescente</p> 

Tabla 17. PCR tiempo real vs. PCR digital

Por otro lado, hasta la fecha, la mayoría de los trabajos que han medido HLA-DR se han realizado mediante **citometría de flujo**<sup>125-127</sup>. Una de las desventajas de esta técnica es la necesidad de preservar las células vivas para poder medir la unión de anticuerpos a la superficie de la célula, al contrario que la PCR digital que no es esclava del tiempo, puesto que es posible analizar la muestra después de haberla congelado en un tubo Pax gene, incluso si se quiere meses después.

Encontramos en la literatura usos frecuentes de la PCR digital, entre ellos la detección de moléculas tumorales en las muestras biológicas<sup>128</sup> o de enfermedad residual, como en el caso de la leucemia después de haber realizado el trasplante de médula ósea, así como el diagnóstico a través de ARNm de múltiples y diversas enfermedades<sup>129</sup>. Sin embargo, no existen trabajos previos que utilicen esta técnica en los pacientes con sepsis previamente a nuestro estudio. Por otro lado, no solo se propone su uso como detección, es decir diagnóstico, sino que se abre la puerta a que sea útil tanto en el seguimiento y respuesta de los tratamientos, así como en el pronóstico, poniendo de manifiesto la utilidad de la técnica y su potencial aplicación a la clínica.

### **Depresión de los niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica en la sepsis**

En cuanto al diagnóstico de sepsis, la depresión de los niveles de expresión de genes involucrados en la sinapsis inmunológica es una señal biológica de la enfermedad<sup>114</sup>. En nuestro trabajo encontramos esta depresión también en los pacientes sometidos a cirugía que no presenta sepsis. Existen diversos estudios que han caracterizado los fenotipos inmunológicos que se desarrollan en los pacientes sépticos, así en el estudio de Davenport y col. se identificó la disminución de la expresión de estos genes en los pacientes sépticos con neumonía adquirida en la comunidad pero mediante el uso de *microarrays*<sup>82</sup>. Otro estudio a destacar es el estudio EXPRESS, en el cual entre otros se identifican los principales genes

relacionados con la presentación de antígeno y que ven disminuidos sus niveles de expresión con la sepsis<sup>97</sup>.

En este sentido, en nuestro trabajo demostramos que debido a la depresión funcional por la que las células no están produciendo la expresión de estos genes, bien por la disminución del número de células presentadoras de antígeno, o de monocitos, o bien de linfocitos B, observamos niveles deprimidos de los transcritos de ARN mensajero correspondiente a los genes analizados en los pacientes quirúrgicos, con mayor depresión si son además pacientes sépticos, y aún más si están graves.

En la sepsis se observa cómo la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno esta disminuida tanto en tejidos linfoides como no linfoides, alterando la regulación inmune y la respuesta antimicrobiana de las células T, así como la respuesta de anticuerpos<sup>96</sup>. Realmente desconocemos el motivo por el cual estos genes ven deprimida su expresión. Puede que las células hayan muerto o bien migrado a los tejidos, o puede simplemente que no estén expresando estos genes. En cualquier caso, elucidadas las causas de esta hipo-expresión no es el objeto de esta tesis, sino evaluar su utilidad como biomarcadores para el diagnóstico de la sepsis.

Los genes implicados en la sinapsis inmunológica y que nosotros empleamos en nuestro estudio son HLA-DRA, CD3E, CD40LG, CD28 e ICOS. Estos genes están relacionados con la inmunidad adaptativa, realizando la presentación de antígeno, es especial las moléculas de clase HLA II, de ellas fundamentalmente HLA-DRA<sup>92, 96, 97</sup>.

Entre los genes estudiados en nuestro trabajo el gen que sufre una mayor depresión en su expresión es el gen HLA-DRA, seguido de CD3E. Como podemos observar en nuestro trabajo, en los diagramas de cajas analizados en los resultados, los pacientes quirúrgicos no sépticos ven disminuidos sus niveles de expresión en los genes de la sinapsis inmunológica a pesar de no estar infectados. Además, cuanto mayor es el fracaso de la función orgánica observamos como hay una mayor disminución de los niveles de expresión en estos genes, correlacionándose con la disfunción y el fracaso de órgano.

El gen HLA-DRA y la depresión de sus niveles en pacientes críticos (sepsis, pancreatitis, pacientes quemados o quirúrgicos) se ha estudiado ampliamente desde hace unos años atrás.

Numerosos artículos han descrito la disminución de la expresión en sus niveles durante el desarrollo de la sepsis utilizando diferentes tecnologías para la medición desde citometría de flujo, *microarrays*, hasta técnicas de PCR, pero en ningún caso PCR digital. Cajander y col.<sup>92, 124</sup> propone en diversos estudios la medición de HLA-DRA mediante qRT-PCT para identificar pacientes con sepsis grave y cuantificar la inmunosupresión desarrollada durante la enfermedad, relacionando esta depresión de los niveles expresados de HLA-DRA con el pronóstico de la enfermedad, y su utilidad en el tratamiento para aquellos pacientes que pudiesen beneficiarse de terapias de inmunoestimulación. En nuestro trabajo, demostramos la utilidad de la medición de los niveles de expresión de este gen en pacientes sépticos como una herramienta útil también para el diagnóstico diferencial y además eliminamos las desventajas de la PCR de tiempo real al usar la evolución de la PCR digital. En nuestra opinión, una de las principales desventajas en estos estudios hasta la fecha es la limitación de la aplicación tanto de los *microarrays* como la PCR a tiempo real en la práctica clínica diaria, superada con esta nueva tecnología.

Son también numerosos los estudios que relacionan de forma significativa el descenso de los niveles de HLA-DRA con el riesgo aumentado de mortalidad hospitalaria. Monneret y col. relaciona la disminución en la expresión de este gen en pacientes sépticos con el pronóstico de mortalidad en su estudio de 2006<sup>130</sup>. Posteriormente, Cazalis y col. también confirma en su estudio<sup>117</sup> la relación entre la disminución de expresión del HLA-DRA y la mortalidad en la sepsis. Con nuestro trabajo demostramos que el gen HLA-DRA es el único gen de la sinapsis inmunológica que se asocia de forma independiente con el riesgo de mortalidad hospitalaria, confirmando ser por tanto un pilar clave en la presentación de antígeno en la sepsis. Observamos que en los pacientes que en un inicio de la enfermedad se cuantifican niveles de expresión más bajos de HLA-DRA, presentan con mayor probabilidad peor pronóstico incrementado el riesgo de mortalidad. Pero es gracias a la nueva tecnología empleada de la PCR digital y al método que hemos diseñado específicamente, que podemos cuantificar los niveles de expresión demostrando que tener < 1976 copias de HLA-DRA por nanogramo al diagnóstico de sepsis incrementa por cinco la probabilidad de mortalidad hospitalaria de manera significativa. En el análisis de Kaplan-Meier demostramos también que la presencia de

niveles de expresión de HLA-DR por debajo de 1976 copias se tradujo en un menor tiempo de supervivencia, acortándose en tres días de media.

Con respecto al resto de genes de la sinapsis inmunológica que hemos estudiado, el siguiente que mejores resultados ofrece en cuanto a la disminución de sus niveles de expresión de forma significativa entre los diferentes grupos es el gen CD3E.

El gen CD3E es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de las células T formando parte un receptor que transmite señales intracelulares para la activación de cascadas de transducción cuando es reconocido el antígeno en superficie. En la literatura se le relaciona con la presentación de antígeno y su alteración en la regulación durante la sepsis. Almansa y col. en su estudio EXPRESS observa la disminución de sus niveles de expresión al caracterizar la alteración del sistema inmune desarrollada durante la sepsis<sup>97</sup>. En anteriores artículos, únicamente había sido identificado como gen implicado en la sinapsis inmunológica<sup>97, 114</sup>. En nuestro trabajo observamos que, aunque a diferencia del HLA-DRA el gen CD3E no se relaciona de forma independiente con el aumento del riesgo de mortalidad hospitalaria, es claramente capaz de diferenciar entre los diversos grupos de pacientes no infectados tanto controles sanos, como quirúrgicos sanos. Además, también es capaz de hacerlo de forma significativa entre los pacientes quirúrgicos sépticos con menor disfunción orgánica de aquellos que presentan mayor gravedad con SOFA>8. En nuestro estudio es la primera vez que se analiza la capacidad del gen CD3E para hacer diagnóstico diferencial entre diferentes grupos de pacientes sanos y sépticos, así como según la gravedad de la enfermedad.

En cuanto al gen CD40LG, se identifica también en la literatura ya mencionada como gen implicado en la sinapsis inmunológica y por tanto afectado en su expresión en la sepsis. Nosotros observamos de nuevo resultados significativos al demostrar su capacidad para el diagnóstico de la enfermedad. Este gen, al igual que los dos anteriores mencionados, posee niveles de expresión disminuidos en los controles quirúrgicos, y de manera más acusada en los pacientes sépticos, sobre todo en los pacientes más graves. También posee un buen balance entre sensibilidad y especificidad en su curva ROC, al igual que los genes anteriores, aunque el HLA-DRA reporta mejores resultados. Sin embargo, al igual que ocurre con el gen CD3E, no se le relaciona con un aumento en la probabilidad de mortalidad hospitalaria.

La deficiencia del gen CD40LG, se asocia también en la literatura con el desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia con Hiper- IgM (*X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*) (*HIGM1*), siendo ésta una inmunodeficiencia primaria congénita la cual se caracteriza por el desarrollo recurrente de infecciones, con mayor frecuencia del tracto respiratorio superior e inferior, donde los niveles plasmáticos de la inmunoglobulina M (IgM) son normales o bien están aumentados, pero se detectan niveles disminuidos de las inmunoglobulinas G, A, y E (IgG, IgA, IgE)<sup>131</sup>. Estos pacientes tienen una deficiencia en la producción de la proteína CD40LG, la cual se encuentra en la superficie de los linfocitos T, para realizar su función de presentadora de antígeno a los linfocitos B, hecho que se ve truncado por su deficiencia, impidiendo así que los linfocitos B cambien su producción de IgM a IgG e IgA<sup>132</sup>. Diversos estudios reportan casos clínicos de esta enfermedad utilizando diferentes técnicas, en la mayoría de los casos citometría de flujo o bien PCR en tiempo real<sup>132</sup>. Una vez más no encontramos en la literatura que se haya usado la PCR digital como técnica de cuantificación de expresión de los niveles de este gen, método que podría ser útil en el diagnóstico precoz de la enfermedad ya que afecta fundamentalmente a niños en su primer año de vida, así como un papel importante en la valoración de la terapia inmune a seguir en el tratamiento<sup>133</sup>.

En cuanto a los resultados hallados en nuestro trabajo con respecto al gen ICOS, no encontramos estudios previos que demuestren la variación de los niveles de este gen en los diferentes grupos de pacientes, observando así su capacidad para diferenciar de forma significativa según sus niveles de expresión a controles sanos, de controles quirúrgicos no infectados y también de aquellos pacientes quirúrgicos infectados.

Como observamos en los genes anteriores, en nuestro trabajo encontramos la capacidad del gen CD28 para discriminar entre los diferentes grupos de pacientes según sus niveles de expresión. Este análisis no lo encontramos en otros trabajos publicados previamente en la literatura. El gen CD28 codifica el receptor CD28 presente en la membrana de los linfocitos T involucrado en la sinapsis inmunológica y si existen trabajos que identifican al receptor CD28 como una diana de ataque sobre la que actúan las toxinas bacterianas de gérmenes gram positivos<sup>134</sup>. A estas toxinas se las llaman superantígenos y tienen la capacidad de interactuar sobre el receptor CD28 en su unión a B7-2, hecho necesario para la presentación de antígeno por parte de las células presentadoras de clase II. Estas toxinas inducen una unión



patológicamente enérgica del receptor, desarrollando una respuesta inflamatoria exacerbada debida a la consecuente hiperestimulación de la liberación de citoquinas<sup>135</sup>. Es por ello, que en diversos artículos se propone el desarrollo de un péptido similar a las toxinas que pueda bloquear esta respuesta como parte de una posible herramienta para el tratamiento de pacientes con este tipo de infección bacteriana, protegiendo así al huésped de la letal y exagerada respuesta proinflamatoria<sup>135</sup>. Incluso, se habla de que pudiese ser eficaz también en las infecciones por bacterias gram negativas o polimicrobianas debido a la respuesta de liberación exagerada de TNF a o IL-6 inducida por la estimulación del receptor CD28<sup>136</sup>. En la actualidad, existen ensayos en fase 3 usando una molécula peptídica similar a CD28 en pacientes con infecciones necrotizantes de tejidos en las cuales a menudo es necesaria la amputación completa o de una parte extensa de la extremidad o de la zona necrótica con una alta tasa de mortalidad<sup>136</sup>.

