



DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE UN PANEL DE MARCADORES PROTEICOS EN LA
FASE INICIAL DE LA SEPSIS Y SU VALIDACIÓN EN UNA COHORTE DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SEPSIS GRAVE”**

FCO JAVIER PILAR ORIVE

BARAKALDO

2019



DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE UN PANEL DE MARCADORES PROTEICOS EN LA
FASE INICIAL DE LA SEPSIS Y SU VALIDACIÓN EN UNA COHORTE DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SEPSIS GRAVE”**

Memoria presentada por el Licenciado

Don Fco. Javier Pilar Orive

Para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directora de la tesis: Dra. María Iciar Astigarraga Aguirre

Codirectora: Dra. Susana García Obregón

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación recibida a través de ayudas y proyectos de investigación concedidos por los siguientes organismos:

- Gobierno Vasco. Programa Saiotek. Dpto. Industria, Innovación, Comercio y Turismo 2010. Código: HEMOSEP
- Universidad del País Vasco. Programa UPV/Sociedad 2010. Código: US10/02
- Gobierno Vasco. Programa Saiotek. Dpto. Industria, Innovación, Comercio y Turismo 2012. Código: FAGOSEP
- Gobierno Vasco. Dpto. de Sanidad 2012. Código: 2012111052

DEDICATORIA

A Yolanda

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de varios años de dedicación desde su planteamiento inicial, hasta el momento en el que los resultados y las conclusiones han quedado reflejados en este documento. Durante todo este tiempo, he contado con muchas personas que me han ayudado, aconsejado y colaborado conmigo, muchas de las cuales he tenido la suerte de conocer a lo largo de estos años y sin cuya ayuda no habría podido llevar adelante este proyecto.

Es por lo que mi agradecimiento va dirigido de todo corazón a todas ellas.

Entre otras y en primer lugar mi agradecimiento a mis directoras de tesis:

- Dra. María Iciar Astigarraga, por su orientación, su atención y sus recomendaciones y ánimos constantes para que este trabajo llegara a su fin.
- Dra. Susana García, por sus propuestas en el planteamiento del estudio, su soporte constante, sus lecciones, sus valores, su gran ayuda para conseguir el procesamiento final de las muestras y por su estrecha colaboración en el proyecto.

Ha sido un honor para mí contar con ellas como directoras de este trabajo y espero poder seguir trabajando en el futuro con el equipo del que constituyen parte de este.

A “todos” mis compañeros del Servicio de Intensivos de Pediatría, por su colaboración en la investigación y en la búsqueda de pacientes.

A Susana y a todo el equipo de Biobanco por su colaboración en la recogida de las muestras, así como por su buena disposición para acudir a mi llamada para la recogida de estas.

A mis queridos/as cirujanos/as pediátricos y compañeros/as pediatras que han colaborado en la búsqueda de los sujetos para los controles.

Al equipo de enfermería y auxiliares de la unidad, por su colaboración en la extracción de las muestras sanguíneas y su custodia.

Al equipo del Biobanco, por haberme enseñado el proceso que realizan con las muestras del estudio y por la ayuda prestada en la información del procedimiento.

A los doctores Mikel Azkagorta y Felix Elortza de CIC Biogune, por su cooperación en el procesamiento de las muestras de proteómica y por facilitarme toda la información necesaria para comprender mejor el análisis de las muestras, una parte bastante desconocida de este proyecto antes del inicio de este.

A mis amigos, siempre atentos a lo que me rodea, por sus palabras de ánimo y muestras de cariño cuando los necesitaba.

A mi hermano Iñaki, siempre cerca y dispuesto para poder contar con él en todo momento.

A mi madre que siempre me ha apoyado en todos mis proyectos y tiene una fe ciega en mi, propia del hecho de ser la mejor madre.

A mis hijos Arrate y Xabier, por su apoyo y cariño.

Y como no, a mi mujer Yolanda por todos estos años juntos, por todo su amor, su apoyo y por comprender lo importante que era para mí este proyecto.

Y por último y no menos importante muchas gracias a todos los pacientes y a sus padres/tutores que se ofrecieron voluntarios para formar parte de este proyecto y han hecho posible este trabajo

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de sepsis	1
1.2 Epidemiología	6
1.2.1 Incidencia	6
1.2.2 Mortalidad	7
1.2.3 Evolución	8
1.3 Etiología	8
1.4 Fisiopatología	9
1.5 Clínica	18
1.5.1 Clasificación clínica	18
1.6 Diagnóstico	23
1.6.1 Marcadores de Infección	25
1.7 Tratamiento	26
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	35
2.1 Antecedentes e importancia del estudio	35
2.2 Hipótesis del estudio	37
2.3 Objetivos	38
2.3.1 Objetivo general	38
2.3.2 Objetivos específicos	38
3. SUJETOS Y MÉTODO	41
3.1 Sujetos	41
3.1.1 Criterios de inclusión	41
3.1.2 Criterios de exclusión	42

3.1.3 Variables del estudio	42
3.2 Materiales y Método	43
3.2.1 Obtención y conservación de las muestras en UCIP	43
3.2.2 Envío de la muestra al Biobanco	44
3.2.3 Obtención de suero a partir de muestras de sangre	44
3.3 Metodología de los estudios de proteómica en las muestras	45
3.3.1 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	48
3.4 Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS	57
4.1 Características clínicas del grupo de pacientes sépticos y controles	57
4.2 Estudio descriptivo de los pacientes con sepsis	57
4.2.1 Datos generales	57
4.2.2 Sepsis grave	60
4.2.3 Shock séptico	63
4.3 Estudio descriptivo de los pacientes controles	66
4.4 Análisis del perfil proteómico sérico de los pacientes sépticos y controles	67
4.5 Proteínas seleccionadas	83
4.5.1 Disminuidas en los pacientes sépticos	83
4.5.2 Aumentadas en los pacientes sépticos	86
4.6 Análisis de las proteínas para la validación	94
5. DISCUSIÓN	109
5.1 Características clínicas de los pacientes pediátricos con sepsis	115

5.2 Proteínas seleccionadas como posibles biomarcadores	116
5.3 Búsqueda de un panel de biomarcadores	131
5.4 Limitaciones del estudio	134
6. CONCLUSIONES	137
7. BIBLIOGRAFÍA	141
8. ANEXOS	165
Anexo1. Informes del Comité de Ética.	167
Anexo 2. Modelo de consentimiento para el paciente con sepsis	169
Anexo 3. Kit específico para la depleción de las 12 proteínas abundantes	175
Anexo 4. Modelo de ELISA para SAA	177

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Criterios q SOFA.

Figura 2. Respuesta del huésped a la infección.

Figura 3. Mecanismos inmunológicos inductores de la inflamación en las primeras etapas de la infección.

Figura 4. Activación de los sistemas de coagulación y complemento durante la sepsis.

Figura 5. Algoritmo del Colegio Americano de Medicina Critica para el tratamiento de la sepsis por objetivos en lactantes y niños.

Figura 6. Representación del método ELISA sandwich.

Figura 7. Modelo curva estándar.

Figura 8. Perfil proteómico de los controles (A) y de los pacientes sépticos (B).

Figura 9. Distribución de las proteínas por cambio en su valor basal.

Figura 10. Proteínas comunes entre los 3 grupos pediátricos: controles-sepsis, controles-Gram + y controles-Gram -.

Figura 11. Representación gráfica de las proteínas con mayor valor de cambio y valores de p más bajos. Marcadas con número y flecha las proteínas que intervienen en los procesos biológicos implicados en la infección.

Figura 12. Flujograma para la selección de las proteínas.

Figura 13. Valores de proteínas en suero de los pacientes y curvas ROC.

Figura 14. Diagrama de dispersión simple que demuestra la correlación entre las proteínas PCR y la SAA1.

Figura 15. Representación esquemática del análisis de proteómica.

Figura 16. Rango (A) y porcentaje (B) de las proteínas en plasma.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de sepsis.

Tabla 2. Escala SOFA adultos.

Tabla 3. Escala de pSOFA.

Tabla 4. Criterios de disfunción de órganos.

Tabla 5. Variables clínicas en función de la edad.

Tabla 6. Diferencias entre la sepsis en edad pediátrica y adulta.

Tabla 7. Datos generales de la población global de sepsis.

Tabla 8. Características de los pacientes con sepsis grave y shock séptico.

Tabla 9. Analítica y constantes de los pacientes con sepsis grave/shock séptico.

Tabla 10. Gérmenes y antibióticos empleados en los pacientes con sepsis grave.

Tabla 11. Gérmenes y antibióticos empleados en los pacientes con shock séptico.

Tabla 12. Proteínas diferenciadas entre pacientes sépticos y controles identificadas mediante proteómica.

Tabla 13. Proteínas diferenciadas estadísticamente significativas entre pacientes sépticos y controles.

Tabla 14. Funciones relacionadas con defensa, inflamación y bacterias en las que participan las diferentes proteínas seleccionadas ($p < 0,05$ y Max fold > 2). Grupo control-sépticos.

Tabla 15. Relación de las 24 proteínas implicadas, distribuidas en orden al nº de procesos en los que intervienen, es la siguiente.

Tabla 16. Proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes con infección ocasionada por bacterias Gram + y bacterias G -

Tabla 17. Concentraciones séricas de las proteínas validadas mediante técnica de ELISA, sensibilidad y especificidad y área bajo la curva.

Tabla 18. Correlaciones entre las diferentes proteínas

ABREVIATURAS

6PGD_HUMAN: Fosfogluconato-deshidrogenasa (descarboxilante)

A1AG1_HUMAN: Glicoproteína alfa-1-ácida 1

A2GL_HUMAN: Alfa-2- glicoproteína rica en leucina

AACT_HUMAN: Alfa-1-antiquimotripsina

ACCM: American College of Critical Care Medicine

ACTB_HUMAN: Actina citoplasmática

ALDOB_HUMAN. Fructosa-bisfosfato aldolasa B

APOA4_HUMAN. Apolipoproteína A-IV

APOC1_HUMAN. Apolipoproteína C-I

AUROC: Área bajo la curva ROC

B2MG_HUMAN. Beta-2-microglobulina

CAH1_HUMAN: Anhidrasa Carbónica 1

CATA_HUMAN: Catalasa

CBPN_HUMAN: Cadena N catalítica de carboxipeptidasa

CD: Células dendríticas

CD5L_HUMAN: Antígeno-like CD5

CD14_HUMAN. Antígeno CD14 de diferenciación de monocitos

CD25: Receptor de la cadena alfa de la interleucina 2

CFB: Factor B del complemento

CFAB_HUMAN: Factor B del complemento

CRP_HUMAN: Proteína C reactiva

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño celular

ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FA12_HUMAN: Factor XII de la coagulación

FETUB_HUMAN: Fetuina B

FIBB_HUMAN: Cadena beta del fibrinógeno

FIBG_HUMAN: Cadena gamma del fibrinógeno

FINC_HUMAN: Fibronectina

GFR: Índice de filtración glomerular

HABP2_HUMAN: Proteína de unión a hialuronano 2

Hb: Hemoglobina

HBA_HUMAN: Subunidad alfa de la hemoglobina

HBB_HUMAN: Subunidad beta de la hemoglobina

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HLF: Lactoferrina humana

HPT_HUMAN: Haptoglobina

IFN-gamma: interferón gamma

IPSP_HUMAN: Inhibidor plasmático de proteasa sérica

IL1 β : Interleucina 1 β

IL 6: Interleucina 6

IL 10: Interleucina 10

IL 12: Interleucina 12

IL 18: Interleucina 18

IRA: Insuficiencia renal aguda

ITIH3_HUMAN: Cadena pesada H3 del inhibidor de la inter-alfa-tripsina

LBP_HUMAN: Proteína de unión a lipopolisacárido

LBP: Proteína de unión al lipopolisacárido

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

LDHA_HUMAN: Cadena de L-lactato deshidrogenasa A

lpm: Latidos por minuto

LPS: Lipopolisacárido

LRG1: Alfa 2-glicoproteína rica en leucina-2

LTF: Lactoferrina

LYAM1_HUMAN: L selectina

SDMO: Síndrome de disfunción multiorgánico

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos

NFκB: Factor nuclear κB

NGAL_HUMAN. Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos

PALS: Pediatric advanced life support. Soporte vital avanzado pediátrico

PAMPs: Patrones moleculares asociados a los patógenos

PCT: Procalcitonina

PCR: Proteína C reactiva

PELOD: Disfunción Orgánica Logística Pediátrica

PEWS: Pediatric Early Warning score. Escala de alerta temprana pediátrica

PICS: Inflamación persistente, inmunosupresión y síndrome de catabolismo

PIM: Índice de mortalidad pediátrica

PLMN_HUMAN.: Plasminógeno

PLSL_HUMAN: Plastina-2

POSTN_HUMAN: Periostina

PTX3_HUMAN: Proteína relacionada con la pentraxina PTX3

PRDX2_HUMAN: Peroxirredoxina 2

PRISM: Riesgo pediátrico de mortalidad

PRRs: Receptores de reconocimiento de estos patrones

pSOFA: SOFA pediátrico. Evaluación secuencial del fallo orgánico pediátrico.

qSOFA: Quick Sepsis Related Organ Failure Assessment o quickSOFA.

Escala de evaluación rápida de SOFA relacionada con la sepsis

RET4_HUMAN: Proteína de unión a retinol 4

rpm: Respiraciones por minuto

SAA1: Amiloide sérico A1

SAA2_HUMAN: Proteína amiloide sérica A-2

SAA1_HUMAN: Proteína amiloide sérica A-1

sCD25: Receptor soluble de la cadena alfa de la Interleucina 2

sCD163: Receptor soluble de los complejos haptoglobina-hemoglobina

SD: Desviación estándar

SG: Sepsis grave

SS: Shock séptico

SHBG_HUMAN: Globulina fijadora de hormonas sexuales

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment. Evaluación secuencial del fallo orgánico

SPRC_HUMAN: SPARC Proteína secretada ácida y rica en cisteína

TFPI: Factor tisular plasmático

TLR: Tool-like receptor

TH1: Linfocitos T helper tipo 1

TH2: Linfocitos T helper tipo 2

TNF: Factor de necrosis tumoral

TTHY_HUMAN: Transtiretina

TRFL_HUMAN: Lactotransferrina

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UCIP: Unidad de cuidados intensivos pediátricos

ZPI_HUMAN: Inhibidor de la proteasa dependiente de la proteína Z

RESUMEN

RESUMEN

La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal producida por una respuesta desregulada del huésped a la infección. En ella, la respuesta inmune iniciada por el patógeno invasor no va a permitir que el equilibrio inicial del organismo se recupere y se desencadena una reacción patológica caracterizada por una inflamación excesiva e inmunosupresión. Las infecciones bacterianas invasivas representan hoy en día una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Su incidencia a pesar de las medidas sanitarias continúa en aumento, en parte, por la mayor supervivencia de los niños que desarrollan comorbilidades y en parte, por la mayor edad de supervivencia de la población adulta. Su mortalidad en cambio ha disminuido en los últimos años debido a un mejor reconocimiento de la enfermedad y a una mayor adherencia a las guías de buenas prácticas clínicas (*Surviving Sepsis Campaign*), que se publican desde el año 2004 y se actualizan cada 4 años. Las últimas guías publicadas de esta campaña (2016) así como la actualización del 2018 no incluyen a los niños.

Un aspecto fundamental para mejorar el pronóstico de la sepsis es la identificación precoz de estos pacientes basada en aspectos clínicos [escalas de gravedad PEWS (*Pediatric Early Warning score*), defectos funcionales de órganos (*Sequential Organ Failure Assessment, SOFA score*), quick SOFA (*qSOFA*) y/o biomarcadores, que nos permitan iniciar rápidamente el tratamiento y mejorar su pronóstico.

Trabajos recientes del análisis del proteoma humano utilizando líquidos y/o tejidos (plasma, células, etc.) de pacientes con sepsis, han identificado

nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. El análisis del proteoma del suero de los niños con sepsis puede aclarar puntos inciertos e identificar nuevos biomarcadores relacionadas con el desarrollo y progresión de la enfermedad.

El objetivo principal de esta tesis es la identificación de nuevos biomarcadores séricos de diagnóstico de sepsis en niños que permitan diagnosticar precozmente la enfermedad. Los biomarcadores actuales utilizados en la práctica clínica (PCT, PCR, etc.) no han demostrado ser lo suficientemente sensibles ni específicos para el diagnóstico de la sepsis y también se alteran en otras situaciones inflamatorias no infecciosas.

Para ello se realizó un estudio analítico observacional de casos y controles de un solo centro, Hospital Universitario de Cruces, que incluía niños de 1 mes a 16 años ingresados en la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) con el diagnóstico de sepsis grave o shock séptico. Los controles fueron niños sanos, sin enfermedades crónicas ni criterios de infección reciente, a los que se les iba a realizar una analítica preoperatoria para una cirugía electiva (hernia inguinal, fimosis, etc.).

Entre marzo del 2013 y octubre del 2016 se analizaron 40 de 51 pacientes con sepsis (se excluyeron 11 que no cumplían los criterios de inclusión) y 24 controles sanos. De los 40 pacientes del estudio y según los criterios de la Conferencia Internacional de Consenso sobre Sepsis Pediátrica en 2002 y su posterior actualización en el 2017 (*Goldstein B, PCCM 2005 y Davis AL, CCM 2017*), 7 presentaban una sepsis grave y 33 un shock séptico.

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Euskadi (CEIC-Euskadi). El consentimiento informado escrito se obtuvo de los pacientes / controles o de sus representantes legales.

La metodología utilizada se ha basado en técnicas de proteómica sérica diferencial, comparándose los patrones proteómicos séricos de pacientes con sepsis frente a controles sanos. El análisis del suero de los niños mediante espectrometría de masas reveló diferencias entre controles sanos y sépticos en 230 proteínas. Cuarenta y cuatro de ellas cumplían los criterios de selección del estudio (diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y un Max fold (cambio sobre el valor basal) mayor de 2). Tras la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS) se seleccionaron 4 proteínas para su posterior validación en los 40 pacientes sépticos y los 24 controles sanos mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Las proteínas seleccionadas fueron Lactoferrina (LTF), Amiloide sérico A1 (SAA-1), Factor de complemento B (CFB) y Alfa 2-glicoproteína rica en leucina-2 (LRG1). Otras 2, receptor soluble de la Interleucina 2 (sCD25) y receptor soluble de la haptoglobina-hemoglobina (sCD163), proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria en la linfocitosis hemofagocítica, fueron añadidas al estudio.

Los resultados muestran que los niveles séricos de las proteínas sCD25, LTF, SAA-1 aumentan significativamente en los pacientes sépticos frente a los controles. La Proteína LRG1 disminuye significativamente en los pacientes sépticos. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de pacientes sépticos y controles en relación con las proteínas CFB y sCD163. Las proteínas sCD25, SAA1, LRG1 y LTF presentan unos niveles de especificidad y

sensibilidad suficientemente elevados, así como un área bajo la curva ROC buena-excelente, como para ser considerados posibles biomarcadores en las sepsis infantiles.

En conclusión, las proteínas SAA-1, sCD25, LRG1 y LTF, podrían utilizarse en combinación con otros elementos (escalas clínicas, otros biomarcadores) para mejorar el diagnóstico de sepsis grave en niños. Se hace necesario continuar esta línea de investigación para validar y correlacionar estos resultados en estudios con un mayor número de pacientes, así como, analizar otras proteínas identificadas que también pudieran contribuir al objetivo del diagnóstico temprano de la sepsis.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN DE SEPSIS

La sepsis es un trastorno orgánico heterogéneo potencialmente mortal causado por una respuesta desregulada del huésped a la infección (*Singer M, JAMA 2016*). La primera vez que se usó el término de "sepsis" fue en poemas de Homero que datan de hace más de 2.700 años (*Funk D, Crit Care Clinic 2009*) pero no se definió clínicamente hasta principios de la década de 1990 cuando un grupo de expertos lanzó la primera definición consensuada de sepsis (*Bone RC, Chest 1992*). En este consenso se definieron los términos de:

- **sepsis**, como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, del inglés *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) asociado a una infección sospechada o confirmada
- **sepsis grave**, como una sepsis con disfunción de órganos
- **shock séptico** a una sepsis e hipotensión a pesar de una adecuada administración de fluidos (Tabla 1).

Posteriormente en 2001 hubo una actualización de estos términos que básicamente aumentaba la lista de signos y síntomas asociados a sepsis (*Levy MM, CCM 2003*) (Tabla 1). La Sociedad de Cuidados Intensivos de Australia y Nueva Zelanda realizó un análisis retrospectivo de sus bases de datos (2000-2013) que incluían a 109.663 pacientes con infección y fallo orgánico con intención de validar la definición de sepsis grave (*Kaukonen KM, NEJM 2015*). Del análisis se dedujo que el 87.9% de los pacientes tenían dos o más criterios SIRS, pero hubo un 12.1% que no tenían ningún criterio SIRS. El uso de los criterios

SIRS omitió uno de cada ocho pacientes con sepsis grave. Concluyeron que el uso de los criterios SIRS carecía de sensibilidad y especificidad para diagnosticar la sepsis grave en los pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI). En 2016 en la definición de consenso más reciente de "Sepsis 3", se eliminan los términos de sepsis grave y SIRS (ver Tabla 1) y se define la **sepsis** como una disfunción orgánica potencialmente mortal que se produce por una respuesta desregulada del huésped a la infección (*Singer M, JAMA 2016*).

El **shock séptico** se define como un subconjunto de la sepsis en la cual el componente circulatorio, celular y/o las anomalías metabólicas son lo suficientemente marcados para sustancialmente aumentar la mortalidad. El shock séptico se concibe como una sepsis con hipotensión persistente que requiere vasopresores para mantener la presión arterial media mayor o igual a 65 mmHg y con una concentración sérica de lactato > 2 mmol/L a pesar de la reanimación adecuada con líquidos (Tabla 1).

Tabla 1. Definición de sepsis

Conferencia de Consenso de 1991. ^{Bone RC}	
Diagnostico	Signos y síntomas
Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)	Pacientes que experimentan al menos dos de los siguientes síntomas: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura corporal $\geq 38^{\circ}\text{C}$ o $\leq 36^{\circ}\text{C}$ • Frecuencia cardíaca ≥ 90 lpm • Frecuencia respiratoria ≥ 20 rpm o CO_2 arterial < 32 mmHg • Recuento de leucocitos $\geq 12 \times 10^9/\text{L}$ $\leq 4 \times 10^9/\text{L}$, o $\geq 10\%$ de formas inmaduras
Sepsis	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y confirmación o sospecha de infección
Sepsis grave	Sepsis y disfunción orgánica aguda
Shock séptico	Sepsis e hipotensión persistente sin respuesta a la resucitación con líquidos
Conferencia Internacional de Definición de Sepsis 2001. ^{Levy MM}	
Las definiciones de sepsis de 2001 fueron muy similares a las definiciones establecidas en 1991. Añaden una lista de signos y síntomas para el diagnóstico de sepsis.	
Tercer consenso internacional para la definición de sepsis y shock séptico (Sepsis-3). ^{Singer M} 2016.	