En nuestro trabajo defendemos la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica como una herramienta útil en el diagnóstico de los pacientes quirúrgicos con sepsis, pero también creemos en su utilidad como monitorización del estado inmune de los pacientes y su uso en la evaluación del pronóstico y tratamiento de los enfermos. En especial, como demuestran nuestros datos y otros estudios, la expresión del gen HLA-DRA demuestra ser un buen indicador del estado inmune del paciente y demostramos su relación con la mortalidad siendo un factor de riesgo independiente. Además, proponemos la combinación de los niveles de expresión de HLA-DRA con los niveles en sangre del biomarcador clásico procalcitonina, demostrando que mejora la capacidad diagnóstica de la procalcitonina en solitario de manera significativa.

### **Utilidad de la procalcitonina**

La procalcitonina sigue siendo un biomarcador de referencia en sepsis aportando información valiosa tanto para el diagnóstico como para guía de la terapia antibiótica o incluso para el pronóstico. Numerosos trabajos sobre este biomarcador evidencian su utilidad, no sin remarcar la necesidad de apoyarse en otros datos clínicos o biomarcadores para una mayor precisión

diagnóstica<sup>137</sup>. Los niveles de procalcitonina nos ayudan a discriminar entre una infección bacteriana o viral. La PCT tiene una vida media corta (25-30h) y sus niveles descienden rápidamente cuando se controla la infección<sup>138</sup>. Estas propiedades hacen que este biomarcador muy valioso como guía en la retirada temprana de la terapia antibiótica con una mayor seguridad<sup>139</sup>. A este respecto, existen ensayos que han demostrado cómo el uso de algoritmos basados en los niveles de PCT pueden reducir de manera segura el uso de antibióticos<sup>140, 141</sup>.

No encontramos en la literatura otros estudios que realicen un análisis de la capacidad diagnóstica en sepsis de los genes implicados en la sinapsis inmunológica en los diferentes grupos de pacientes que hemos realizado en nuestro estudio, y tampoco que combinen distintos biomarcadores demostrando mejorar la capacidad diagnóstica del uso en solitario de la procalcitonina, como tampoco que usen una tecnología puntera como la PCR digital en sepsis que demuestra ser aplicable a la clínica y evite los problemas de otros métodos de análisis de expresión génica.

### **Futuras perspectivas**

Cada vez son más los estudios que demuestran la importancia de la sinapsis inmunológica en el desarrollo de la sepsis, el papel fundamental que puede tener ser capaces de cuantificar la inmunodepresión de nuestros pacientes, y en especial en aquellos que pueden partir de un estado previamente inmunocomprometido como el hecho de ser sometidos a cirugía. Como nosotros proponemos en nuestro estudio, la valoración de la disminución de los niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica puede tener implicaciones no sólo en el diagnóstico de la sepsis, sino en el pronóstico de nuestros pacientes, así como en la valoración individualizada de la terapia clásica o de la inmunoterapia en cada paciente, que es cada vez más defendida en la literatura y para la cual se necesitan de biomarcadores y tecnología que sea capaz de valorar de forma rápida y fiable el estado inmune del paciente<sup>142</sup>.

En los últimos años, numerosos ensayos clínicos estudian la terapia inmune como una opción de tratamiento que pudiese ser satisfactoria en la sepsis. Parece por ello estar cada vez más

justificado que seamos capaces de evaluar el estado inmune de nuestros pacientes a tiempo real, pudiendo ser la clave para el éxito de estas terapias<sup>143</sup>. Nuestro estudio demuestra que la PCR digital puede ser útil a este respecto.

Las nuevas terapias inmunes enfocan más objetivo a revertir el estado de inmunodepresión de la sepsis, puesto que el 70% de los pacientes mueren cuando predomina esta fase. En nuestro trabajo observamos que la inmunosupresión que se da en el paciente séptico se traduce en la alteración de la sinapsis inmunológica, con depresión de los niveles de expresión de los genes en ella implicados, y en la cual se centran las últimas terapias inmunológicas propuestas<sup>144</sup>.

Los agentes inmunomoduladores que han sido utilizados en los estudios con mejores resultados hasta la fecha y que han demostrado incluso mejorar la supervivencia son la IL-7, anticuerpos contra el receptor de muerte programada PD-1 (anti PD-1) y los anticuerpos contra su ligando (anti PD-L1) que bloquean la inhibición de las células T. Otras moléculas también estudiadas recientemente han sido el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Cada vez son más los estudios que apuestan por la terapia con anticuerpos que bloquean la muerte celular programada del linfocito en pacientes donde se demuestra inmunosupresión, como son los pacientes sépticos o con cáncer<sup>145</sup>. Hotchkiss y col. en su estudio de 2018 demuestran que la administración de una dosis única de anti-PD-L1 no produce efectos adversos o autoinmunes secundarios, es bien tolerada, segura, sin desarrollar tampoco una respuesta exagerada inflamatoria<sup>146</sup>. Además, se observa un aumento de los niveles de expresión de HLA-DRA con dosis mayores de anti-PD-L1, aunque sin evidencia estadísticamente significativa. Actualmente en Japón hay un ensayo clínico en marcha probando un anticuerpo monoclonal IgG4 (Nivolumab; ONO-4538/BMS-936558) que bloquea el receptor de muerte programada (PD-1) en pacientes con sepsis o shock séptico.

Otra línea de creciente interés, así como de complejidad en su respuesta, es la determinación de una guía de consenso para el tratamiento antibiótico de la sepsis. Como sabemos en la sepsis es de vital importancia establecer el tratamiento antibiótico de forma rápida y adecuada, así como poder tener una mayor certeza a la hora de la retirada antibiótica o desescalado, lo cual hoy en día resulta en muchas ocasiones incierto o por lo menos hallamos falta de

evidencia. Lo que es cierto es que un uso cada vez más eficaz del arsenal terapéutico del que disponemos ha de pasar por acortar lo máximo posible la duración del tratamiento antibiótico, minimizando así el desarrollo de resistencias antibióticas, infecciones secundarias y el coste de los cuidados sanitarios<sup>147</sup>. La monitorización de los niveles de procalcitonina es una de las herramientas mejor estudiadas que demuestra el potencial de este biomarcador. Sin embargo, la interpretación de sus niveles puede ser todo un reto, sobre todo si tenemos en cuenta las comorbilidades que muchas veces asocian nuestros pacientes y que influyen en sus niveles<sup>137, 148</sup>.

No existe a día de hoy un biomarcador que en solitario haya demostrado ser infalible en el manejo de la sepsis. Es por ello que creemos tal y como demostramos en nuestro trabajo que la combinación de la procalcitonina con los niveles de expresión de HLA-DRA, que representan los dos inmunofenotipos desarrollados durante la fisiopatología de la sepsis, es una buena herramienta que mejora las opciones hasta día de hoy presentes y que podría tener implicaciones en diferentes facetas del manejo de la enfermedad.

En la actualidad, existen nuevas tecnologías de *point of care* que permiten la medición de HLA-DR en la cabecera del paciente<sup>149</sup>, así como también existen otros capaces de medir procalcitonina<sup>150</sup>. Esta tecnología permite medir de forma muy rápida niveles de estos dos marcadores a pie de cama del paciente, y mejorar la capacidad diagnóstica de la sepsis con su combinación como demostramos en esta tesis.

### **Limitaciones de este trabajo**

En este trabajo nos ha faltado cuantificar los niveles de expresión de HLA-DRA a lo largo de la evolución del paciente, ya que el incremento o el descenso de los mismos podría aportar información complementaria sobre el pronóstico del paciente. Tampoco hemos comparado el valor pronóstico del HLA-DRA con el de otros biomarcadores emergentes como la proadrenomedulina. La combinación de estas dos moléculas podría ser muy prometedora para estratificar riesgo y mejorar la estimación de pronóstico de los pacientes con sepsis.

Finalmente, no hemos estudiado si los niveles de HLA-DRA bajos son previos a la sepsis o son inducidos por la misma, o ambos escenarios se dan de forma simultánea. Para ello sería necesario estudiar los niveles de expresión de este gen en cohortes de pacientes antes de la sepsis.

En resumen, la sepsis consume gran cantidad de recursos económicos en los hospitales, siendo una de las primeras causas de muerte en las UCIs, con una prevalencia que lejos de descender se incrementa de manera progresiva. Por lo tanto, es prioritario mejorar las herramientas diagnósticas que nos permitan detectar la enfermedad lo más precozmente posible, puesto que de ello depende en gran medida el éxito del tratamiento. Con nuestro trabajo demostramos que la PCR digital es un método novedoso, rápido, fiable, y aplicable a la clínica para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes involucrados en la sinapsis inmunológica en los pacientes quirúrgicos tanto sépticos como no infectados. Además, creemos que esta técnica puede ser útil en la monitorización del estado inmune de los pacientes sépticos, ayudando a valorar el pronóstico y guiando el tratamiento de la enfermedad.

Como demostramos en nuestro estudio podemos cuantificar el grado de inmunosupresión. Los pacientes quirúrgicos por el mero hecho de someterse a la cirugía presentan un estado inmune comprometido que les hace más vulnerables a la infección, por lo que creemos que sería interesante saber el estado inmune previo de nuestros pacientes antes de someterse a una agresión quirúrgica pudiendo tener incluso implicaciones en el tipo de profilaxis a llevar a cabo.

Actualmente no se conoce un biomarcador ideal en sepsis que sea capaz de guiarnos con toda seguridad en el manejo de la enfermedad, desde el diagnóstico, el tratamiento terapéutico, como la propia retirada de la antibioterapia. En nuestro estudio demostramos en el uso de la combinación de los niveles de procalcitonina con los niveles de expresión del gen HLA-DRA mejora la capacidad de diagnóstico de la enfermedad en comparación con el uso aislado del biomarcador clásico procalcitonina, y es por ello que creemos que es una vía interesante para desarrollar y también para estudiar su utilidad en el manejo terapéutico de la sepsis.

## ***VIII. Conclusiones***

---

## VIII. CONCLUSIONES

---

1. Tanto los pacientes quirúrgicos no sépticos como sépticos presentan depresión de los niveles de expresión de genes implicados en la sinapsis inmunológica, aunque puede observarse que esta depresión es mayor en los pacientes sépticos.
2. Existe una correlación entre la gravedad de la sepsis y la depresión en los niveles de expresión de los genes de la sinapsis inmunológica, de modo que a mayor gravedad, menores niveles de expresión de estos genes.
3. De los genes implicados en la sinapsis inmunológica el que mejor diferencia entre los pacientes quirúrgicos que han desarrollado sepsis de los que no presentan infección es el gen HLA-DRA, aunque el resto de genes estudiados presentaron áreas bajo la curva significativas para la diferenciación entre sepsis y no sepsis.
4. La depresión de los niveles de expresión de HLA-DRA  $< 1976$  copias/ng es un factor independiente que incrementa por cinco el riesgo de mortalidad hospitalaria en los pacientes quirúrgicos en el momento en que son diagnosticados de sepsis. Presentar menos de 1976 copias/ng de HLA-DRA en el momento del diagnóstico se traduce en una reducción de la supervivencia en tres días de media en los primeros veintiocho días.
5. También observamos que son factores independientes de riesgo de mortalidad hospitalaria el antecedente personal de padecer Diabetes Mellitus, así como obtener un valor por encima de ocho en la escala de SOFA en el momento del diagnóstico de sepsis.
6. La combinación resultante de la cuantificación de procalcitonina con los niveles de expresión génica de HLA-DRA es una estrategia prometedora para la detección de

sepsis en los pacientes quirúrgicos, mejorando la capacidad diagnóstica de la procalcitonina utilizada de forma aislada.

7. Presentar un ratio PCT/HLA-DRA  $> 0,0003$  es un factor de riesgo independiente que multiplica por siete la probabilidad de sepsis en los pacientes quirúrgicos.
  
8. La PCR digital es un nuevo método útil, rápido, sensible y fácilmente reproducible en la medición de los niveles de expresión génica, que puede ser aplicable para la práctica clínica diaria.



## ***IX. Rendimiento Científico***

---

## Artículos internacionales

---

**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;269(3):545-53.**

- **Cuartil: 1**

- **Especialidad: Cirugía**

- **Índice de Impacto (JRC 2019): 9.203**

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

Raquel Almansa, **Silvia Martín**, Marta Martín-Fernandez, María Heredia-Rodríguez, Esther Gómez-Sánchez, Marta Aragón, Cristina Andrés, Dolores Calvo, Jesus RicoFeijoo, Maria Carmen Esteban-Velasco, Luis Mario Vaquero-Roncero, Alicia Ortega, Estefania Gómez-Pesquera, Mario Lorenzo-López, Iñigo López de Cenarruzabeitia, Diana Benavides, Jaime López Sánchez, Cristina Doncel, Carmen González Sánchez, Esther Zarca, Alberto Ríos-Llorente, Agustín Diaz, Elisa Sanchez-Barrado, Juan Beltran de Heredia, Jose Maria Calvo-Vecino, Luis Muñoz-Bellvís, Jose Ignacio GomezHerrerías, César Aldecoa, Eduardo Tamayo, Jesus F. Bermejo-Martin.