Diagnóstico	Signos
Sepsis	Disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada a la infección del huésped La disfunción de órgano puede identificarse como un cambio agudo en el puntaje total del SOFA de ≥ 2 puntos
Shock Séptico	Sepsis en la cual el componente circulatorio, celular y / o las anomalías metabólicas son lo suficientemente marcados para sustancialmente aumentar la mortalidad Clínicamente definido como sepsis con hipotensión persistente que requiere vasopresores para mantener la presión arterial media ≥ 65 mmHg y con una concentración sérica de lactato > 2 mmol/L
<p>La presencia de disfunción orgánica es fundamental y necesaria en el nuevo consenso de 2016 para la definición de sepsis. Hasta entonces, la disfunción orgánica formaba parte de la definición de sepsis "grave", un término abandonado en la definición del tercer consenso internacional (Sepsis-3).</p> <p>La evaluación secuencial de fallo de órgano (SOFA) se basa en seis diferentes apartados (cada uno se clasifica de 1 a 4 de acuerdo con el incremento de la gravedad). Estos apartados son: respiratorio, cardiovascular, hepático, coagulación, sistema renal y neurológico. <small>Vincent JL, ICM 1996</small></p>	

Lpm: latidos por minuto; rpm: respiraciones por minuto; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

Los criterios clínicos para la sepsis incluyen infección sospechada o documentada y un aumento de dos o más puntos en la escala de SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) (Tabla 2), escala que mide la disfunción de órganos.

Tabla 2. Escala SOFA adultos

	0	1	2	3	4
Respiración ^a PaO₂/F_{IO₂} (mmHg) o SaO₂/F_{IO₂}	>400	<400 221-301	<300 142-220	<200 67-141	<100 <67
Coagulación Plaquetas 10³/mm³	>150	<150	<100	<50	<20
Hígado Bilirrubina	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Cardiovascular ^b Tensión arterial	PAM ≤ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamina a <5 o Dobutamina a cualquier dosis	Dopamina a dosis de 5,1-15 o Epinefrina a $\leq 0,1$ o Norepinefrina a \leq 0,1	Dopamina a dosis de >15 o Epinefrina a $> 0,1$ 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

PaO₂: presión arterial de oxígeno; F_{IO₂}: fracción de oxígeno inspirado; SaO₂: Saturación arterial de oxígeno periférico; PAM, presión arterial media; ^aPaO₂/F_{IO₂} es la relación utilizada preferentemente, pero si no esta disponible usaremos la SaO₂/F_{IO₂}; ^bMedicamentos vasoactivos administrados durante al menos 1 hora (dopamina y norepinefrina como $\mu\text{g/Kg/min}$) para mantener la PAM por encima de 65 mmHg.

El score q-SOFA (Figura 1) se desarrolla como una herramienta sencilla para identificar a los pacientes en riesgo de sepsis fuera de las áreas de críticos, mostrándose como una herramienta útil con un área bajo la curva ROC (AUROC) de 0,81 superior al score SOFA, AUROC de 0,79 y al SIRS, AUROC de 0,76.



Figura 1. Criterios q SOFA. (www.qSOFA.org)

La definición de sepsis pediátrica se ha mantenido constante desde la Conferencia Internacional de Consenso sobre Sepsis Pediátrica en 2002 y su posterior actualización en el 2017 (*Goldstein B PCCM 2005 y Davis AL CCM 2017*). La sepsis pediátrica se define actualmente como la tríada de fiebre, taquicardia y vasodilatación, acompañada de un cambio en el estado mental y/o un relleno capilar prolongado de más de 2 segundos.

El puntaje de SOFA no es adecuado para niños porque no está ajustado por edad. Un estudio reciente (*Matics TJ, JAMA Pediatr 2017*) ha evaluado, adaptado y validado, con resultados prometedores, el uso del SOFA pediátrico (pSOFA) (Tabla 3), con el objetivo de poder clasificar la disfunción orgánica de los pacientes pediátricos y utilizar la definición de Sepsis-3.

Tabla 3. Escala de pSOFA.

Variables	Score ^a				
	0	1	2	3	4
Respiratorio					
PaO ₂ /F _{IO₂} ^b	≥400	300-399	200-299	100-199 con VM	< 100 con VM
SpO ₂ /F _{IO₂} ^c	≥ 292	24-291	221-264	148-220 con VM	< 148 con VM
Coagulación					
Plaquetas 10 ³	≥150	100-149	50-99	20-49	<20
Hígado					
Bilirrubina, mg/dL	< 1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	>12
Cardiovascular					
MAP (mmHg) por edad o vasoactivos (µg/Kg/min) ^d					
< 1m	≥46	<46	Dopamina ≤ 5 o dobutamina	Dopamina > 5 o adrenalina ≤ 0,1 o NAD ≤ 0,1	Dopamina >15 o adrenalina >0,1 o NAD > 0,1
1-11 m	≥55	<55			
12-23 m	≥60	<60			
24-59 m	≥62	<62			
60-143 m	≥65	<65			
144-216 m	≥67	<67			
216 m ^e	≥70	<70			
Neurológico					
Glasgow Coma Escala ^f	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina mg/dL					
< 1m	>0,8	0,8-0,9	1-1,1	1,2-1,5	≥1,6
1-11 m	<0,3	0,3-0,4	0,-0,7	0,8-1,1	≥1,2
12-23 m	<0,4	0,-0,5	0,6-1	1,1-1,4	≥1,5
24-59 m	<0,6	0,6-0,8	0,9-1,5	1,6-2,2	≥2,3
60-143 m	<0,7	0,7-1	1,1-1,7	1,8-2,5	≥2,6
144-216 m	<1	1-1,6	1,7-2,8	2,9-4,1	≥4,2
216 m ^e	<1,2	1,2-19	2-3,4	3,5-4,9	≥5

F_{IO₂}: Fracción inspiratoria de oxígeno; VM: ventilación mecánica. NAD: noradrenalina. MAP: presión arterial media; pSOFA: *Pediatric Sequential Organ Failure Assessment*; S_{pO₂}: Saturación de oxígeno. ^a El pSOFA se calcula cada 24 horas, usando el peor valor. ^b P_{aO₂} se mide en mmHg. ^c Sólo se consideran saturaciones de 97% o menos. ^d La MAP solo se usa en los valores de 0 y 1. Los vasoactivos en valores de 2 a 4, por al menos una hora de duración. ^e El punto de corte para 18 años fue el mismo que el original. ^f Se uso la escala pediátrica para el Glasgow coma escala.

pSOFA. Tomado de *Matics TJ, JAMA Pediatric 2017.*

1.2. EPIDEMIOLOGIA

1.2.1. INCIDENCIA

Aunque las definiciones variables y los diferentes métodos de registro de los casos obstaculizan la precisión en la incidencia y resultados de la sepsis, es indudable que la carga global de la sepsis es alta. Esto se refleja en un estudio exhaustivo que utilizó los datos administrativos obtenidos entre 2004 y 2009 en el 20% de todos los hospitales de los Estados Unidos y estimó la incidencia de sepsis entre 300-1.031 casos por 100.000 habitantes, con una tasa de mortalidad del 14,7-29,9% (*Adhikari NK, Lancet 2010 y Gaieski D, CCM 2013*). De acuerdo con esto, un metaanálisis reciente que abarca 27 estudios en siete países con altos ingresos estimó la tasa de incidencia de casos tratados en el hospital entre 437 para sepsis y 270 para sepsis grave por 100.000, durante la década más reciente; las mortalidades asociadas fueron del 17% y 26%, respectivamente (*Fleischmann C, AJRCCM 2016*). La extrapolación de datos de áreas con altos ingresos a entornos de áreas con escasos recursos llevaría a una estimación de 31,5 millones de sepsis y 19,4 millones de casos de sepsis grave por año y hasta 5,3 millones de muertes anuales (*Fleischmann, C AJRCCM 2016*).

La incidencia de la sepsis en todos grupos de edad está aumentando en el mundo. Entre los adultos, los diagnósticos de sepsis se han incrementado de 359 a 535 por 100.000 desde 2003 hasta 2009 (*Walkey AJ, AATS 2015*). En consonancia con los hallazgos en los adultos, la tasa de sepsis en la población pediátrica ha aumentado de 92,8 por 100.000 en 2006 a 158,7 por 100.000 en 2012 (*Schuller KA, CPP 2017 y Ruth A, PCCM 2014*).

1.2.2. MORTALIDAD

La tasa de letalidad de la sepsis ha disminuido en los últimos años y en algunas encuestas ha alcanzado aproximadamente el 20% (*Gaieski DF Crit Care Med 2013* y *Kaukonen KM, JAMA 2014*). Esta reducción se debe probablemente, por un lado, a la mejora de la atención crítica, la detección temprana y a la intervención rápida; y por otro a la implementación de las directrices *Surviving Sepsis Campaign* (*Rhodes A, CCM 2017*), que consisten en recomendaciones de expertos basadas en la evidencia para el tratamiento de la sepsis. Estas guías empezaron a publicarse en el 2004 y se publican actualizaciones cada 4 años. La mortalidad absoluta causada por la sepsis tiende a aumentar debido al creciente número de pacientes con sepsis (*Gaieski DF, Crit Care Med 2013*).

Aproximadamente la mitad de los casos de sepsis pediátrica en los Estados Unidos afectan a recién nacidos con bajo peso al nacer (*Watson RS, PCCM 2005* y *Angus DC, NEJM 2013*), y la muerte o la discapacidad mayor ocurre en el 40% de los recién nacidos con sepsis (*Brocklehurst P, NEJM 2011*).

El aumento general de la sepsis en el tiempo entre los niños podría deberse en parte a una mayor precisión diagnóstica con una mayor conciencia de la enfermedad pediátrica y mejoras en las definiciones (*Schuller KA CPP 2017*; *de Souza DC, Shock 2017* y *Weiss SL, AJRCCM 2015*). La Conferencia Internacional de Consenso de 2002 sobre Sepsis Pediátrica unificó la definición de sepsis pediátrica, permitiendo una mejor comparación entre los estudios realizados en los diferentes hospitales (*Goldstein B PCCM 2005* y *Mathias B, COP 2016*). Quizás las diferencias más significativas entre la sepsis adulta y pediátrica se observan en los resultados. Mientras que la mortalidad por sepsis entre los adultos se ha mantenido casi constante en las últimas décadas, con cifras que van desde 35%

al 50%, la mortalidad por sepsis en la población pediátrica ha disminuido dramáticamente desde 1980 (*Vincent JL, CCM 2006; Ruth A, PCCM 2014 y Wheeler DS, OIJ 2011*). La puesta en marcha de recomendaciones tales como el cumplimiento de una serie de medias en una hora han disminuido la mortalidad en el Estado de Nueva York (*Evans IVR, JAMA 2018*). Estas medidas se comentan en el protocolo de manejo de la sepsis pediátrica en el apartado de tratamiento.

En general, las tasas de mortalidad para pacientes pediátricos con sepsis oscilan entre el 10% y el 20% (*Black RE, Lancet 2010*). A pesar de los avances en la atención y la mejora en los resultados, la sepsis sigue siendo una de las principales causas de muerte pediátrica en todo el mundo. (*Schlapbach LJ, Lancet Infect Dis 2015*)

1.2.3. EVOLUCIÓN

Los pacientes que son dados de alta del hospital sufren de una variedad de secuelas a largo plazo, entre las que se incluyen discapacidades físicas y cognitivas y enfermedades cardiovasculares. También adquieren un mayor riesgo de mortalidad, particularmente en el primer año después del evento de la sepsis, que indica el impacto de la sepsis en la atención de la salud y la sociedad (*Iwashyna TJ, JAMA 2010 y Prescott HC, BMJ 2016 y Yende S, CCM 2016*)

1.3. ETIOLOGÍA

Las causas de la sepsis en la población pediátrica son diferentes de las causas atribuidas a la sepsis en adultos. En el caso de la sepsis neonatal precoz, dentro de las primeras 72 horas de vida, los gérmenes más frecuentes son el estreptococo del grupo B, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp.* y

Listeria monocytogenes. Si la sepsis neonatal es de inicio tardío, después de las primeras 72 horas de vida, encontraremos con más frecuencia estafilococos coagulasa negativos, bacilos gramnegativos, *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* sensible y resistente a la meticilina. En niños mayores, las etiologías más comunes son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Meningococcus* (Aneja RK, CIDR 2011). La aparición de organismos multirresistentes, especialmente en la unidad de cuidados intensivos (UCI), requieren una atención especial y una cuidadosa elección de los antimicrobianos (MCGrath EJ, IJP 2011). Los datos actuales sugieren un aumento en la mortalidad por infecciones secundarias a organismos resistentes a múltiples fármacos (Folgori L, PIDJ 2014).

1.4. FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología de la sepsis es extremadamente compleja y variable. Va a depender, por un lado, del patógeno (carga y virulencia), del huésped (genética, epigenética y comorbilidad) y del medio ambiente (incluido el microbioma); y por otro lado del tiempo transcurrido desde el inicio de la infección, presentando distintas respuestas tanto a nivel local, regional como sistémico. A pesar de los avances en la comprensión de su fisiopatología, sigue sin estar claro cuáles son los mecanismos principales impulsores de la misma.

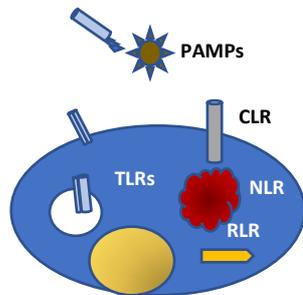
La sepsis se produce como consecuencia de la entrada de los gérmenes en el organismo (Figura 2). Después de la infección, el patógeno invasor se encuentra con el sistema inmune innato del huésped ("inmunidad protectora"). Las células inmunes tales como leucocitos y las células parenquimatosas tales como las células epiteliales y endoteliales están implicadas en la respuesta

inmune local temprana a los patógenos. Estas células detectan a los gérmenes mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) a través de una serie de receptores de reconocimiento de patrones de superficie celular e intracelulares (PRRs) (*Takeuchi O, Cell 2010*) (Figura 2), que incluyen entre otros, a los receptores tipo Toll (tool-like receptor, TLR). En la mayoría de los casos, la respuesta inmune innata elimina el patógeno invasor. Esto se produce mediante una serie de reacciones proinflamatorias, tales como la liberación de citoquinas y quimiocinas, el reclutamiento de fagocitos, y la activación local del complemento y los sistemas de la coagulación. Posteriormente se busca un retorno a la homeostasis previa mediado por mecanismos compensatorios que van dirigidos a contener la inflamación inicial y prevenir el daño colateral de los tejidos. Sin embargo, durante algunas infecciones, el patógeno prevalece y logra multiplicarse a pesar de la respuesta innata inicial y provoca un desequilibrio de esta homeostasis y daño al huésped (Figura 2).

A. RESPUESTA PROINFLAMATORIA	Sepsis	
	Inmunidad protectora	Inflamación excesiva
	RESPUESTA LOCALIZADA INNATA INMUNE	CELULAS PARENQUIMATOSAS Y LEUCOCITOS
		ENDOTELIO

<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de mediadores proinflamatorios • Reclutamiento de leucocitos • Activación del complemento • Activación de la coagulación 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de mediadores proinflamatorios • Daño celular con liberación de DAMPs 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de mediadores proinflamatorios • Aumento de la adhesividad y propiedades procoagulantes
	PLAQUETAS	OTROS
	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de mediadores proinflamatorios • Activación de neutrófilos y endotelio • Trombos microvasculatura 	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de la coagulación (trombosis microvascular) • Activación del complemento

B. HOMEOSTASIS



C. MECANISMOS ANTIINFLAMATORIOS

Mecanismos de reparación local	Inmunosupresión	
	CELULAS T CD4	CELULAS T CD8
<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición y resolución de la inflamación • Reparación tisular • Retorno al equilibrio 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la apoptosis • Agotamiento • Polarización células Th2 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la apoptosis • Agotamiento • Disminución de la función citotóxica
	NEUTROFILOS	CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO
	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la apoptosis • Aumento de células inmaduras con disminución de las funciones antimicrobianas 	<ul style="list-style-type: none"> • Reprogramación de los macrófagos a fenotipo M2 • Expresión HLA-DR reducida
	NODULO LINFOIDE	OTROS
	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptosis de células B y DCs foliculares 	<ul style="list-style-type: none"> • Expansión de células T reguladoras y poblaciones MDSC

Figura 2. Respuesta del huésped a la infección. A: Respuesta inflamatoria. B: Homeostasis. C: respuesta antiinflamatoria. PAMPs: patrones moleculares asociados al patógeno. CLR, TLRs, NLR, RLR: diferentes receptores de patógenos (PRRs). DC: células dendríticas. (Tomada de van der Poll et al. Nature Review 2017).

En la sepsis esta respuesta se caracteriza por una inflamación excesiva seguida de una supresión inmune. La supresión inmune implica tanto el sistema inmune adaptativo como el innato. La inflamación excesiva mediada, al menos en parte, por la liberación de mediadores proinflamatorios, múltiples tipos de células, la activación del sistema de coagulación, el sistema del complemento y

el endotelio vascular produce una lesión celular que dará como resultado la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, también conocidos como alarminas). Estos DAMPs pueden también activar las PRRs, dando lugar a un círculo vicioso que involucra la activación inmune sostenida y la disfunción orgánica (Chan J, *JCI* 2012 y Deutschman C, *Immunity* 2014) (Figura 3).

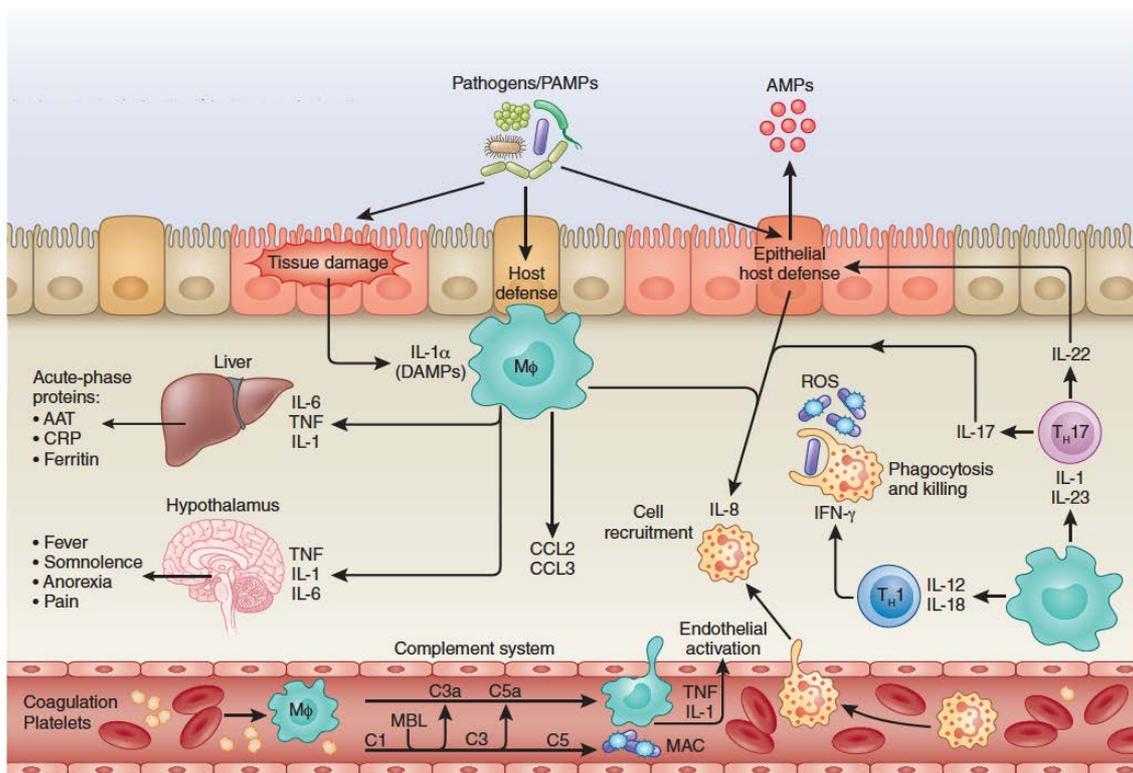


Figura 3: Mecanismos inmunológicos inductores de la inflamación en las primeras etapas de la infección. (Tomada de Netea MG, et al. *Nature Immunology* 2017). AAT: alfa 1 antitripsina; AMPs: péptidos antimicrobianos; CC: Quimiocina (C-C motif) ligando (CCL); CRP: proteína C-reactiva; DAMP: patrones moleculares asociados al daño; IFN-γ: interferon-γ; Mφ: macrófagos o monocitos; MAC: complejo de ataque a la membrana; MBL: lectina de unión a manosa; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos, ROS: especies reactivas de oxígeno; TNF: factor de necrosis tumoral.

Debido al reconocimiento rápido y la mejor atención terapéutica y de apoyo, muchos pacientes con sepsis sobreviven durante los primeros días después de la admisión en la UCI, pero parte de ellos pueden desarrollar una enfermedad crítica crónica que se ha denominado inflamación persistente, inmunosupresión

y síndrome de catabolismo (PICS) (*Gentile LF, JTACS 2012*).

La sepsis se inicia mediante la puesta en marcha del sistema inmune innato mediado por la activación de PRR por parte de PAMPs y DAMPs. Los PRRs interactúan con diversos PAMPs y DAMPs, y esta diversidad probablemente pueda explicar la similitud entre las reacciones inflamatorias inducidas por diferentes patógenos y las provocadas por diferentes tipos de daño tisular (*Chan J, JCI 2012 y Deutschman C, Immunity 2014*). La translocación del factor nuclear κ B (NF κ B) en el núcleo y la posterior activación de los genes diana, incluidos los que codifican citoquinas, son decisivos para la inducción de la inflamación. Algunas citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1 β (IL1 β), interleucina 6 (IL 6), interleucina 12 (IL12) e interleucina 18 (IL18), entre otros, están implicadas en la patogénesis de la sepsis. La mortalidad temprana en la sepsis, que generalmente se debe al colapso cardiovascular y la disfunción multiorgánica, probablemente esté impulsada predominantemente por reacciones inflamatorias excesivas.