- **Revista: Scientific Reports (2018) 8:11999**

- **Cuartil: 1**

- Especialidad: **Multidisciplinar**

- Índice de Impacto (JRC 2019): **4.12**

## **Congresos internacionales**

---

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

Raquel Almansa, **Silvia Martín**, Marta Martin-Fernandez, Esther Gómez-Sánchez, Marta Aragón, Jesus Rico Feijoo, Alicia Ortega, Estefania Gómez-Pesquera, Mario Lorenzo-López, César Aldecoa, Eduardo Tamayo, Jesus F. Bermejo-Martin.

**39<sup>th</sup> ISICEM International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine,**  
Brussels March 19-22, 2019.

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

R Almansa, C Andrés, M Martin-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

**39<sup>th</sup> ISICEM International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine,**  
Brussels March 19-22, 2019.

**Título: Low gene expression levels of FCER1A are associated to presence of sepsis in infected surgical patients**

M Rodriguez Rojo, R Almansa, **S Martín**, D Álvarez Martínez, J López Sánchez, J.F Bermejo

**The European Anaesthesiology Congress, Euroanaesthesia 2019.** Vienna June 1-3, 201

**Título: Cuantificación de la expresión génica de HLA-DRA y detección de mortalidad en pacientes quirúrgicos con sepsis.**

**S. Martín Alfonso**, C. Aldecoa Alvarez-Santullano, A. Ortega Andres, R. Almansa Mora, S. Montero Caballero, F.J. Bermejo Martín

**XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor.** Las Palmas de Gran Canaria, del 25 al 27 de abril de 2019

# 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-Herrerías, 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*, *OLFMA*, *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 changing<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup> In our view, this emerging conception of sepsis offers new opportunities to improve the diagnosis of this deadly condition.<sup>3</sup>

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.<sup>4–6</sup> 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.<sup>4,6–9</sup>

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.<sup>10,11</sup> 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.<sup>12</sup> This technique offers thus a new avenue to accurately measure the transcriptomic changes in blood associated to immunological dysfunction in sepsis.<sup>13</sup>

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](http://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](mailto: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.<sup>14</sup> 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,<sup>1</sup> 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.<sup>4</sup> 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).<sup>4</sup>

#### 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  $\mu$ L) was further diluted (1/25), and 2.5  $\mu$ 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.

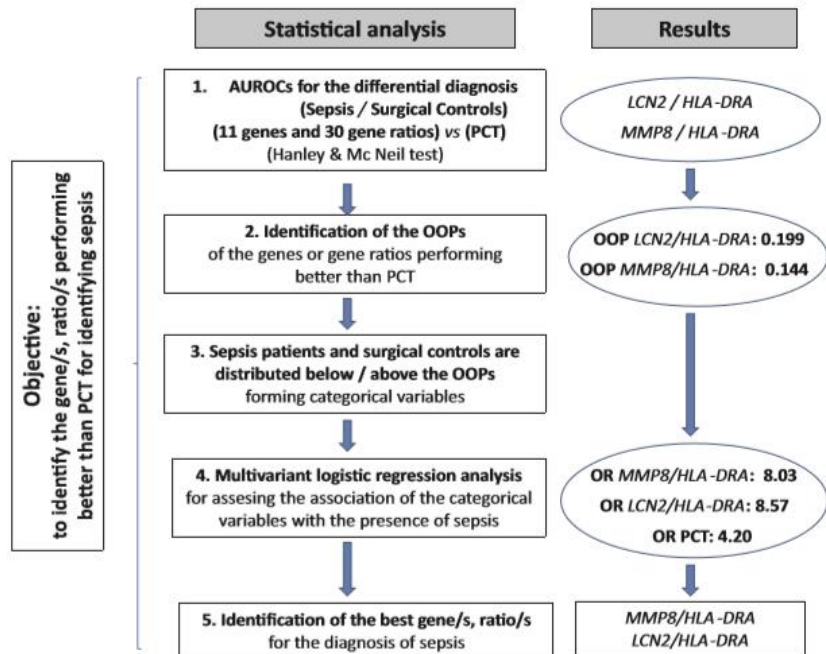
#### Statistical Analysis

Differences in demographic and clinical characteristics between patient groups were assessed using the  $\chi^2$  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.<sup>15</sup> 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)	<0.001
	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.
	Nonsurvivors at day 28, % (n)	19.8 (20)	0	<0.001
	Hospital mortality, % (n)	24.7 (25)	0	<0.001
Source of infection, % (n)	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.
	Bacteremia	4.9 (5)	n.a.	n.a.
	Other	4.9 (5)	n.a.	n.a.
Microbiology, % (n)	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 <sup>3</sup> )	180,000.0 (194.7)	155,000.0 (740000)	n.s.
	INR	1.3 (0.4)	1.2 (0.4)	n.s.
	ScvO <sub>2</sub> (%)	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 <sup>3</sup> )	14,465.0 (10,257.5)	12,290.0 (4875.0)	0.023
	Lymphocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	944.32 (818.6)	1008.0 (894.3)	n.s.
	Monocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	1068.48 (51,887.6)	781.8 (1327.8)	n.s.
	Neutrophils (cells/mm <sup>3</sup> )	12,337.0 (9220.5)	10,016.0 (4704.5)	0.017
	Eosinophils (cells/mm <sup>3</sup> )	49.9 (2052.6)	12.3 (70.4)	0.019
	Basophils (cells/mm <sup>3</sup> )	78.4 (1593.2)	28.8 (68.9)	0.006

Continuous variables are represented as median (interquartile range, IQR); categorical variables were represented as (%). ICU indicates intensive care unit; INR, international normalized ratio; n.a., not applicable; n.s., not significant; ScvO<sub>2</sub>, 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/mm<sup>3</sup>).

### 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,<sup>4</sup> 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 built 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**

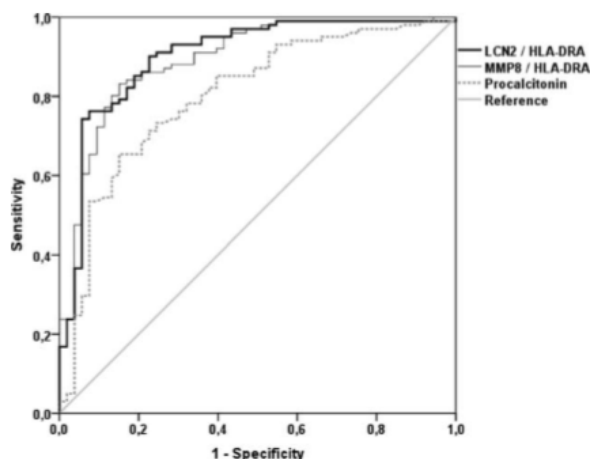
Univariate analysis showed a direct, significant association between expression levels of *MMP8*, *LCN2*, *LTF*, and *PRTN3* with the risk of hospital mortality (data not shown). Nonetheless, *HLA-DRA* was the only gene evidencing a significant (inverse) association between expression levels and mortality 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.<sup>16,17</sup> In addition, the ratios performed better to identify sepsis than other easily accessible measurements such as CRP<sup>17</sup> or the neutrophil to lymphocyte count ratio.<sup>18</sup>





**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.<sup>4</sup> 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.<sup>1</sup>

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.<sup>4,19</sup> In the microarray analysis from Shen et al,<sup>20</sup> *MMP8* ranked first between the upregulated genes distinguishing between presence/absence of sepsis in trauma patients. Yazdan-Ashoori et al<sup>21</sup> 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.<sup>22</sup> Solan et al<sup>23</sup> identified *MMP8* as a novel modulator of inflammation during sepsis and a

potential therapeutic target in this disease. Kangelaris et al<sup>7</sup> 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.<sup>24</sup> Alder et al<sup>25</sup> have recently demonstrated that *OLFM4* is a candidate maker for a pathogenic neutrophil subset in septic shock. Wang et al<sup>26</sup> 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 al<sup>27</sup> showed that *LCN2* (*NGAL*) is an effective predictive factor for acute kidney injury during sepsis showing potential value for mortality prediction. Parnell et al<sup>9</sup> 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 al<sup>28</sup> 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.<sup>4</sup> 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.

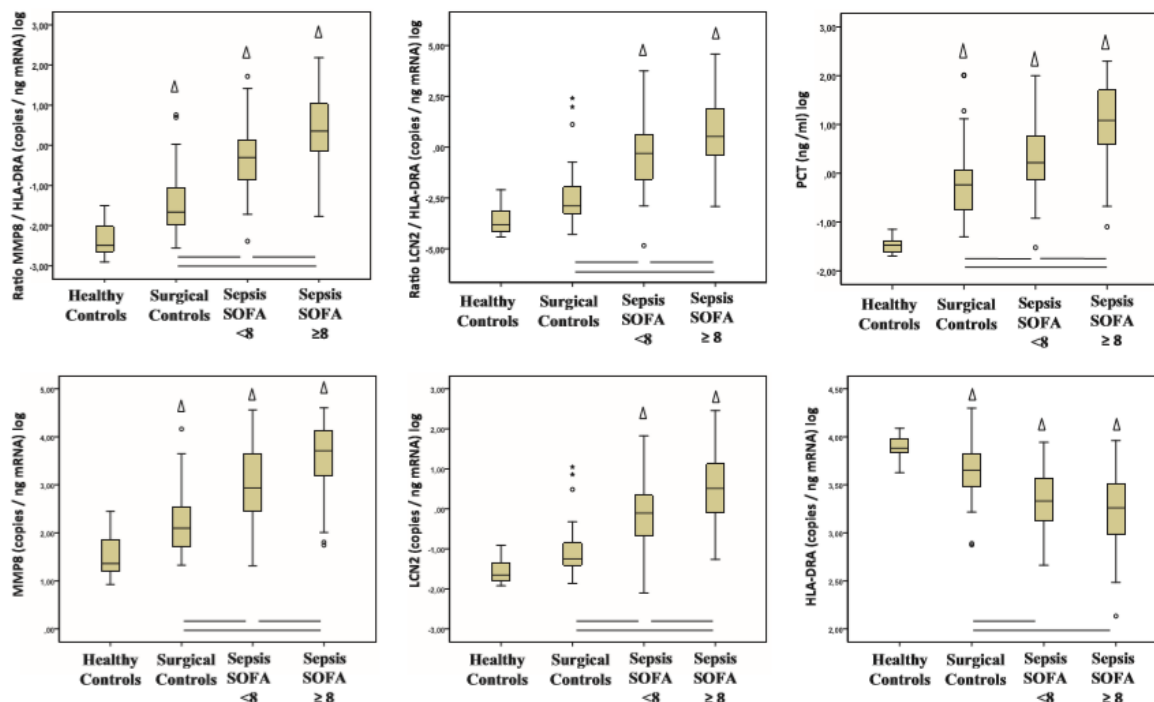
As evidenced by the multivariate analysis, *HLA-DRA* was the only gene independently associated with the risk of hospital mortality, demonstrating a central role of antigen presentation in sepsis. Poor expression of *HLA-DRA* at the first moment of sepsis could preclude mounting effective and balanced 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.<sup>29,30</sup> Cajander et al<sup>11</sup> 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	74.1
<i>MMP8/HLA-DRA</i> >0.144	8.03	2.10 30.76	0.002	83.2	84.9	91.3	72.6
Procalcitonin >1.11 (ng/mL)	4.20	1.15 15.43	0.030	73.3	75.5	85.1	59.7

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/mm<sup>3</sup>, C-reactive protein (mg/dL).

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



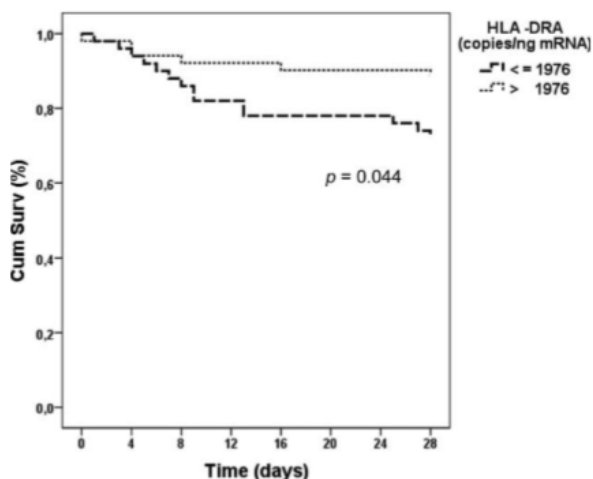
**FIGURE 3.** Box plots showing gene expression levels of *LCN2* and *HLA-DRA*, the ratio between these genes, and the concentration of Procalcitonin across groups. The median value for the SOFA score (8 points) was employed to distribute sepsis patients into 2 groups. Lines represent significant differences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



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients

Received: 12 March 2018  
Accepted: 31 July 2018  
Published online: 10 August 2018

Raquel Almansa<sup>1</sup>, Silvia Martín<sup>2</sup>, Marta Martín-Fernández<sup>1</sup>, María Heredia-Rodríguez<sup>3</sup>, Esther Gómez-Sánchez<sup>3</sup>, Marta Aragón<sup>3</sup>, Cristina Andrés<sup>4</sup>, Dolores Calvo<sup>4</sup>, Jesús Rico-Feijoo<sup>2</sup>, María Carmen Esteban-Velasco<sup>5</sup>, Luis Mario Vaquero-Roncero<sup>6</sup>, Alicia Ortega<sup>1</sup>, Estefanía Gómez-Pesquera<sup>3</sup>, Mario Lorenzo-López<sup>3</sup>, Iñigo López de Cenarruzabeitia<sup>7</sup>, Diana Benavides<sup>7</sup>, Jaime López-Sánchez<sup>5</sup>, Cristina Doncel<sup>1</sup>, Carmen González-Sánchez<sup>5</sup>, Esther Zarcá<sup>4</sup>, Alberto Ríos-Llorente<sup>6</sup>, Agustín Díaz<sup>6</sup>, Elisa Sánchez-Barrado<sup>6</sup>, Juan Beltrán de Heredia<sup>7</sup>, Jose María Calvo-Vecino<sup>6</sup>, Luis Muñoz-Bellvis<sup>5</sup>, Jose Ignacio Gomez-Herreras<sup>3</sup>, César Aldecoa<sup>2</sup>, Eduardo Tamayo<sup>3</sup> & Jesús F. Bermejo-Martin<sup>1</sup>

Early recognition of sepsis is a key factor to improve survival to this disease in surgical patients, since it allows prompt control of the infectious source. Combining pro-inflammatory and immunosuppression biomarkers could represent a good strategy to improve sepsis detection. Here we evaluated the combination of procalcitonin (PCT) with gene expression levels of HLA-DRA to detect sepsis in a cohort of 154 surgical patients (101 with sepsis and 53 with no infection). HLA-DRA expression was quantified using droplet digital PCR, a next-generation PCR technology. Area under the receiver operating curve analysis (AUROC) showed that the PCT/HLA-DRA ratio outperformed PCT to detect sepsis (AUROC [CI95%],  $p$ ): PCT: 0.80 [0.73–0.88],  $<0.001$ ; PCT/HLA-DRA: 0.85 [0.78–0.91],  $<0.001$ . In the multivariate analysis, the ratio showed a superior ability to predict sepsis compared to that of PCT (OR [CI 95%],  $p$ ): PCT/HLA-DRA: 7.66 [1.82–32.29], 0.006; PCT: 4.21 [1.15–15.43] 0.030. Multivariate analysis was confirmed using a new surgical cohort with 74 sepsis patients and 21 controls: PCT/HLA-DRA: 34.86 [1.22–995.08], 0.038; PCT: 5.52 [0.40–75.78], 0.201. In conclusion, the combination of PCT with HLA-DRA is a promising strategy for improving sepsis detection in surgical patients.

Sepsis is a leading cause of morbidity and mortality in surgical patients, who account for nearly one third of all sepsis cases<sup>1</sup>. Sepsis is ten times more common than myocardial infarction and pulmonary embolism in these patients, and its associated mortality rate raises up to 39% if septic shock is present<sup>2</sup>. Success of treatment in sepsis is time-dependant<sup>3</sup>. Prompt administration of antibiotics decreases morbidity and mortality in a significant manner<sup>4</sup>. In surgical sepsis, to early find and control the source of infection is critical<sup>5</sup>. Nonetheless, identification of sepsis in surgical patients remains challenging<sup>6,7</sup>. In these patients, some of the early signs of sepsis pass unnoticed or are confused with signs of alarm of other conditions: inflammation due to infection overlaps with that secondary to surgery; altered mental status is often attributed to the administration of narcotic pain medication,

<sup>1</sup>Group for Biomedical Research in Sepsis (Bio-Sepsis), Hospital Clínico Universitario de Valladolid/IECSCYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005, Valladolid, Spain. <sup>2</sup>Anesthesiology and Reanimation Service, Hospital Universitario Río Hortega, Calle Dulzaina, 2, 47012, Valladolid, Spain. <sup>3</sup>Anesthesiology and Reanimation Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Avda Ramón y Cajal 3, 47005, Valladolid, Spain. <sup>4</sup>Clinical Analysis Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Avda Ramón y Cajal 3, 47005, Valladolid, Spain. <sup>5</sup>Department of General and Gastrointestinal Surgery, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, Paseo de San Vicente, 139, Salamanca, 37007, Spain. <sup>6</sup>Anesthesiology and Reanimation Service, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España; Paseo de San Vicente, 139, Salamanca, 37007, Spain. <sup>7</sup>General Surgery Service, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Avda Ramón y Cajal 3, 47005, Valladolid, Spain. Raquel Almansa, Silvia Martín, Marta Martín-Fernández, César Aldecoa, Eduardo Tamayo and Jesús F. Bermejo-Martin contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.F.B.-M. (email: [jfbermejo@saludcastillayleon.es](mailto:jfbermejo@saludcastillayleon.es))

oliguria is often attributed to under-resuscitation, hyperthermia frequently is not recognized as an early sign of sepsis, hypoxia in many occasions leads to think in pulmonary embolism but not in sepsis<sup>5</sup>.

Using biomarkers which reflect the patient's response to the infection could help to improve sepsis diagnosis in surgical patients<sup>7</sup>. Sepsis is characterized by the presence of a dysregulated host response to infection. Between the features of this dysregulated response, sepsis is characterized by the simultaneous presence of exacerbated inflammation and depressed expression of molecules participating in the immunological synapse between antigen presentation cells and T lymphocytes, a key step for the development of a homeostatic adaptive response to infection<sup>8</sup>. In consequence, combining pro-inflammatory biomarkers with those reflecting immunosuppression could represent a good strategy to increase the chances of detecting sepsis patients<sup>9–11</sup>.

Procalcitonin (PCT) is a precursor of the hormone calcitonin and is synthesized physiologically by thyroid C cells. In bacterial infections, systemic PCT secretion is a component of the inflammatory response, being in this context synthesized in various extrathyroidal neuroendocrine tissues<sup>7</sup>. Interpreted in combination with medical history, physical examination, and microbiological assessment, PCT could be a helpful biomarker for early diagnosis of sepsis<sup>12</sup>. Although many biomarkers aimed to the diagnosis of sepsis have been evaluated in the literature, PCT is still one of the most employed ones to rule in the presence of infection in the clinical practice. In turn, measuring gene expression levels in blood of HLA-DRA (encoding the non-polymorphic region of the alpha-chain of the HLA-DR molecule) has been proposed as a promising tool for evaluating the degree of immunosuppression associated to sepsis<sup>13,14</sup>, and significantly predicts mortality in this disease<sup>15</sup>. In the present work, we employed droplet digital PCR (ddPCR)<sup>16</sup>, a next-generation polymerase chain reaction, to quantify gene expression of HLA-DRA in blood.

The objective of this study was to evaluate the accuracy of the combination between PCT levels in plasma and expression levels in blood of HLA-DRA to differentiate surgical patients with sepsis from those with no sepsis.

## Results

**Clinical characteristics of patients in the derivation cohort.** patients with sepsis were mostly elderly male with co-morbidities, with high blood pressure, chronic cardiovascular disease, diabetes mellitus and antecedent of cancer being the most common. Abdominal surgery was the most frequent kind of surgery in this cohort. Of the 62 patients suffering from abdominal surgery, 46 patients showed an abdominal source of infection, 3 patients showed an infection coming from the surgical site, 2 patients had an urological infection as source of sepsis, 2 patients had a respiratory source, 1 had a Fournier gangrene, and the remaining 8 had an unidentified focus of infection. Necessity of urgent surgery was more frequent in the sepsis patients. Sepsis was of nosocomial origin in 60 cases. In these cases, sepsis followed surgery. In 41 cases, sepsis was originated in the community, representing the cause of surgery. Sepsis patients were more severe, as evidenced by the SOFA score at presentation to the hospital. Sepsis patients stayed longer at the ICU and also at the hospital. Hospital mortality was 24.7% in the sepsis group being absent in the group of patients with no sepsis (Table 1).

**Clinical characteristics of patients in the validation cohort.** Sepsis patients had a similar profile in this cohort, being mostly elderly male with high blood pressure, diabetes mellitus and cancer as the most frequent antecedents. As occurred in the derivation cohort, abdominal surgery was the most frequent kind of surgery. Urgent surgery was also more frequent in the group of sepsis patients. Sepsis was of nosocomial origin in 33 cases, with the remainder cases being originated in the community, representing the cause of surgery. SOFA score was higher in the group of sepsis patients, although the difference with controls was not significant (0.063). Sepsis patients stayed longer at the ICU and also at the hospital. 12.2% of the patients with sepsis died during hospitalization, for none in the group of patients with no sepsis (Table 2).

**Concentration of PCT and HLA-DRA across groups in the derivation cohort.** Median concentration of PCT (ng/mL) was as follows (median, interquartile range in the group of healthy controls, surgical controls, sepsis patients with no septic shock and sepsis patients with septic shock respectively): 0.03 [0.02]; 0.50 [0.97]; 1.34 [5.74]; 9.55 [40.90]. In turn, HLA-DRA expression levels (cDNA copies/ng total mRNA) were as follows 7618 [2973]; 4468 [3884]; 2100 [2200]; 1858 [2415]. Finally, median values of the PCT/HLA-DRA ratio in the different groups were 0.0000 [0.000]; 0.0001 [0.000]; 0.0008 [0.000]; 0.0056 [0.030]. As showed in Fig. 1, PCT levels increased with organ failure degree and the presence of sepsis. In contrast, HLA-DRA gene expression levels decreased with organ failure degree and the presence of sepsis (Fig. 1). In consequence, the ratio between both biomarkers increased with disease severity and sepsis (Fig. 1). Levels of PCT and HLA-DRA showed an inverse and significant correlation (Supp File 1).

**Concentration of PCT and HLA-DRA across groups in the validation cohort.** Median concentration of PCT (ng/mL) was as follows (median, interquartile range in the group of surgical controls, sepsis patients with no septic shock and sepsis patients with septic shock respectively): 0.29 [0.71]; 1.03 [3.05]; 6.6 [25.7]. In turn, HLA-DRA expression levels (cDNA copies/ng total mRNA) were as follows 4928 [3456]; 2372 [4033]; 1866 [1560]. Finally, median values of the PCT/HLA-DRA ratio in the different groups were 0.0001 [0.000]; 0.0004 [0.000]; 0.0037 [0.020]. As occurred in the derivation cohort, the ratio correlated directly with the SOFA score (Spearman correlation coefficient ( $r$ ) = 0.494,  $p < 0.001$ ). Levels of PCT and HLA-DRA showed an inverse and significant correlation also ( $r = -0.490$ ,  $p < 0.001$ ).