Las respuestas inflamatorias de la sepsis incluyen (Figura 4):

- **Activación del sistema del complemento.** La activación del complemento da como resultado la liberación de pequeños fragmentos conocidos como anafilatoxinas (C3a y C5a) que tienen potentes efectos proinflamatorios (*Merle N, Front Immunol 2015*). La activación descontrolada del complemento puede causar daño tisular y fallo orgánico
- **Sistema de coagulación.** Se produce un estado procoagulante neto en la microvasculatura que promueve la deposición de fibrina mediante

varios mecanismos y una activación del sistema de la coagulación que da como resultado la coagulación intravascular diseminada, ésta clínicamente puede asociarse con trombosis microvascular y hemorragia (debida al consumo de factores de coagulación y plaquetas). El factor tisular es el principal impulsor de la activación de la coagulación en la sepsis (*Levi M, Thromb Res 2016*). La tendencia a la trombosis durante la sepsis se ve aumentada por la actividad comprometida de las tres vías principales anticoagulantes: la antitrombina, el inhibidor de la vía del factor tisular y el sistema de la proteína C (*Levi M Thromb Res 2016*). La inflamación vascular y la coagulación están aumentadas por la liberación de las llamadas interleucinas 12 (IL12). Los neutrófilos pueden capturar y matar microorganismos a través de la producción de estructuras extracelulares compuestas de ADN y proteínas antimicrobianas denominadas neutrophil extracellular traps (NETs, «trampas extracelulares de neutrófilos»). La formación abundante de estas trampas (*Sorensen O, J Clin Invest 2016*) al unirse con proteínas tales como fibrinógeno, fibronectina y factor von Willebrand, facilitan la agregación de plaquetas y eritrocitos, contribuyendo al daño tisular y la trombosis.

- **Endotelio vascular.** La alteración de la integridad de la barrera endotelial es un fenómeno clave en la patogénesis de la sepsis. En condiciones normales de equilibrio, la función de la barrera endotelial se mantiene mediante el citoesqueleto celular, el glicocalix, las moléculas de adhesión intercelular y otras proteínas de soporte (*Opal S, J Int Medi*

2015). En respuesta a la infección localizada, los leucocitos y las plaquetas se adhieren a la superficie endotelial y migran a los sitios donde las bacterias se multiplican. En la sepsis, la inflamación exagerada aumenta estos procesos, lo que contribuye a la incompetencia de la barrera endotelial. La pérdida de la integridad de la barrera provoca la fuga de proteínas intravasculares y plasma hacia el espacio extravascular, produciendo el edema tisular y provocando una perfusión microvascular reducida.

La prevención de la hemorragia y el mantenimiento de la integridad vascular están mediados por las plaquetas, que se adhieren y agregan en los sitios de lesión del vaso, y por la activación del sistema de coagulación. Los bajos recuentos de plaquetas se asocian independientemente con la mortalidad en pacientes con sepsis (*Claushuis T, Blood 2016*).

La sepsis se asocia con inmunosupresión caracterizada por agotamiento de los linfocitos y la reprogramación de las células presentadoras de antígeno (Figura 2c). Involucra tanto al sistema inmunitario innato como al adaptativo

- El agotamiento de los linfocitos T asociado al aumento de la apoptosis conlleva una fuerte disminución de las células T CD4 + y CD8 + (disminución de la función citotóxica), las células B y las células dendríticas (CD) (*Hotchkiss RS, Nat Rev Immunol 2013* y *Boomer J, JAMA 2011*). Los pacientes con sepsis muestran una supresión de las células CD4 + T helper 1 (TH1), células Th2 y función celular Th17 (*Hotchkiss R Nat Rev Immunol 2013*).
- La reprogramación de las células presentadoras de antígenos conduce

a una menor expresión de HLA-DR y a una capacidad disminuida para producir citoquinas proinflamatorias por los monocitos y macrófagos [un escenario que también se conoce como "parálisis" o "tolerancia al lipopolisacárido". (LPS)].

- Las células dendríticas liberan mayores cantidades de IL10 durante la sepsis (*Pastille E, J Immunol 2011*).
- Los neutrófilos que contribuyen inicialmente a la inflamación inducida por la sepsis presentan en esta fase características disfuncionales que deterioran sus capacidades antimicrobianas.
- Los hallazgos clave en la sepsis son la apoptosis tardía de los neutrófilos y la aparición de neutrófilos inmaduros en forma de bandas en la sangre periférica que tienen deficiencias en las funciones efectoras antimicrobianas, incluida la capacidad oxidativa. Los pacientes con sepsis tienen un mayor número de células mieloides inmaduras que pueden impedir las respuestas inmunes, particularmente la función de las células T.

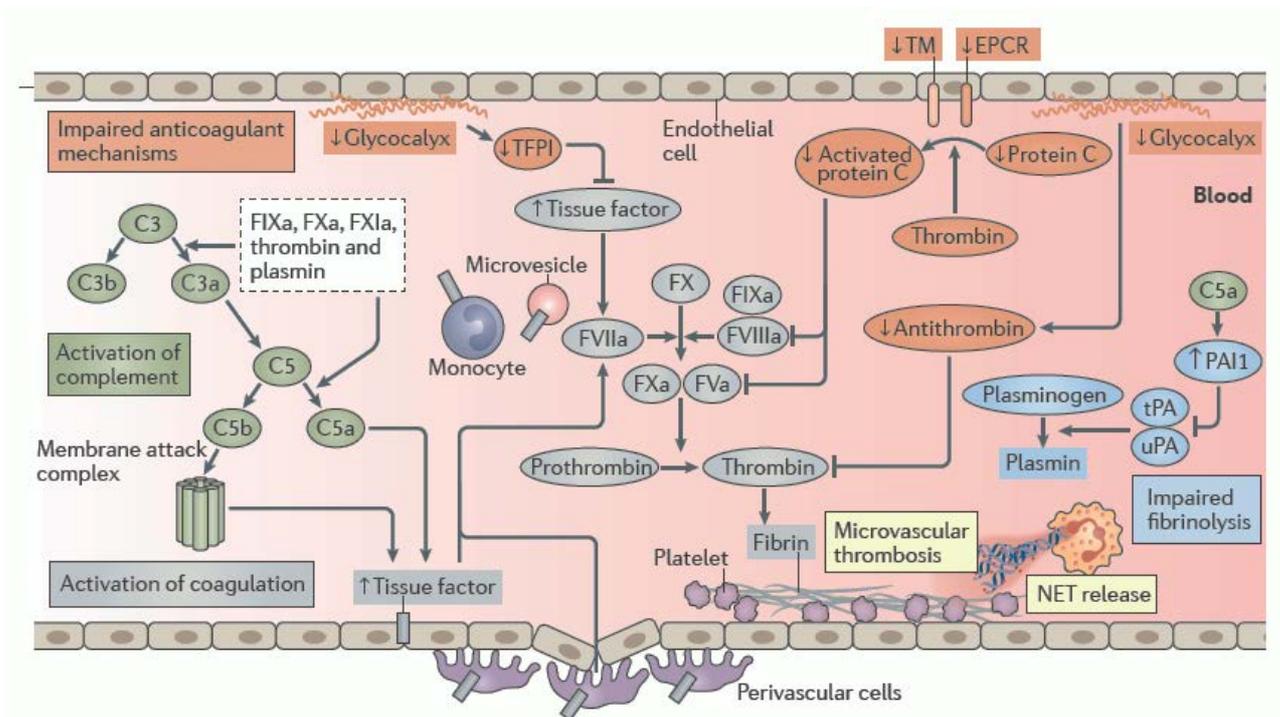


Figura 4. Activación de los sistemas de coagulación y complemento durante la sepsis. La sepsis va a producir un estado procoagulante en la microvasculatura que ocasiona la deposición de fibrina mediante al menos tres mecanismos: generación de trombina mediada por factor tisular (gris), mecanismos anticoagulantes endógenos disfuncionales (naranja) y eliminación de fibrina alterada debido a la supresión del sistema fibrinolítico (azul).
 TM: trombomodulina; EPCR receptor endotelial de la proteína C; TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular; TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular. PAI1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1; NET: trampas extracelulares de neutrófilos.
 (Tomada de *Van der Polli et al. Nature Review Immunology 2017*).

Cabe destacar que, aunque la infección es el evento desencadenante de la sepsis, la respuesta inmune aberrante, a menudo, permanece incluso después del tratamiento exitoso de la misma.

Durante muchos años, la respuesta inflamatoria desproporcionada a la infección se consideró fundamental para la patogénesis de la sepsis, pero en la actualidad parece que toma relevancia la respuesta del huésped, la cual se altera de una forma mucho más compleja, involucrando tanto una inflamación excesiva sostenida como una supresión inmune, y una dificultad para regresar a la

homeostasis. Se puede argumentar que durante la sepsis no hay solamente un aumento de la inflamación y/o supresión inmune, sino también una reorganización fundamental de los procesos celulares inmunes y metabólicos, y que las medidas de inflamación y supresión son un reflejo de esta reprogramación celular aguda (*van der Poll T, Nat Rev Immunol 2017*).

1.5. CLÍNICA

La presentación clínica de la sepsis en recién nacidos y niños puede ser sutil y difícil de identificar. La sepsis pediátrica se define actualmente como la tríada de fiebre, taquicardia y vasodilatación, además de un cambio en el estado mental o un relleno capilar prolongado de más de 2 segundos.

1.5.1. CLASIFICACIÓN CLÍNICA

En pediatría la sepsis se sigue clasificando en síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave y shock séptico (*Goldstein B, Pediatr Crit Care Med 2005*).

SIRS

Se define como SIRS la presencia de al menos dos de los siguientes cuatro criterios, *uno de ellos debe ser obligatoriamente, a diferencia del SIRS del adulto, la temperatura anormal o el recuento alterado de leucocitos:*

- Temperatura central mayor de 38.5 ° C o menor de 36 ° C.
- Taquicardia, definida como una frecuencia cardíaca mayor de 2 desviaciones estándar (SD) por encima de lo normal para la edad en ausencia

de estímulo externo, fármacos o estímulos dolorosos. Para niños menores de 1 año, bradicardia, definida como una frecuencia cardíaca menor al Percentil 10 para la edad en ausencia de estímulo vagal externo, fármacos betabloqueantes o cardiopatía congénita.

- Frecuencia respiratoria media mayor de 2 DS por encima de lo normal para la edad o ventilación mecánica por un proceso agudo no relacionado con la enfermedad subyacente o anestesia general.

- Recuento de leucocitos elevado o disminuido para la edad (no secundario a leucopenia inducida por la quimioterapia) o más del 10% de neutrófilos inmaduros.

Sepsis

SIRS en la presencia o como resultado de una infección sospechada o comprobada.

Sepsis grave

Sepsis más uno de los siguientes: disfunción de órganos cardiovascular o síndrome de dificultad respiratoria aguda o dos o más disfunciones de órganos diferentes. (Tabla 4)

Shock séptico

El shock séptico pediátrico se define como una sepsis con disfunción cardiovascular a pesar de la administración de líquidos isotónicos intravenoso \geq 40 ml/kg en la primera hora. (*Goldstein B, Pediatr Crit Care Med 2005*).