**Accuracy for detecting sepsis.** The AUROC of PCT for differentiating between the group of sepsis patients and the group of surgical controls with no infection was compared against that obtained for the PCT/HLA-DRA ratio in the derivation cohort. As evidenced the DeLong test, the PCT/HLA-DRA ratio improved the diagnostic accuracy of PCT in a significant manner (Fig. 2). The superior diagnostic accuracy of the ratio compared to PCT was preserved when the analysis was repeated splitting sepsis patients in those with septic shock and those with

		Sepsis patients (n = 101)	Surg. controls (n = 53)	p
Characteristics	Age [years, median (IQR)]	72.00 (15)	64.00 (18)	0.006
	Male	65.35 (66)	71.70 (38)	n.s.
Comorbidities, % (n)	High Blood Pressure	55.45 (56)	60 (30)	n.s.
	Chronic cardiovascular disease	47 (47)	32.65 (16)	n.s.
	Chronic respiratory disease	14.85 (15)	21.15 (11)	n.s.
	Chronic renal failure	14.85 (15)	2 (1)	n.s.
	Chronic hepatic failure	2.97 (3)	5.88 (3)	n.s.
	Neurologic disease	4.95 (5)	3.77 (2)	n.s.
	Cerebrovascular disease	3.96 (4)	5.66 (3)	n.s.
	Diabetes mellitus	33.66 (34)	18.87 (10)	0.005
	Cancer	29.70 (30)	45.3 (24)	0.050
	Immunosuppression	17.84 (17)	13.89 (5)	n.s.
Surgery type, % (n)	Urgent surgery	63.36 (64)	4.76 (2)	<0.001
	Cardio-thoracic	30 (30)	39.62 (21)	n.s.
	Abdominal	62 (62)	43.40 (23)	n.s.
	Neurosurgery	1 (1)	1.89 (1)	n.s.
	Vascular	3 (3)	3.77 (2)	n.s.
	Urological/Renal	1 (1)	9.43 (5)	0.011
	Other	3 (3)	1.89 (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 (101)	56.60 (30)	<0.001
	Septic Shock, % (n)	61.39 (62)	n.a	n.a.
	Non-survivors at day 28, % (n)	19.80 (20)	0	<0.001
	Hospital mortality, % (n)	24.75 (25)	0	<0.001
Source of infection, % (n)	Unknown	14.85 (15)	n.a.	n.a.
	Respiratory tract	18.81 (19)	n.a.	n.a.
	Abdomen	45.55 (46)	n.a.	n.a.
	Urinary tract	4.95 (5)	n.a.	n.a.
	Surgical site	5.94 (6)	n.a.	n.a.
	Bacteremia	4.95 (5)	n.a.	n.a.
	Other	4.95 (5)	n.a.	n.a.
Microbiology, % (n)	Gram+	46.5 (47)	n.a.	n.a.
	Gram-	58.4 (59)	n.a.	n.a.
	Fungi	6.9 (7)	n.a.	n.a.
	Virus	2 (2)	n.a.	n.a.
	Polymicrobial	40.6 (41)	n.a.	n.a.
Measurements at diagnosis, [median (IQR)]	SOFA score	8 (6)	1 (3)	<0.001
	Total bilirubin (mg/dl)	0.75 (1.30)	0.77 (0.53)	n.s.
	Glucose (mg/dl)	152.0 (78.0)	135.0 (55.0)	n.s.
	Platelet count (cell/mm <sup>3</sup> )	180000 (194.75)	155000 (740000)	n.s.
	INR	1.30 (0.42)	1.23 (0.41)	n.s.
	ScvO <sub>2</sub> (%)	73.10 (19.00)	68.80 (80.00)	n.s.
	CRP (mg/l)	232.30 (169.25)	57.70 (77.70)	<0.001
	Procalcitonin (ng/mL)	5.57 (17.51)	0.50 (0.97)	<0.001
	White Blood cells (cells/mm <sup>3</sup> )	14465 (10257.50)	12290 (4875.0)	0.023
	Neutrophils (cells/mm <sup>3</sup> )	12337 (9220.50)	10016 (4704.5)	0.017

**Table 1.** Clinical characteristics of the patients in the derivation cohort: continuous variables are represented as median, (interquartile range, IQR); categorical variables were represented as (% , n). ICU: intensive care unit; SIRS: systemic inflammatory response syndrome, SOFA: Sequential Organ Failure Score; CRP, C reactive protein; INR, international normalized ratio; ScvO<sub>2</sub>: Central venous oxygen saturation; n.s: not significant; n.a: not applicable.

no septic shock (Supp File 2). The optimal operating point (OOP) for PCT and the ratio was identified in each respective AUROC of Fig. 2. Sensitivity and specificity for each OOP are showed in this figure. Multivariate analysis demonstrated that the PCT/HLA-DRA ratio outperformed PCT in predicting sepsis (Table 3). A further multivariate analysis in the validation cohort confirmed the superiority of the PCT/HLA-DRA ratio over PCT (Table 4).

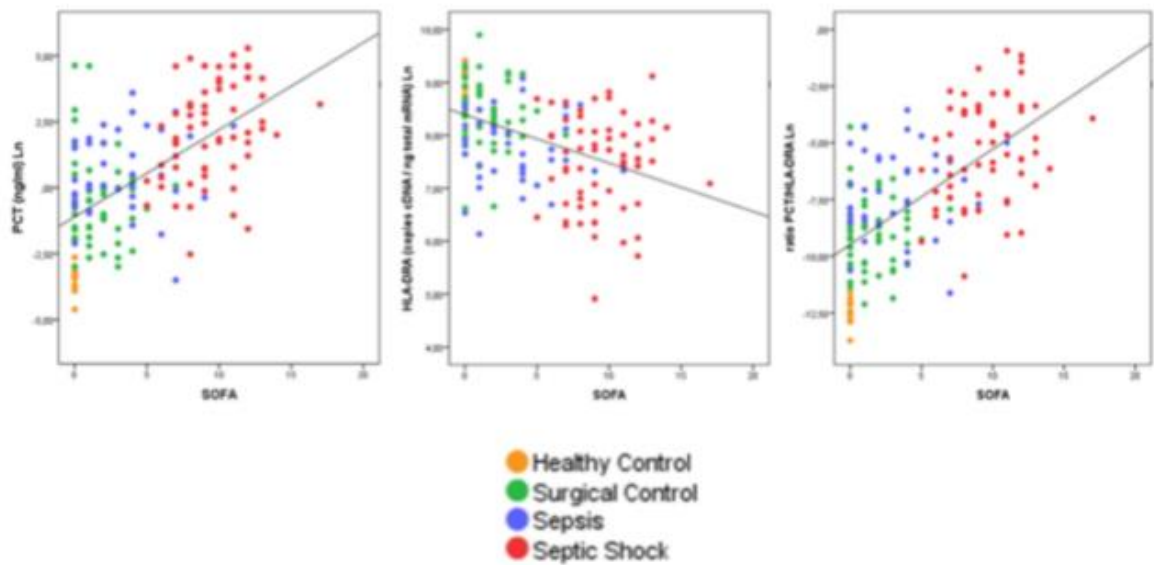


		Sepsis patients (n = 74)	Surg controls (n = 21)	p value
Characteristics	Age [years, median (IQR)]	70.50 (20)	70.00 (12)	n.s.
	Male [% (n)]	58.10 (43)	61.90 (13)	n.s.
Comorbidities, % (n)	High Blood Pressure	45.94 (34)	61.90 (13)	n.s.
	Chronic cardiovascular disease	9.46 (7)	9.52 (2)	n.s.
	Chronic respiratory disease	5.41 (4)	4.76 (1)	n.s.
	Chronic renal failure	8.11 (6)	9.52 (2)	n.s.
	Chronic hepatic failure	2.70 (2)	0 (0)	n.s.
	Diabetes mellitus	14.86 (11)	19.04 (4)	n.s.
	Cancer	18.91 (14)	42.86 (9)	0.024
	Immunosuppression	9.46 (7)	4.76 (1)	n.s.
Surgery type, % (n)	Urgent surgery	79.73 (59)	9.52 (2)	<0.001
	Abdominal	47.30 (35)	23.81 (5)	n.s.
	Vascular	2.70 (2)	9.52 (2)	n.s.
	Urological/Renal	1.35 (1)	14.29 (3)	0.009
	Other	4.05 (3)	0 (0)	n.s.
Time course and outcome	Length of hospital stay [days, median (IQR)]	16 (17)	10 (10)	0.048
	Length of ICU stay [days, median (IQR)]	3 (5)	2 (2)	0.050
	SIRS, % (n)	100 (74)	23.81 (5)	0.003
	Septic Shock, % (n)	48.64 (36)	0 (0)	<0.001
	Hospital mortality, % (n)	12.16 (9)	0 (0)	n.s.
	Respiratory tract, % (n)	14.86 (11)	n.a.	n.a.
	Abdomen, % (n)	40.54 (30)	n.a.	n.a.
	Urinary tract, % (n)	5.41 (4)	n.a.	n.a.
	Surgical site, % (n)	25.68 (19)	n.a.	n.a.
	Bacteremia, % (n)	14.86 (11)	n.a.	n.a.
	Other, % (n)	10.81 (8)	n.a.	n.a.
Microbiology, % (n)	Positive culture	45.94 (34)	n.a.	n.a.
	Gram+	18.92 (14)	n.a.	n.a.
	Gram-	32.43 (24)	n.a.	n.a.
	Fungi	1.35 (1)	n.a.	n.a.
	Virus	0 (0)	n.a.	n.a.
	Polymicrobial	18.92 (14)	n.a.	n.a.
Measurements at diagnosis, [median (IQR)]	SOFA score	6 (7)	2.50 (5)	n.s.
	Total bilirubin (mg/dl)	0.82 (1.06)	0.83 (0.59)	n.s.
	Glucose (mg/dl)	160 (73)	162 (39)	n.s.
	Platelet count (cell/mm <sup>3</sup> )	135000 (191500)	209000 (146000)	n.s.
	INR	1.22 (0.33)	1.11 (1.20)	0.023
	CRP (mg/L)	216.84 (179.83)	103.34 (98.85)	<0.001
	Procalcitonin (ng/mL)	2.70 (9.35)	0.29 (0.71)	<0.001
	White Blood cells (cells/mm <sup>3</sup> )	14960 (10600)	11280 (8075)	n.s.
Neutrophils (cells/mm <sup>3</sup> )	13358.50 (11962.50)	10341.00 (9362)	n.s.	

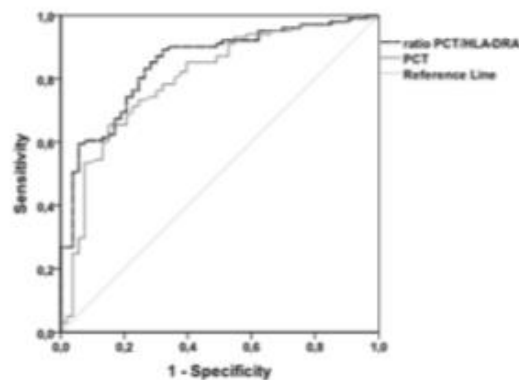
**Table 2.** Clinical characteristics of the patients in the validation cohort: continuous variables are represented as median, (interquartile range, IQR); categorical variables were represented as (% , n). ICU: intensive care unit; SIRS: systemic inflammatory response syndrome, SOFA: Sequential Organ Failure Score; CRP, C reactive protein; INR, international normalized ratio; n.s: not significant; n.a: not applicable.

**SEPSIS-3 criteria.** The AUROC analysis was repeated in the derivation cohort using the new diagnostic criteria proposed by the SEPSIS-3 consensus<sup>17</sup>. In consequence, 14 sepsis patients who did not score at least 2 points in SOFA were excluded from this new analysis. Using the SEPSIS-3 criteria, the PCT/HLA-DRA ratio also yielded better results than PCT to differentiate sepsis (n = 87 patients) from non sepsis patients (n = 53 patients): PCT [0.82 (0.75–0.90), 0.038]; PCT/HLA-DRA ratio [0.87 (0.81–0.93), 0.031] [AUROC (CI95%), p] (p = 0.004 in the Delong Test).

**Detecting mortality in sepsis.** In the derivation cohort, AUROC analysis for differentiating survivors from non survivors in the group of patients with sepsis showed the following results: [AUROC, (confidence interval 95%), p]: PCT [0.78, (0.68–0.77) <0.001]; PCT/HLA-DRA [0.79, (0.70–0.89), <0.001]. Similarly occurred in the validation cohort: PCT [0.79, (0.65–0.93) 0.005]; PCT/HLA-DRA [0.76, (0.61–0.91), 0.012].



**Figure 1.** Dot plot showing patients' distribution depending on SOFA score and biomarkers' levels in the derivation cohort. Spearman correlation coefficients were 0.625,  $-0.488$ ,  $0.649$  respectively ( $p < 0.001$ ).



	AUROC						Differences between AUROCs	
	AREA	[CI 95%]	<i>P</i>	OOP	Se (%)	Sp (%)	<i>P</i>	
PCT/HLA-DRA	0.85	0.78	0.91	< 0.001	0.0003	80.2	75.5	0.003
PCT (ng/mL)	0.80	0.73	0.88	< 0.001	1.115	73.3	75.5	

**Figure 2.** AUROC analysis for the differential diagnosis between sepsis patients and surgical controls with no infection in the derivation cohort. OOP: Optimal operating point; Se: sensitivity; Sp: Specificity.