Tabla 4. Criterios de disfunción de órganos

Disfunción cardiovascular

A pesar de la administración de un bolo de fluido intravenoso isotónico > 40 ml / kg en 1 hora

- Disminución de la TA (hipotensión) < percentil 5 para la edad o TA sistólica: 2 DE por debajo de lo normal para la edad

o

- Necesidad de un fármaco vasoactivo para mantener la TA en un rango normal (dopamina > 5 µg / kg / min o dobutamina, epinefrina o norepinefrina en cualquier dosis)

o

- Dos de los siguientes

Acidosis metabólica inexplicable: déficit de base > 5.0 mEq/L

Aumento del lactato arterial > 2 veces del límite superior de la normalidad

Oliguria: producción de orina < 0.5 mL/kg/hora

Relleno capilar prolongado > 5 segundos

Gradiente T° central/periférica > 3°C

Respiratorio

- $P_{aO_2}/F_{IO_2} < 300$ mmHg en ausencia de cardiopatía cianógena o enfermedad pulmonar preexistente

o

- $P_{aCO_2} > 65$ torr o 20 mm Hg sobre el basal de $PaCO_2$

o

- Necesidad comprobada > 50% de F_{IO_2} para mantener la saturación > 92%

o

- Necesidad de ventilación mecánica invasiva o no invasiva

Neurológico

- Puntuación Glasgow Coma < 11

o

- Cambio agudo en el estado mental con una disminución en la puntuación del coma de Glasgow ≥ 3 puntos sobre el basal

Hematológico

- Recuento de plaquetas: 80,000 / mm^3 o una disminución del 50% en el número de plaquetas desde el valor más alto registrado en los últimos 3 días (para pacientes de hematología / oncología)

o

- Ratio internacional normalizado > 2

Renal

- Creatinina sérica: 2 veces el límite superior de lo normal para la edad o el aumento de 2 veces en la creatinina de referencia

Hepático

- Bilirrubina total: 4 mg / dl (no aplicable para recién nacidos)
-
- GPT 2 veces el límite superior de lo normal

TA: Tensión arterial; GPT: Alanina transaminasa; P_{aO₂}: Presión arterial de oxígeno; F_{IO₂} : Fracción inspiratoria de oxígeno; P_{aCO₂} : Presión arterial de anhídrido carbónico. (Goldstein B, PCCM 2005)

La definición del shock séptico en pediatría es bastante problemática (Goldstein B, *Pediatr Crit Care Med* 2005). El shock séptico en pediatría se asocia con la presencia de taquicardia (Tabla 5) y signos de disminución de la perfusión, tales como disminución de los pulsos periféricos, estado mental alterado, relleno capilar mayor de 2 segundos, extremidades moteadas y/o disminución de la producción de orina. La hipotensión es un signo tardío y adverso en los niños con shock séptico (de Souza Shock 2017 y Carcillo JA, *CCM* 2002).

Tabla 5. Variables clínicas en función de la edad.

Grupo de edad	Taquicardia (lpm)	Bradicardia (lpm)	F respiratoria (rpm)	Leucocitos (x 10 ³ /mm)	TAS (mmHg)
0 días a 1 semana	> 180	< 100	> 50	> 34	< 65
1 semana a 1 mes	> 180	< 100	> 40	> 19,5 o < 5	< 75
1 mes a 1 año	> 180	< 90	> 34	> 17,5 o < 5	< 100
2-5 años	> 140	NA	> 22	> 15,5 o < 5	< 94
6-12 años	> 130	NA	> 18	> 13,5 o < 5	< 105
13-18 años	> 110	NA	> 14	> 11 oo < 4,5	< 117

A nivel clínico varias diferencias clave distinguen el shock séptico pediátrico del shock séptico del adulto (Tabla 6) (Goldstein B, *Pediatr Crit Care Med* 2005).

Tabla 6. Diferencias entre la sepsis en edad pediátrica y adulta

	Sepsis pediátrica	Sepsis adultos
Etiología	Depende de la edad, neonato vs paciente pediátrico. Más frecuente: Neumonía, diarrea, meningitis, virus	Más frecuente: infección respiratoria, abdominal y genitourinaria

VVS = variación del volumen sistólico; PVC = presión venosa central.

Primero, la respuesta hemodinámica en pediatría puede ser diferente según la edad. En el neonato, el reconocimiento y el tratamiento precoz del shock séptico pueden complicarse por la transición de la circulación fetal. El aumento de la resistencia pulmonar y el bajo flujo sanguíneo pulmonar pueden alterar el intercambio adecuado de gases, lo que produce hipoxemia. La acidosis y la hipoxemia aumentan el tono vascular pulmonar desarrollando hipertensión pulmonar, aumento de la postcarga del ventrículo derecho e insuficiencia cardíaca. El tratamiento con óxido nítrico inhalado, oxígeno e inhibidores de la fosfodiesterasa III puede requerirse desde el principio del tratamiento.

Por el contrario, no hay papel para estos tratamientos en adultos, y de hecho, el óxido nítrico puede contribuir a la hipotensión y al fallo orgánico múltiple (Trzeciak S, CCM 2014).

En segundo lugar, los adultos con sepsis generalmente presentan un shock "caliente" con disminución de la resistencia vascular sistémica (vasoplejía),

hipotensión y taquicardia, responden peor que los niños a la expansión de volumen y su mortalidad es más elevada. Presentan una disminución del gasto cardiaco que compensan con un aumento de la frecuencia cardiaca y una dilatación ventricular. (*Carcillo JA, CCM 2002*)

Los niños, hasta en un 50% de ellos, se presentan con un shock "frío", caracterizado por resistencia vascular sistémica elevada, reserva cardiaca limitada y relleno capilar lento. El "shock séptico pediátrico" suele asociarse con hipovolemia grave, y los niños con frecuencia responden bien a la reanimación con volumen agresivo. Los niños tienen una reserva cardíaca limitada y es posible que hemodinámicamente no se beneficien de la misma manera que los adultos por el aumento de la frecuencia cardiaca. Sus frecuencias en reposo son comparativamente altas y la taquicardia puede dificultar un llenado diastólico adecuado. Por lo tanto, los niños responden a la disminución del gasto cardíaco con vasoconstricción. La hipotensión es un signo tardío ominoso del shock.

1.6. DIAGNÓSTICO

No hay dudas acerca de que el diagnóstico rápido y seguro mejora el pronóstico de la sepsis. La realización de un diagnóstico rápido continúa siendo un desafío para la investigación. Existen diferentes escalas de gravedad (*Schlapbach LJ, Intensive Care Med 2017*). El riesgo pediátrico de mortalidad (PRISM) y el índice de mortalidad pediátrica (PIM) se utilizan para predecir la gravedad general de la enfermedad y el riesgo de mortalidad. La puntuación de la Disfunción Orgánica Logística Pediátrica (PELOD) estima el riesgo de síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) (*Lacroix J, PCCM 2005*).

Las escalas de identificación de síntomas tales como el SIRS, SOFA, qSOFA van más dirigidas a pronosticar resultados que a solucionar el problema diagnóstico.

Actualmente el diagnóstico de sepsis se establece por la sospecha clínica de infección en un niño que presenta los signos previamente mencionados en el apartado anterior y por la confirmación microbiológica de la misma. El laboratorio puede apoyar en la sospecha diagnóstica mediante la medición de proteínas de fase aguda (PCR y PCT), marcadores que se han demostrado poco específicos para el diagnóstico de infección.

Durante mucho tiempo los cultivos han sido el único medio fiable para diagnosticar sepsis y todavía se considera el *gold standard* para identificar gérmenes de medios estériles. El problema es que se necesitan entre 6 horas y 5 días para detectar los gérmenes y otras 24-48 horas para testar la sensibilidad a los antibióticos. Peor aún es que en menos del 60% de los pacientes ingresados con el diagnóstico de sepsis se confirma la infección por este medio (Klein Kloubenberg PM, Crit Care 2015). Sin contar con las dificultades añadidas de los resultados falsos que se producen debido al inicio previo de antibióticos o la contaminación por no emplear una adecuada desinfección.

1.6.1 MARCADORES DE INFECCIÓN

Debido a las limitaciones anteriormente mencionadas para el diagnóstico durante los últimos años se han intentado desarrollar biomarcadores en suero que faciliten el diagnóstico.

Se han evaluado aproximadamente 200 biomarcadores como marcadores de diagnóstico y pronóstico de la sepsis, ninguno de ellos se usa de forma rutinaria en la práctica clínica, y pocos de estos biomarcadores se han utilizado para la selección de pacientes para ciertos tratamientos o para el seguimiento de estos (Pierrakos C, *Crit Care* 2010). Se prevé que los estudios en biomarcadores que reflejen la actividad de una vía inmunológica orientable serán de suma importancia.

Los más utilizados hasta ahora han sido la PCR, la PCT, la presepsina, Interleucina 6 (IL 6), proteína de unión al lipopolisacárido (LBP), receptor soluble de las células mieloides (sTREM-1) entre otros. Ninguno de ellos cumple los ideales de un buen biomarcador. Los más utilizados son la procalcitonina, PCR y presepsina. Siendo la PCT y la presepsina los más valorados ya que además de servir de marcadores diagnósticos sirven para guiar la duración del tratamiento antibiótico. (Bartoletti M, *Clin Chem Lab Med* 2018).

Se han estudiado diversos biomarcadores de sepsis en la población pediátrica para predecir el riesgo y los resultados. El estudio del Modelo de Riesgo de Biomarcadores de Sepsis Pediátrica (PERSEVERE) desarrollado por Wong y cols. (Wong HR, *Crit Care* 2012) utiliza una combinación de cinco biomarcadores séricos diferentes para proporcionar un mecanismo de estratificación del riesgo con respecto a la mortalidad y la gravedad de la enfermedad. Estos marcadores seleccionados de una muestra inicial de 12 son

C-C quimiocina ligando 3 (CCL3), proteína de choque térmico 70 kDa 1B (HSPA1B), interleucina 8 (IL8), elastasa del neutrófilo 2 (ELA2) y lipocalina 2 (LCN2).

La medición seriada del lactato no es tan determinante en pediatría como en el adulto. Si se ha visto que una elevación del lactato en urgencias se asocia con una mayor probabilidad de ingreso a la UCIP, de soporte vasoactivo y de disfunción orgánica (*Miescier MJ, Ped Emerg Care 2017, Scott HF, Acad Emerg Med 2012 y Gorgis N, Ped Emerg Care 2017*). Otros estudios han demostrado que las concentraciones elevadas de lactato al ingreso hospitalario se asocian con una mayor mortalidad (*Bai Z, BMC Pediatr 2014, Schlapbach LJ, ICM 2017 y Kim YA, ICM 2013*).

1.7. TRATAMIENTO

La base principal del tratamiento de la sepsis y el shock séptico se centra en el reconocimiento e inicio temprano del mismo. El tiempo es crítico y el tratamiento debe iniciarse rápidamente, en los niños con shock séptico preferentemente antes de que presenten hipotensión.

Las últimas guías de la ACCM/PALS 2014 han propuesto un conjunto de medidas para ayudar al reconocimiento y manejo temprano de pacientes con sepsis pediátrica. Estos incluyen medidas de reconocimiento, resucitación, estabilización y tratamiento por separado.

El conjunto de medidas de *reconocimiento* se centra en herramientas para la identificación rápida de la sepsis. El de *resucitación* propone el establecimiento de un acceso intravenoso rápido para poder iniciar la administración de

antibióticos e inicio de inotropos en casos de shock refractario a fluidos. Dentro del paquete de *estabilización* los objetivos son la monitorización, tratamientos dirigidos y control de la fuente de infección. Finalmente, el de *actuación* sugiere el uso de acciones de mejora de la calidad en el cumplimiento de las guías e identificación de las barreras para su cumplimiento (Davis AL, CCM 2017).

Sin embargo, en adultos hay varias reservas acerca de que las recomendaciones no admitan cambios de las guías basadas en los nuevos hallazgos científicos y no permitan el uso del juicio del médico cuando sea necesario desviarse de los protocolos. La IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) no avala las guías actuales 2016 de la *Surviving Sepsis Campaigne* (IDSA Sepsis Task Force, *Clin Infect Dis* 2018). Se necesitan más estudios para centrarse en las implicaciones de las políticas de salud en lo que se refiere a tales directrices (Hershey TB, *NEJM* 2017).

En los EE. UU. desde el 2007 se han venido realizando una serie de medidas para la mejora en la identificación y tratamiento precoz de la sepsis, fundamentalmente en la primera hora. Dichas medidas (administración de líquidos, antibióticos, agentes vasoactivos) han confirmado una disminución en la mortalidad, así como, en la estancia en UCIP y hospitalaria (Davis AL, CCM 2017).

Se recomienda el inicio de los antibióticos dentro de la primera hora de la presentación clínica (Davis AL, CCM 2017), ya que su retraso, así como la presencia de hipotensión se asocian con una mayor mortalidad (Weiss SL, CCM 2014, Funk DJ, *CCClin* 2011, Kumar A, CCM 2006). La elección de la antibioterapia empírica (Aneja RK, *Curr Infect Dis Rep* 2011) requiere del conocimiento de los

factores de riesgo individuales del paciente (edad), estado de inmunización, exposición previa a antibióticos, historial de infecciones previas o colonización potencial e historia previa de organismos multirresistentes. Además, es imperativo conocer la prevalencia de diferentes organismos dentro de la comunidad y cualquier resistencia asociada a antibióticos. Ciertas situaciones, dado su estado de inmunosupresión, como trasplante de órganos sólidos, trasplante de progenitores hematopoyéticos y pacientes oncológicos tienen un riesgo mayor a padecer infecciones graves.

El retraso en la administración de líquidos de hasta 30 minutos o la administración insuficiente, se asocia con un mayor riesgo de mortalidad en los niños mayores de 2 años (*Oliveira CF, Ped Emerg Care 2008*). Las pautas del Colegio Americano de Medicina Crítica / Soporte Vital Avanzado Pediátrico (ACCM / PALS) recomiendan la reposición de fluidos de hasta 40-60 ml / kg en la primera hora para revertir el shock, siempre que no haya signos clínicos de sobrecarga de líquidos (*Davis AL, CCM 2017*) (Figura 5).

En el caso de que no haya una respuesta a fluidos se recomienda iniciar vasopresores. La literatura actual apoya el uso de dopamina y otros vasopresores como noradrenalina por vía periférica hasta obtener una vía central (*Turner DA, Pediatr Emerg Care 2010*). En los niños, la situación hemodinámica puede variar en poco tiempo y saltar de una situación de vasodilatación a vasoconstricción y viceversa, por lo tanto, hay que estar atento a estos cambios y modificar el tratamiento según el patrón que presenten en cada momento. En la situación de shock caliente, habitual en adultos, el vasopresor indicado es la noradrenalina. La adrenalina se emplea como inovasopresor de inicio y en el

shock frío (*Davis AL, CCM 2017*), actualmente ha desplazado a la dopamina como inovasopresor inicial. Un ensayo aleatorizado reciente ha demostrado que el uso de dopamina se asocia con una mayor mortalidad en comparación con la adrenalina (*Ventura AM, CCM 2015, Davis AL, CCM 2017*). El uso de vasopresina o terlipresina en el shock refractario parece que no ofrece ningún beneficio sobre la mortalidad (*Masarwa R, Crit Care 2017*). Se ha observado que el shock pediátrico resistente a inovasopresores puede asociarse a estados de insuficiencia suprarrenal relativa (*Sarathi M, PCCM 2007 y Pizarro CF, CCM 2005*). La administración de hidrocortisona en estos casos se incluye en el algoritmo ACCM/PALS y en la *Surviving Sepsis Campaign* (*Dellinger RP, Intensive Care Med 2013 y Davis AL, CCM 2017*). Sin embargo, hay estudios que sugieren que la administración de hidrocortisona no se asocia con mejores resultados (*Atkinson SJ, Plos One 2014, Menon K, PCCM 2013 y Zimmerman JJ, PCCM 2011*). Los pacientes que suelen recibir hidrocortisona tienen un grado mayor de gravedad de la enfermedad y, por lo tanto, tienen peores resultados y tasas de mortalidad más altas (*Atkinson SJ Plos One 2014 y Nichols B, PCCM 2017*).

En el contexto de un shock séptico refractario, la ACCM/PALS recomienda el soporte con oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) (*Davis AL, CCM 2017*). La mortalidad en estos casos se estima alrededor del 50 % (*Ruth A, Crit Care 2015*).

El algoritmo desarrollado por la ACCM/PALS pretende fundamentalmente establecer una serie de medidas a aplicar en los primeros 60 minutos con el objetivo de revertir rápidamente los síntomas producidos por la sepsis.

Los pacientes tratados dentro de las recomendaciones del algoritmo (*Algoritmo de la American College of Critical Care Medicine para el tratamiento de la sepsis por objetivos en lactantes y niños, Davis AL, CCM 2017*) tienen una menor duración de la estancia y mortalidad. Algunos autores han constatado dificultades en conseguir el reconocimiento precoz de la sepsis e implementar las guías de tratamiento (*Paul R, Pediatrics 2012, Kessler DO, J Emerg Med 2016 y Thompson GC, J Emerg Med 2015*).

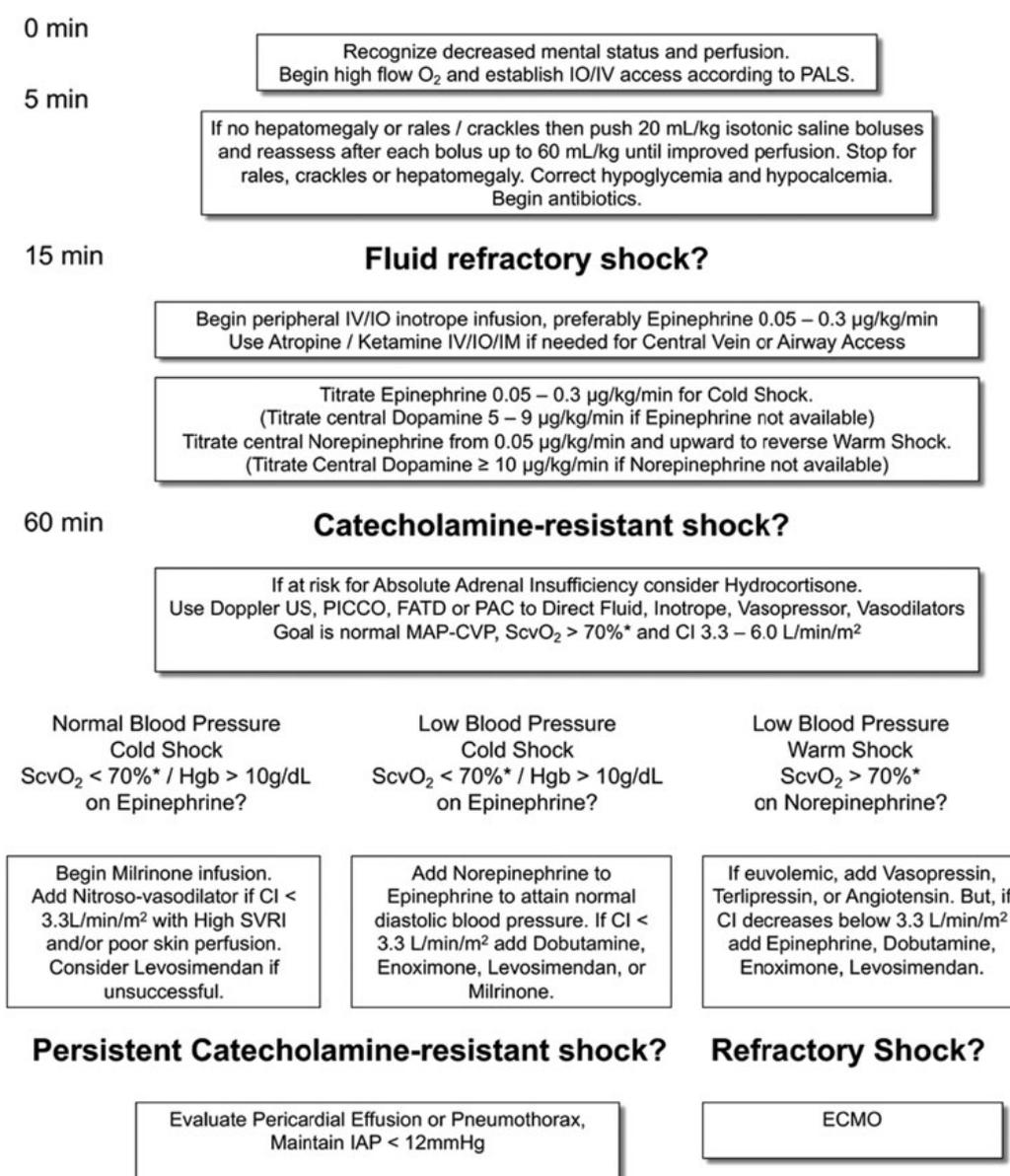


Figura 5. Algoritmo del Colegio Americano de Medicina Crítica para el tratamiento de la sepsis por objetivos en lactantes y niños.

Davis AL, et al. American College of Critical Care Medicine Clinical Practice Parameters for Hemodynamic Support of Pediatric and Neonatal Septic Shock. Crit Care Med 2017

La implementación de las herramientas de triaje basadas en criterios clínicos específicos para la edad en las urgencias pediátricas, facilitarían la identificación temprana de la sepsis pediátrica. Dichos protocolos han demostrado un aumento en el cumplimiento de las pautas que da como resultado una administración inicial de fluidos más oportuna y una administración temprana de antibióticos (*Larsen GY, Pediatrics 2011, Cruz AT, Pediatrics 2011 y Lane RD, Pediatrics 2016*). Del mismo modo, la implementación de guías diagnósticas de sepsis pediátricas se ha desarrollado para pacientes hospitalizados en las plantas médicas y quirúrgicas con el fin de facilitar la identificación y evaluación temprana de posibles pacientes sépticos (*Bradshaw C, Pediatrics 2016*).

La necesidad de reconocimiento temprano e inicio rápido del tratamiento está bien documentada para pacientes adultos y pediátricos. Las tasas de mortalidad por sepsis en adultos se reducen significativamente cuando se completa la reanimación y la administración de antibióticos en 90 minutos en lugar de 3 horas (*Sebat F, CCM 2007 y Rivers E, NEJM 2001*). Del mismo modo, en pediatría, cada hora que transcurre sin reanimación adecuada, aumenta la mortalidad en un 40% (*Oliveira CF, Intensive Care Med 2008 y Weiss SL, Crit Care Med 2014*). Los niños con relleno capilar prolongado o hipotensión experimentan una mortalidad del 5-7% y la mortalidad aumenta al 30% cuando ambos están presentes (*Carcillo JA, Pediatrics 2009*). Si el estado de shock puede revertirse en el servicio de urgencias, la mortalidad se reduce al doble, mientras que la terapia temprana dirigida a objetivos durante las primeras 72 horas ha reducido la mortalidad en niños del 40% al 12% (*de Oliveira CF, Intensive Care Med 2008*).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La sepsis constituye un problema grave de salud en todo el mundo ya que se asocia con una elevada morbilidad y mortalidad. Como el infarto o el ictus, se considera una enfermedad tiempo dependiente ya que su retraso en el diagnóstico y por lo tanto en el inicio del tratamiento condiciona un peor pronóstico. La instauración precoz de un tratamiento antibiótico y un soporte hemodinámico adecuado mejoran significativamente su pronóstico (*Seymour CW NEJM 2017*).