### Discussion

Early recognition and timely treatment largely determine outcome of sepsis<sup>18</sup>. This is particularly important in surgical sepsis, where prompt intervention to control the source of infection is a central element to increase survival<sup>19</sup>. Our study, using a derivation-validation approach, demonstrates for the first time that combining quantification of PCT, a peptide reflecting the host pro-inflammatory response to the infection, with that of HLA-DRA, a transcript reflecting the immunological suppression occurring in sepsis, is a good strategy to enhance chances of detecting this disease in surgical patients. Lethality of severe sepsis demands a screening mechanism exhibiting high sensitivity<sup>20</sup>. In this regard, the OOP identified for the PCT/HLA-DRA ratio improved the sensitivity of PCT to identify sepsis patients, preserving specificity (Fig. 2). This could help to improve performance of PCT as a screening biomarker for sepsis in this context. The logistic regression analysis performed in the two cohorts confirmed the superiority of the PCT/HLA-DRA ratio over PCT in predicting the presence of sepsis. The association between this ratio and sepsis was independent of disease severity, of potential confounding co-morbidities and of the basal inflammatory status of the patient as assessed by the CRP levels in serum and the neutrophil count in blood.

	Multivariate analysis for PCT/HLA-DRA ratio				Multivariate analysis for PCT			
	OR	[CI 95%]		<i>p</i>	OR	[CI 95%]		<i>p</i>
SOFA Score	1.47	1.16	1.87	0.002	1.49	1.17	1.90	0.001
Age	1.00	0.94	1.06	0.873	1.01	0.96	1.07	0.714
Urgent Surgery	45.70	7.02	297.33	<0.001	41.57	6.77	255.39	<0.001
Chronic Renal Failure	8.09	0.40	165.00	0.174	4.74	0.26	86.12	0.293
Cancer	1.08	0.29	4.00	0.908	1.24	0.33	4.60	0.748
Diabetes Mellitus	2.89	0.69	12.22	0.149	2.41	0.61	9.57	0.210
Neutrophil concentration in blood (cells/mm <sup>3</sup> )	1.00	1.00	1.00	0.467	1.00	1.00	1.00	0.436
C-Reactive Protein	1.00	1.00	1.01	0.026	1.00	1.00	1.01	0.021
PCT/HLA-DRA > OOP (0.0003)	7.66	1.82	32.29	0.006	—	—	—	—
PCT > OOP (1.115 ng/mL)	—	—	—	—	4.21	1.15	15.43	0.030

**Table 3.** Multivariate analysis for evaluating the risk of sepsis in the derivation cohort based on the PCT/HLA-DRA ratio or Procalcitonin levels. OOP: Optimal operating point.

	Multivariate analysis for PCT/HLA-DRA ratio				Multivariate analysis for PCT			
	OR	[CI 95%]		<i>p</i>	OR	[CI 95%]		<i>p</i>
SOFA score	0.94	0.71	1.25	0.690	1.00	0.77	1.30	0.992
Cancer	0.17	0.02	1.34	0.092	0.20	0.03	1.34	0.097
Urgent Surgery	45.68	2.80	744.81	0.007	31.87	2.95	344.67	0.004
Neutrophil concentration in blood (cells/mm <sup>3</sup> )	1.00	1.00	1.00	0.471	1.00	1.00	1.00	0.754
C Reactive Protein	1.00	0.98	1.02	0.941	1.01	0.99	1.02	0.503
PCT/HLA-DRA > OOP (0.0003)	34.86	1.22	995.08	0.038	—	—	—	—
PCT > OOP (1.115 ng/mL)	—	—	—	—	5.52	0.40	75.78	0.201

**Table 4.** Multivariate analysis for evaluating the risk of sepsis in the validation cohort based on the PCT/HLA-DRA ratio or Procalcitonin levels. Optimal operating points (OOP) obtained in the derivation cohort were tested in the validation cohort.

Our study demonstrates that the PCT/HLA-DRA ratio outperforms PCT independently of the presence or absence of septic shock in the sepsis patients, although it yielded the largest differences in distinguishing sepsis patients with no septic shock from the uninfected surgical controls (Supp File 2). This is certainly the most difficult scenario to identify sepsis in the clinical practice, and it is in consequence where the ratio could help the most.

PCT quantification is widely implemented in medium-large clinical settings as a complementary test to detect bacterial infection, which is the most frequent cause of sepsis. Gene expression profiling has demonstrated to be a valuable tool to identify the presence of sepsis<sup>21,22</sup>, but its translation to clinical practice has faced the absence of appropriate technology which could provide accurate and fast results. In this sense, ddPCR is a next generation PCR method that comes to solve these problems, since it allows absolute, reproducible quantification of gene expression in less than 3 hours, making this technology very attractive for clinical applications<sup>23,24</sup>.

A strength of our results is that they were confirmed when the analysis was repeated using the new criteria for sepsis diagnosis proposed by the SEPSIS-3 consensus<sup>17</sup>, criteria which have nonetheless suffered a number of major criticisms<sup>20,25</sup> and which are yet pending to be endorsed by the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-11<sup>26</sup>. In addition, our work is pioneer in proposing simultaneously profiling of protein and mRNA-based biomarkers as a new avenue for enhancing chances of sepsis detection. A limitation of our work is the absence of flow cytometry analysis of HLA-DRA expression on mononuclear cells. Future works should evaluate the same combination of PCT and HLA-DRA, profiling the later on monocyte and B lymphocyte surface by using flow cytometry, which is a widely available tool in most hospitals. Finally, although testing the ability to predict mortality was not the goal of our work, our results show that the PCT/HLA-DRA ratio did not improve the accuracy of PCT to differentiate survivors from non survivors.

In conclusion, our results support the combined quantification of PCT with that of HLA-DRA mRNA as a promising strategy for improving sepsis detection in surgical patients.

## Methods

**Ethics approval.** The study was approved by the respective Committees for Ethics in Clinical Research of the participating hospitals (Hospital Clínico Universitario de Valladolid, CE-HCUV), (Hospital 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). Written informed consent was obtained from the patients' relatives or their legal representative before enrolment.



**Patients.** *Derivation cohort.* A total of 101 adult patients (>18 years old) hospitalized at the Surgery Service or at the Surgical ICU of the participant hospitals with sepsis (according to the definition proposed by the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference)<sup>27</sup> were prospectively included in the study by the participant physicians from April 2013 to January 2016. A control group consisting of 53 surgical patients with no signs of infection was also recruited. Finally, 16 blood donors of similar age of patients were included in the study. A specific standard survey was employed to collect the clinical data, including medical history, physical examination and hematological, biochemical, radiological and microbiological investigations. Treatment decisions were not standardized for all patients but were made by the treating physician.

*Validation cohort.* A total of 74 adult patients (>18 years old) hospitalized at the Surgery Service or at the Surgical ICU of the participant hospitals with sepsis (according to the definition proposed by the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference)<sup>27</sup> were prospectively included in the study by the participant physicians from January 2017 to January 2018. A control group consisting of 21 surgical patients with no signs of infection was also recruited. A specific standard survey was employed to collect the clinical data, including medical history, physical examination and hematological, biochemical, radiological and microbiological investigations. Treatment decisions were not standardized for all patients but were made by the treating physician.

**Gene expression analysis.** 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 (Nano-Drop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and RNA Experion Bioanalyzer (BioRad, CA). Only samples with good quality and concentration were tested by ddPCR. Expression of HLA-DRA was quantified by ddPCR (BioRad) using predesigned TaqMan Assay Primer/Probe Sets, (FAM labeled MGB probes, Thermo Fisher/Scientific-Life Technologies, Waltham, MA): HLA-DRA (Hs00219575\_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  $\mu$ L) was further diluted (1/25), and 2.5  $\mu$ L (5 ng of total mRNA) were employed for quantification of target gene expression according to the manufacturer instructions. 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 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.

**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) in samples collected in the first 12 hours following diagnosis of sepsis or in the first 12 hours following surgery in the case of the surgical controls; 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.

Both samples for HLA-DRA and PCT quantification were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to be profiled in the same moment with the same platforms to avoid bias due to multiplatform testing.

**Statistical Analysis.** Differences in demographic and clinical characteristics between patient groups were assessed using the  $\chi^2$  test for categorical variables and the Mann Whitney U test for continuous variables. The accuracy of biomarkers for detecting sepsis was studied by calculating the area under the receiver operating characteristic curve (AUROC). The AUROC obtained for the PCT/HLA-DRA ratio was compared with that obtained for PCT alone by using the DeLong test<sup>28</sup>. The optimal operating point (OOP) was calculated, being the value for which the point on the 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 created, using each OOP identified as the cut-off. The association between these variables and the risk of presenting sepsis was further evaluated by logistic regression analysis. Potential confounding factors were identified from Table 1 by using an univariate analysis. Those variables yielding  $p$  values < 0.1 were further introduced as adjusting variables in the multivariate analysis. Multivariate analysis was repeated in the validation cohort using the same approach to validate the performance of the cut-offs identified in the derivation cohort. The statistical analysis was performed by using the IBM SPSS 22.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA), except the DeLong test that was performed using the NCSS 12 software (Kaysville, Utah, USA). AUROC analysis was also employed to evaluate biomarkers' accuracy to predict mortality.

## References

1. Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* **29**, 1303–1310 (2001).
2. Moore, L. J. *et al.* Sepsis in general surgery: the 2005–2007 national surgical quality improvement program perspective. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **145**, 695–700 (2010).
3. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16045 (2016).
4. Seymour, C. W. *et al.* Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2235–2244 (2017).
5. Moore, L. J. & Moore, F. A. Early diagnosis and evidence-based care of surgical sepsis. *J. Intensive Care Med.* **28**, 107–117 (2013).
6. Moore, L. J. *et al.* Validation of a screening tool for the early identification of sepsis. *J. Trauma* **66**, 1539–1546, discussion 1546–1547 (2009).
7. Kibe, S., Adams, K. & Barlow, G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**(2), ii33–40 (2011).
8. Bermejo-Martin, J. F. *et al.* Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. *J. Infect.* **72**, 525–536 (2016).
9. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–268 (2013).
10. Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E. & Ferguson, T. A. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* **15**, 496–497 (2009).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. Winkler, M. S. *et al.* Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF $\alpha$  response: A diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS One* **12**, e0182427 (2017).
15. Cazalis, M.-A. *et al.* Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R287 (2013).
16. Almansa, R. *et al.* Quantification of Immune Dysregulation by Next-generation Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients. *Ann. Surg.* <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002406> (2017).
17. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
18. Sartelli, M. *et al.* Raising concerns about the Sepsis-3 definitions. *World J. Emerg. Surg. WJES* **13**, 6 (2018).
19. Sotto, A. *et al.* Evaluation of antimicrobial therapy management of 120 consecutive patients with secondary peritonitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 569–576 (2002).
20. Simpson, S. Q. New Sepsis Criteria: A Change We Should Not Make. *Chest* **149**, 1117–1118 (2016).
21. 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).
22. Sweeney, T. E. & Khatri, P. Benchmarking Sepsis Gene Expression Diagnostics Using Public Data. *Crit. Care Med.* **45**, 1–10 (2017).
23. Taylor, S. C., Laperriere, G. & Germain, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci. Rep.* **7**, 2409 (2017).
24. Hindson, C. M. *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* **10**, 1003–1005 (2013).
25. Bermejo-Martin, J. F., Martin-Fernandez, M. & Almansa, R. Pre-sepsis: A necessary concept to complete the SEPSIS-3 picture? *J. Crit. Care* **44**, 148 (2018).
26. WHO Joint Task force for ICD-11. Report of meeting of the WHO Joint Task force for ICD-11. (2017).
27. Bone, R. C. *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* **101**, 1644–1655 (1992).
28. DeLong, E. R., DeLong, D. M. & Clarke-Pearson, D. L. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. *Biometrics* **44**, 837–845 (1988).

## Data Availability

Original data are available under reasonable request for scientist working in the field of sepsis.

## Acknowledgements

We thank the Nursery team of the participant clinical services for their continuous support to our research program. We appreciate also the assistance of Maria Jesús Garcia Salgado, from the Biobanco Hospital Clínico Universitario de Salamanca with sample storing. We thank the “Instituto de Salud Carlos III” and “Consejería de Sanidad de Castilla y León” for their financial support, grant numbers [EMER 07/050], [PI15/01451], [PI16/01156] and “Consejería de Educación de Castilla y León/Fondo social Europeo” for supporting the contract of Marta Martin-Fernandez.

## Author Contributions

R.A., S.M., M.M.F., J.F.B.M. were involved in the study design, in the statistical analysis and manuscript writing; M.H.R., E.G.S., M.A., J.R.F., E.G.P., M.L.L., I.L.C., D.B., J.B.H. participated in patients’ recruitment and study design, C.A., D.C., A.O., E.Z., C.D. performed the lab works, J.I.G.H., C.A., E.T. participated in the study design. L.M.V.R., M.C.E., J.L., C.G., A.R., A.D., E.S.B. participated in patients’ recruitment and data analysis. J.M.C.V., L.M.B. participated in the study design and critical discussion of the results. All the authors critically reviewed the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30505-7>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher’s note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## ***X. Anexos***

---



## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN

### CLINICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid

**SERVICIO / UNIDAD: SERVICIO DE ANESTESIOLOGÍA Y REANIMACIÓN HURH / LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID /**

**EMAIL: [caldecoa@saludcastillayleon.es](mailto:caldecoa@saludcastillayleon.es); [jfbermejo@saludcastillayleon.es](mailto:jfbermejo@saludcastillayleon.es);**

---

**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

**ANEXO 1**



**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN**  
**CLINICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS**  
**Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid**

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 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.

**ANEXO 1**

## **DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN**

### **CLINICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid**

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 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 transmitirla 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.

**ANEXO 1**

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN  
CLINICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid**

**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 UNIVERSITARIO RÍO HORTEGA DE VALLADOLID 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 UNIVERSITARIO RÍO HORTEGA DE VALLADOLID 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.

**ANEXO 1**

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN  
CLINICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS  
Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid**

FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL                      NOMBRE                      Y  
APELLIDOS                      FECHA

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.

---

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**

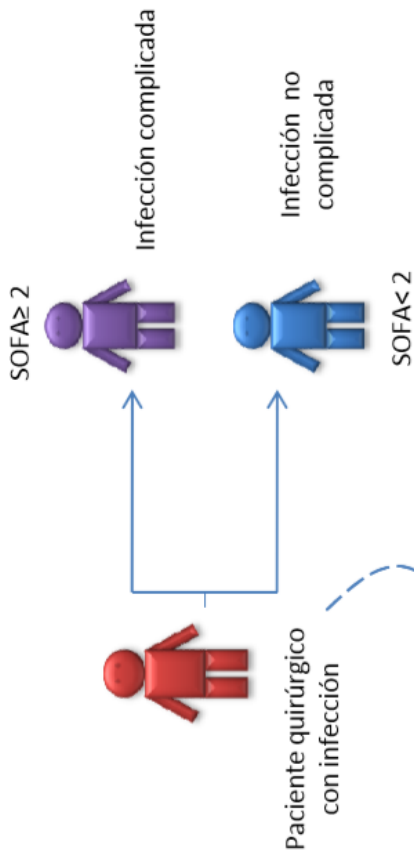
**APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)**

Yo \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado con fecha \_\_\_\_\_

**Firma:**

**ANEXO 1**

**Reclutar al paciente en el momento en el que éste presente signos de infección.**



**TOMA DE MUESTRAS: Dentro de las primeras 24 horas del reclutamiento**

### **Criterios de Exclusión:**

- 1.No firmar el consentimiento informado
- 2.Pacientes menores de edad.

**Muestras para el proyecto**

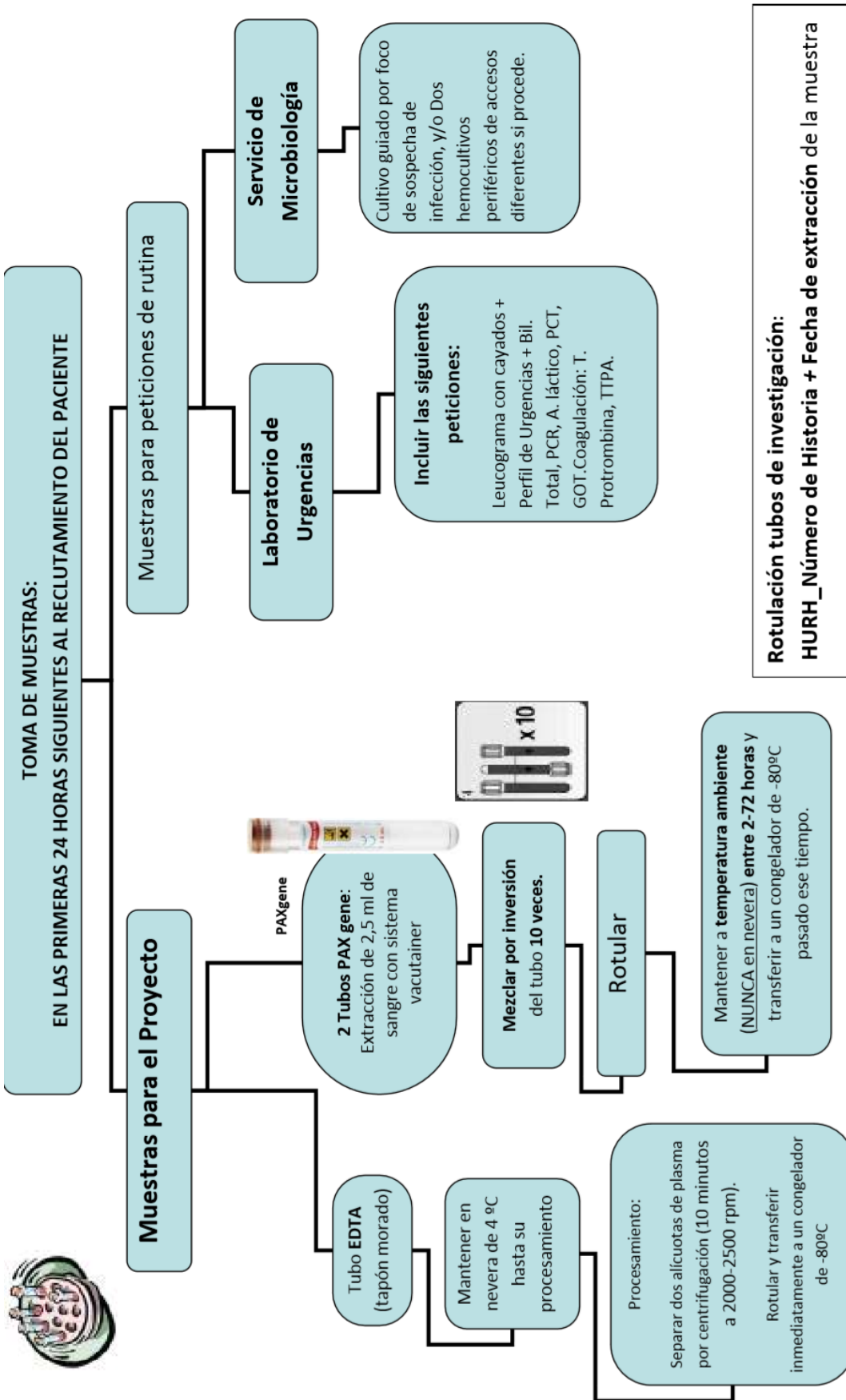


**Peticiones de rutina:**

**Laboratorio de urgencia:** Leucograma con cayados + 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.**



## **PROCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS. PROYECTO mSOFA REA HURH.**

### 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 hospitalizados que cumplan criterios de infección.**

#### **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:**

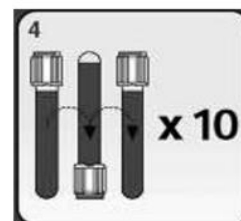
- Centrifugar la muestra unos 10 minutos a 2000-2500 rpm..
- Separar el plasma en 2 alícuotas (ependorf).
- Rotular los ependorf de la siguiente manera:
  - HURH\_Número de historia + Fecha de extracción
- Congelar en una caja específica de congelación a -80°C.



#### **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:
  - HURH\_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.



## ***XI. Bibliografía***

---



## XI. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep.* 2016;18(11):37.
2. Martin GS MD, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 348(16):1546-54.
3. 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(7):1303-10.
4. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34(2):344-53.
5. New hope for sepsis. *Lancet.* 2012;379(9825):1462.
6. Luis Antonio Gorordo Delsol JAMG, \*\* Antonio López Gómez\*\*\*, . Sepsis: Más allá de la enfermedad  
2014;6:12-6.
7. Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. Spanish Collaborative Group for Infections in Intensive Care Units of Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SEMIUC). *Clin Infect Dis.* 1997;24(3):387-95.
8. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Penuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med.* 2007;35(5):1284-9.
9. Martin Alfonso S PGA, Aldecoa Alvarez-Santullano C. Sepsis and Immunosenescence in the Elderly Patient: A Review. *Frontiers in Medicine.* 2017;04(Artículo 20).
10. Rusinova K, Guidet B. "Are you sure it's about 'age'?". *Intensive Care Med.* 2014;40(1):114-6.
11. Güemez-Sandoval E. El papiro Ebers y la oftalmología. *Rev mex oftalmol.* 83(2):123-5.
12. Majno G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis.* 1991;163(5):937-45.
13. Baron R M BMJ, Perella M A. Pathobiology of sepsis. Are we still asking the same questions? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:129-34.
14. Duane J.F. JEP, Anand K. Sepsis and Septic Shock: A history. *Critical Care Clinic.* 2009;25:83-101.
15. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 2006;32(12):2077.
16. Rosengart MR. Critical care medicine: landmarks and legends. *Surg Clin North Am.* 2006;86(6):1305-21.
17. Miranda CM, Navarrete TL. [Semmelweis and his outstanding contribution to medicine: washing hands saves lives]. *Rev Chilena Infectol.* 2008;25(1):54-7.
18. 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]. *Orvostort Kozl.* 2015;61(1-4):19-27.
19. Nau JY. [Louis Pasteur, science and the return of "belief"]. *Rev Med Suisse.* 2015;11(484):1626-7.
20. Jessney B. Joseph Lister (1827-1912): a pioneer of antiseptic surgery remembered a century after his death. *J Med Biogr.* 2012;20(3):107-10.
21. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):169-76.
22. Budelmann G. [Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis]. *Internist (Berl).* 1969;10(3):92-101.
23. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Frencken JF, Scicluna BP, Klouwenberg P, et al. The Host Response in Patients with Sepsis Developing Intensive Care Unit-acquired Secondary Infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(4):458-70.
24. Bryan CS. The influence of Sir Andrew Clark (1826-93) on William Osler (1849-1919). *J Med Biogr.* 2005;13(4):195-200.

25. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-23.
26. Rabuel C, Mebazaa A. Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med*. 2006;32(6):799-807.
27. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992;101(6):1481-3.
28. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med*. 1989;17(5):389-93.
29. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 1987;317(11):653-8.
30. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, Johnson DH, Johnson S, MacArthur RD, et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med*. 2004;32(11):2173-82.
31. Larsen R. [Sepsis, SIRS, MODS--new findings, unanswered questions]. *Anaesthesist*. 1996;45(4):311.
32. Chen YX, Li CS. 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*. 2014;18(2):R74.
33. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 2004;30(4):536-55.
34. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013;39(2):165-228.
35. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41(2):580-637.
36. 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(8):801-10.
37. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, 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*. 2016;315(8):775-87.
38. Guidet B AP. Índices de gravedad y aplicaciones en reanimación. *AnestReanim*. 2009;35(2):1-11.
39. Artero A, Zaragoza R, Camarena JJ, Sancho S, Gonzalez R, Nogueira JM. Prognostic factors of mortality in patients with community-acquired bloodstream infection with severe sepsis and septic shock. *J Crit Care*. 2010;25(2):276-81.
40. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13(10):818-29.
41. Alvear-Vega S, Canteros-Gatica J. [Performance evaluation of APACHE II and SAPS III in an intensive care unit]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2018;20(3):373-7.
42. Henriksen DP, Pottgard A, Laursen CB, Jensen TG, Hallas J, Pedersen C, et al. Risk factors for hospitalization due to community-acquired sepsis - a population-based case-control study. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124838.
43. Heffner AC, Horton JM, Marchick MR, Jones AE. Etiology of illness in patients with severe sepsis admitted to the hospital from the emergency department. *Clin Infect Dis*. 2010;50(6):814-20.
44. Peres Bota D, Melot C, Lopes Ferreira F, Vincent JL. Infection Probability Score (IPS): A method to help assess the probability of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2003;31(11):2579-84.
45. Gadani H, Vyas A, Kar AK. A study of ventilator-associated pneumonia: Incidence, outcome, risk factors and measures to be taken for prevention. *Indian J Anaesth*. 2010;54(6):535-40.
46. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-associated pneumonia: the clinical pulmonary infection score as a surrogate for diagnostics and outcome. *Clin Infect Dis*. 2010;51 Suppl 1:S131-5.
47. Vincent JL. Management of sepsis in the critically ill patient: key aspects. *Expert Opin Pharmacother*. 2006;7(15):2037-45.
48. Vila J, Gomez MD, Salavert M, Bosch J. [Methods of rapid diagnosis in clinical microbiology: Clinical needs]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(1):41-6.

49. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66 Suppl 2:ii33-40.
50. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
51. Schuetz P, Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. *Curr Opin Crit Care.* 2007;13(5):578-85.
52. Tillett WS, Francis T. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of *Pneumococcus.* *J Exp Med.* 1930;52(4):561-71.
53. Lobo SM, Lobo FR, Bota DP, Lopes-Ferreira F, Soliman HM, Melot C, et al. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest.* 2003;123(6):2043-9.
54. Baidoshvili A, Nijmeijer R, Lagrand WK, Hack CE, Niessen HW. Localisation of C reactive protein in infarcted tissue sites of multiple organs during sepsis. *J Clin Pathol.* 2002;55(2):152-3.
55. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003;111(12):1805-12.
56. Povoia P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P, et al. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(2):101-8.
57. Schmit X, Vincent JL. The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection.* 2008;36(3):213-9.
58. Lavrentieva A, Kontakiotis T, Lazaridis L, Tsotsolis N, Koumis J, Kyriazis G, et al. Inflammatory markers in patients with severe burn injury. What is the best indicator of sepsis? *Burns.* 2007;33(2):189-94.
59. Fraunberger P, Wang Y, Holler E, Parhofer KG, Nagel D, Walli AK, et al. Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock.* 2006;26(1):10-2.
60. Linscheid P, Seboek D, Nylen ES, Langer I, Schlatter M, Becker KL, et al. In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology.* 2003;144(12):5578-84.
61. Muller B, White JC, Nylen ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):396-404.
62. Nakamura A, Wada H, Ikejiri M, Hatada T, Sakurai H, Matsushima Y, et al. Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit. *Shock.* 2009;31(6):586-91.
63. Limper M, de Kruif MD, Duits AJ, Brandjes DP, van Gorp EC. The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infectious from non-infectious fever. *J Infect.* 2010;60(6):409-16.
64. Muller B, Peri G, Doni A, Perruchoud AP, Landmann R, Pasqualini F, et al. High circulating levels of the IL-1 type II decoy receptor in critically ill patients with sepsis: association of high decoy receptor levels with glucocorticoid administration. *J Leukoc Biol.* 2002;72(4):643-9.
65. 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.* 2011;36(6):570-4.
66. al TTe. Early evaluation of severity in patients with severe sepsis: a comparasion with "septic shock"- subgroup analysis of the Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM-SR). *Acute Med Surg* 2017.Jul 27; 4(4):426-431.
67. Kang FX, Wang RL, Yu KL, Wei Q. [The study on pro-adrenomedullin as a new biomarker in sepsis prognosis and risk stratification]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2008;20(8):452-5.
68. Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol.* 2004;56(1):5-27.
69. Andaluz-Ojeda D, Cicuendez R, Calvo D, Largo E, Nogales L, Munoz MF, et al. Sustained value of proadrenomedullin as mortality predictor in severe sepsis. *J Infect.* 2015;71(1):136-9.
70. Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* 2000;28(8):2793-8.
71. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(3):396-402.
72. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet.* 2004;363(9404):203-9.
73. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.

74. Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandia F, et al. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*. 2012;57(3):332-6.
75. Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):154-60.
76. Samraj RS, Zingarelli B, Wong HR. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock*. 2013;40(5):358-65.
77. Sweeney TE, Perumal TM, Henao R, Nichols M, Howrylak JA, Choi AM, et al. A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nat Commun*. 2018;9(1):694.
78. Sweeney TE, Wong HR, Khatri P. Robust classification of bacterial and viral infections via integrated host gene expression diagnostics. *Sci Transl Med*. 2016;8(346):346ra91.
79. Sweeney TE, Shidham A, Wong HR, Khatri P. A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Sci Transl Med*. 2015;7(287):287ra71.
80. Sweeney TE, Azad TD, Donato M, Haynes WA, Perumal TM, Henao R, et al. Unsupervised Analysis of Transcriptomics in Bacterial Sepsis Across Multiple Datasets Reveals Three Robust Clusters. *Crit Care Med*. 2018;46(6):915-25.
81. Scicluna BP, van Vught LA, Zwinderman AH, Wiewel MA, Davenport EE, Burnham KL, et al. Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2017;5(10):816-26.
82. Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, Humburg P, Hutton P, Mills TC, et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):259-71.
83. Almansa R, Ortega A, Avila-Alonso A, Heredia-Rodriguez M, Martin 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(3):545-53.
84. Bermejo-Martin JF, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Martin-Fernandez M, Almansa R. Characterizing Systemic Immune Dysfunction Syndrome to Fill in the Gaps of SEPSIS-2 and SEPSIS-3 Definitions. *Chest*. 2017;151(2):518-9.
85. al. JFBe. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease). *Journal of Clinical Medicine*. 2018;7, 400.
86. Christaki E, Anyfanti P, Opal SM. Immunomodulatory therapy for sepsis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(11):1013-33.
87. Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogiannis M. The immune response to severe bacterial infections: consequences for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(3):369-80.
88. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(1):32-43.
89. Opal SM. Immunologic alterations and the pathogenesis of organ failure in the ICU. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(5):569-80.
90. Casey LC. Immunologic response to infection and its role in septic shock. *Crit Care Clin*. 2000;16(2):193-213.
91. 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.
92. Cajander S, Backman A, Tina E, Stralin K, Soderquist B, Kallman J. Preliminary results in quantitation of HLA-DRA by real-time PCR: a promising approach to identify immunosuppression in sepsis. *Crit Care*. 2013;17(5):R223.
93. Bermejo-Martin JF, Tamayo E, Ruiz G, Andaluz-Ojeda D, Herran-Monge R, Muriel-Bombin A, et al. Circulating neutrophil counts and mortality in septic shock. *Crit Care*. 2014;18(1):407.
94. Almansa R, Wain J, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Martin-Loeches I, Ramirez P, et al. Immunological monitoring to prevent and treat sepsis. *Crit Care*. 2013;17(1):109.
95. Almansa R, Heredia-Rodriguez 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(5):445-56.
96. al. ARe. Quantification of Immune Dysregulation by Next-regeneration Polymerase Chain Reaction to Improve Sepsis Diagnosis in Surgical Patients. *Annals of surgery*. 2017;July.
97. Almansa R, Tamayo E, Heredia M, Gutierrez S, Ruiz P, Alvarez E, et al. Transcriptomic evidence of impaired immunoglobulin G production in fatal septic shock. *J Crit Care*. 2014;29(2):307-9.
98. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care*. 2012;16(3):R112.

99. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011;306(23):2594-605.
100. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001;166(11):6952-63.
101. Kasten KR, Tschop J, Goetzman HS, England LG, Dattilo JR, Cave CM, et al. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. *Shock*. 2010;34(4):377-83.
102. Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, et al. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun*. 2010;78(4):1582-92.
103. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208(13):2581-90.
104. Tang Benjamin M ea. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care Lond Engl* 2010;14(6):R237.
105. al. WZe. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63.
106. Wong HRea. Genome-wide expression profiling in pediatric shock *Pediatr Res*. 2013;73(4 Pt 2):564-9.
107. M. B. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods*. 2012;9(6):541-4.
108. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013;10(10):1003-5.
109. Jimenez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, Fernandez-Rodriguez A, Almansa R, Gomez-Sanchez E, et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):22.
110. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16045.
111. Moore LJ, Moore FA, Todd SR, Jones SL, Turner KL, Bass BL. Sepsis in general surgery: the 2005-2007 national surgical quality improvement program perspective. *Arch Surg*. 2010;145(7):695-700.
112. Moore LJ, Moore FA. Early diagnosis and evidence-based care of surgical sepsis. *J Intensive Care Med*. 2013;28(2):107-17.
113. Moore LJ, Jones SL, Kreiner LA, McKinley B, Sucher JF, Todd SR, et al. Validation of a screening tool for the early identification of sepsis. *J Trauma*. 2009;66(6):1539-46; discussion 46-7.
114. Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Gandia F, Gomez-Herreras JI, Gomez-Sanchez E, et al. Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. *J Infect*. 2016;72(5):525-36.
115. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med*. 2009;15(5):496-7.
116. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260-8.
117. Cazalis MA, Friggeri A, Cave L, Demaret J, Barbalat V, Cerrato E, et al. Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit Care*. 2013;17(6):R287.
118. Winkler MS, Rissiek A, Priefler M, Schwedhelm E, Robbe L, Bauer A, et al. Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNFalpha response: A diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS One*. 2017;12(8):e0182427.
119. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-6.
120. Colbert JF, Schmidt EP. Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med*. 2016;37(2):263-75.
121. Goligorsky MS. Vascular endothelium in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(2):F266-F75.
122. Groen BB, Hamer HM, Snijders T, van Kranenburg J, Frijns D, Vink H, et al. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;116(8):998-1005.
123. Almansa R, Martin S, Martin-Fernandez M, Heredia-Rodriguez M, Gomez-Sanchez E, Aragon M, et al. Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):11999.

124. Cajander S, Tina E, Backman A, Magnuson A, Stralin K, Soderquist B, 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(5):e0154690.
125. Zhuang Y, Peng H, Chen Y, Zhou S, Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017;22:1344-54.
126. Monneret G, Venet F, Meisel C, Schefold JC. Assessment of monocytic HLA-DR expression in ICU patients: analytical issues for multicentric flow cytometry studies. *Crit Care*. 2010;14(4):432.
127. Venet F, Guignant C, Monneret G. Flow cytometry developments and perspectives in clinical studies: examples in ICU patients. *Methods Mol Biol*. 2011;761:261-75.
128. Postel M, Roosen A, Laurent-Puig P, Taly V, Wang-Renault SF. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(1):7-17.
129. Cheng Y, Dong L, Zhang J, Zhao Y, Li Z. Recent advances in microRNA detection. *Analyst*. 2018;143(8):1758-74.
130. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1175-83.
131. Kroczek RA, Graf D, Brugnani D, Giliani S, Korthuer U, Ugazio A, et al. Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev*. 1994;138:39-59.
132. Van Hoeyveld E, Zhang PX, De Boeck K, Fuleihan R, Bossuyt X. Hyper-immunoglobulin M syndrome caused by a mutation in the promotor for CD40L. *Immunology*. 2007;120(4):497-501.
133. Meng X, Yang B, Suen WC. Prospects for modulating the CD40/CD40L pathway in the therapy of the hyper-IgM syndrome. *Innate Immun*. 2018;24(1):4-10.
134. Kaempfer R, Arad G, Levy R, Hillman D, Nasie I, Rotfogel Z. CD28: direct and critical receptor for superantigen toxins. *Toxins (Basel)*. 2013;5(9):1531-42.
135. Kaempfer R, Popugailo A, Levy R, Arad G, Hillman D, Rotfogel Z. Bacterial superantigen toxins induce a lethal cytokine storm by enhancing B7-2/CD28 costimulatory receptor engagement, a critical immune checkpoint. *Receptors Clin Investig*. 2017;4(1).
136. Kaempfer R. Bacterial Superantigen Toxins, CD28, and Drug Development. *Toxins (Basel)*. 2018;10(11).
137. Schuetz P, Beishuizen A, Broyles M, Ferrer R, Gavazzi G, Gluck EH, et al. Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use. *Clin Chem Lab Med*. 2019.
138. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*. 1993;341(8844):515-8.
139. Schuetz P, Bolliger R, Merker M, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy algorithms for different types of acute respiratory infections based on previous trials. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(7):555-64.
140. Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, Leuppi J, Miedinger D, Muller C, et al. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest*. 2007;131(1):9-19.
141. Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, Falconnier C, Wolbers M, Widmer I, et al. Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: the ProHOSP randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;302(10):1059-66.
142. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*. 2014;5(1):45-56.
143. Patil NK, Bohannon JK, Sherwood ER. Immunotherapy: A promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Pharmacol Res*. 2016;111:688-702.
144. Lysenko L, Lesnik P, Nelke K, Gerber H. Immune disorders in sepsis and their treatment as a significant problem of modern intensive care. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(1):703-12.
145. Watanabe E, Thampy LK, Hotchkiss RS. Immuno-adjuvant therapy in sepsis: novel strategies for immunosuppressive sepsis coming down the pike. *Acute Med Surg*. 2018;5(4):309-15.
146. Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, Angus DC, Moldawer LL, Crouser ED, et al. Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 (BMS-936559). *Crit Care Med*. 2019.

147. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;10:CD007498.
148. Covington EW, Roberts MZ, Dong J. Procalcitonin Monitoring as a Guide for Antimicrobial Therapy: A Review of Current Literature. *Pharmacotherapy*. 2018;38(5):569-81.
149. Tamulyte S, Kopplin J, Brenner T, Weigand MA, Uhle F. Monocyte HLA-DR Assessment by a Novel Point-of-Care Device Is Feasible for Early Identification of ICU Patients With Complicated Courses- A Proof-of-Principle Study. *Front Immunol*. 2019;10:432.
150. Waterfield T, Maney JA, Hanna M, Fairley D, Shields MD. Point-of-care testing for procalcitonin in identifying bacterial infections in young infants: a diagnostic accuracy study. *BMC Pediatr*. 2018;18(1):387.