Actualmente para llegar a un diagnóstico fiable recurrimos a las pruebas de Microbiología. El problema que tiene esta práctica es que se necesita un tiempo para poder facilitar los resultados y que además se pueden modificar por la toma previa de antibióticos. Por ello se hace necesario disponer de otras herramientas tales como biomarcadores, solos o en combinación con marcadores clínicos, para la toma de decisiones. (*Oliveira CF, Pediatr Emerg Care 2008*).

Entendemos como biomarcador a una molécula medible en una muestra biológica de forma objetiva, cuyos niveles permitan diferenciar entre el proceso normal y el patológico y además sirva para monitorizar la respuesta al tratamiento (*Biomarkers definition Working Group 2001, Pierrakos C, Crit Care 2010*). El biomarcador ideal debería tener la capacidad de establecer un diagnóstico precoz, incluso antes de que se manifiesten los signos graves de sepsis, lo cual facilitará el tratamiento precoz. Debería permitir la identificación de los pacientes graves y además monitorizar su evolución.

En los pacientes con sepsis hasta ahora se han utilizado entre otros, el lactato (como marcador de enfermedad y de evolución clínica), marcadores del

estado hiperinflamatorio tales como TNF, IL 1 β and IL 6, IL 8, IL 18, así como la proteína C reactiva proteína cuya síntesis en el hígado es estimulada por la IL-6. Esta última también estimula la producción de proteínas del complemento. Hacia 1990, los investigadores descubrieron que la Procalcitonina (PCT), precursor de la hormona calcitonina, estaba elevada en pacientes con infección bacteriana y a partir de entonces se propuso como biomarcador (*Karzai W, Infection 1997*).

En este momento los biomarcadores más utilizados son la PCR (proteína C reactiva) y la Procalcitonina (PCT). Los incrementos de PCR y PCT, fueron añadidos a la definición de sepsis del 2003. Hasta la fecha se han publicado numerosos estudios sobre diferentes biomarcadores en sepsis sin haber encontrado el biomarcador ideal. Pierrakos y cols analizaron un total de 178 biomarcadores en una revisión realizada en el año 2010 (*Pierrakos C, Crit Care 2010*). Tras su revisión concluyeron que ninguno de ellos tiene la suficiente especificidad o sensibilidad para emplearse de rutina en la práctica clínica.

2.2. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

El diagnóstico de sepsis se basa fundamentalmente en la clínica y en la interpretación de marcadores plasmáticos poco específicos. La PCR y la PCT, dos de los marcadores más utilizados en el laboratorio no han conseguido demostrar su valor diagnóstico debido a su falta de especificidad ya que se alteran en otras situaciones diferentes a la sepsis.

La importancia de un diagnóstico correcto es esencial para el manejo de la infección. Un retraso en su diagnóstico puede tener consecuencias irreversibles. El diagnóstico precoz facilita el tratamiento temprano y mejora el pronóstico de la enfermedad.

Por estos motivos se genera la necesidad de buscar biomarcadores no invasivos que permitan al clínico diferenciar cuando un paciente puede presentar una sepsis.

En este estudio, se propone la búsqueda de biomarcadores en pacientes pediátricos con sepsis, a través de la utilización de la proteómica en el suero, para identificar proteínas que puedan estar alteradas y que permitan realizar un diagnóstico más preciso y temprano de la sepsis.

La investigación en biomarcadores de naturaleza proteica en la sepsis pediátrica podría contribuir a mejorar el conocimiento de la fisiopatología de la sepsis a esta edad y aumentar las herramientas diagnósticas para el reconocimiento precoz de los pacientes con sepsis.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

El objetivo principal de esta tesis es la identificación de nuevos biomarcadores séricos de diagnóstico en pacientes pediátricos que permitan diagnosticar precozmente la sepsis.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Estudiar las características clínicas y analíticas de los pacientes diagnosticados de sepsis y shock séptico
2. Analizar el perfil proteómico sérico de pacientes diagnosticados de sepsis y shock séptico y controles sanos.
3. Determinar las diferencias en el perfil proteómico entre los pacientes sépticos y los controles.
4. Identificar posibles biomarcadores proteicos para el diagnóstico de sepsis.
5. Validar las proteínas seleccionadas en un grupo independiente de pacientes sépticos y controles mediante ELISA.

SUJETOS Y MÉTODO

3. SUJETOS Y MÉTODO

Estudio analítico observacional de casos y controles, realizado en el HUC (Hospital Universitario de Cruces, Bizkaia-España). Durante el periodo de marzo del 2013 a octubre del 2016 se estudiaron los pacientes ingresados en la UCIP con el diagnóstico de sepsis grave /shock séptico. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Euskadi y todos los participantes padres, tutores, pacientes o controles firmaron el consentimiento informado.

3.1. SUJETOS

3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes: se incluyeron en el estudio a los pacientes pediátricos (edad 1 mes a 16 años) diagnosticados de *sepsis grave*, definida como un SIRS secundario a un proceso infeccioso acompañado de disfunción de órganos (*Goldstein B, Pediatr Crit Care Med 2005*) y a los pacientes con *shock séptico* definido como sepsis con disfunción cardiovascular a pesar de la administración de líquidos.

Los diagnósticos de sepsis grave y shock séptico se adjudicaron de acuerdo con la Conferencia Consenso de sepsis pediátrica del 2002 (*Goldstein B, Pediatr Crit Care Med 2005*)

Controles: se incluyeron niños sanos, que precisaran analítica dentro de un estudio preoperatorio de una cirugía menor (hernia inguinal, etc.) o niños vistos en consultas sin enfermedad demostrada (talla baja familiar, etc.). No se recogió la muestra si en ese momento presentaban fiebre o una enfermedad aguda inflamatoria asociada.

3.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Transfusión reciente
- Pacientes con inmunodeficiencia primaria o secundaria a otras patologías (trasplante, pacientes oncológicos, etc.).

3.1.3 VARIABLES DE ESTUDIO

De cada paciente del estudio se recogieron las siguientes variables:

- Datos generales del paciente: edad, sexo, peso y procedencia del ingreso.
- Antecedentes personales: prematuridad, cardiopatía, etc.
- Evaluación inicial: hora de ingreso, foco de la sepsis y motivo de ingreso
- Disfunción de órganos: cardiovascular, respiratorio, neurológico, renal, hematológico y hepático.
- Analítica y constantes próximas a la extracción de la muestra (incluyendo entre otros PCR y PCT), citoquinas y proteínas
- Microbiología, cultivos
- Tratamiento antibiótico
- Tratamiento general: Fluidos, inovasopresores, ventilación mecánica, corticoides, insulina, terlipresina, concentrado de hematíes, ECMO.
- Resultados: días de ventilación mecánica, soporte vasoactivo, escala de gravedad (PRISM 3), días de estancia en UCIP y en el hospital, resultado en UCIP y en hospital.

3.2. MATERIALES Y METODO

3.2.1 OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN INICIAL DE LAS MUESTRAS EN UCIP

Los sueros de los pacientes fueron recogidos tras su sospecha diagnóstica en las primeras 12-24 horas del inicio del cuadro, preferentemente al ingreso.

Tanto la obtención como el procesamiento de las muestras se realizaron de acuerdo con un protocolo estandarizado.

La extracción de la muestra de sangre para el estudio de los pacientes sépticos se llevó a cabo en la UCIP, utilizándose la vía venosa periférica o central que se había conseguido para obtener la analítica general que se solicita en estos casos.

En los controles, la obtención de la muestra se realizó en el área de extracciones del hospital a través del mismo acceso venoso que se utilizó para la extracción de la analítica solicitada para su estudio preoperatorio.

Para la recogida de muestras se utilizaron tubos amarillos con gel separador. BD Vacutainer® SST™ II Advance Tubes. Plymouth PL6 7BP UK. (Ref. 367953 y 367955).

El volumen de muestra fue diferente en función del peso del niño:

- Para > 30 kg: Un tubo amarillo con gel separador de 8,5 ml
- Para < 30 kg: Un tubo amarillo con gel separador de 5 ml

- La sangre de los pacientes tras su extracción se conservó en nevera a 4°C, antes de su traslado al Biobanco. No se utilizó ninguna muestra de sangre que llevara más de 48 horas almacenada en estas condiciones.
- Se intentó en lo posible extraer la muestra antes de iniciar nuevos tratamientos en la Unidad (hora: 0). Si no fue posible, la muestra se recogió preferentemente durante las primeras 12-24 horas.

3.2.2. ENVÍO DE LA MUESTRA AL BIOBANCO

Una vez obtenidas las muestras se contactó con el Biobanco del Instituto de investigación de Biocruces Bizkaia para su envío. Si no era posible, la muestra se mantenía refrigerada a 4°C hasta su recogida por el personal del Biobanco. Se registró el tiempo de almacenamiento (Máximo 48 horas).

Una vez recibidas las muestras se registraron en su plataforma informática y se procesaron de forma inmediata para reducir al máximo el tiempo transcurrido desde la extracción hasta el almacenamiento definitivo.

3.2.3. OBTENCIÓN DE SUERO A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE

Los tubos Vacutainer® para obtención de suero se procesaron siguiendo el Protocolo normalizado de trabajo (PNT) de Biobanco:

- Centrifugar a 1300 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Alicuotar el suero obtenido en tubos de ensayo micronic (Wilmut: W051100) (volumen 500 µl).
- Congelación a -80° C.

3.3 METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE PROTEÓMICA EN LAS MUESTRAS

Para el estudio del proteoma se seleccionaron 10 pacientes diagnosticados de sepsis o shock séptico, 5 con sepsis producida por bacterias Gram + y 5 con sepsis desencadenada por bacterias Gram –, y 5 pacientes controles sanos. Los sueros de los pacientes fueron recogidos tras su sospecha diagnóstica en las primeras 12-24 horas del inicio del cuadro, preferentemente al ingreso.

El análisis del proteoma sérico debido a la dificultad para encontrar proteínas de baja abundancia requiere primero de la depleción de las proteínas séricas elevadas (albúmina e inmunoglobulina, entre otras) (Cao et al. 2014; Bréchet et al., 2015). Para ello se utilizó un kit específico que elimina las 12 proteínas más abundantes del suero del paciente (Thermo Scientific Pierce Top 12, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Anexo 3

Las muestras resultantes fueron posteriormente sometidas a una digestión siguiendo el protocolo FASP (Filter-aided sample preparation) descrito por Wisniewski et al. con modificaciones menores (Wisniewski et al., *Nat Methods* 2009). Es un método para generar péptidos a partir de mezclas de proteínas complejas antes del análisis de espectrometría de masas.

Se añadió tripsina en una relación tripsina: proteína de 1:10, y la mezcla se incubó durante un día a 37°C, se secó en un concentrador SpeedVac RVC2 25 (Christ) y se resuspendió en ácido fórmico (FA) al 0,1%.

Después de esto, se llevó a cabo la **cromatografía líquida** (LC) usando un NanoAcquity nano-HPLC (Waters), equipada con una nano-columna BEH C18 (200 mm x 75 μm , 1.8 μm Waters). Se utilizó una rampa cromatográfica de 120 min (5 a 60% de Acetonitrile, ACN) con un flujo de 300 nL/min. La fase móvil A era agua que contenía ácido fórmico al 0,1% v/v, mientras que la fase móvil B era ACN que contenía ácido fórmico al 0,1% v/v. Se cargaron 0,5 μg de cada muestra para cada ensayo.

El siguiente paso fue el análisis de **espectrometría de masas**. Los péptidos fueron eluidos (extracción mediante un líquido apropiado de una sustancia del medio sólido que la ha absorbido) directamente en el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL a través de una fuente capilar nano-Electrospray (Proxeon Biosystems), a 300 nL/min y usando un gradiente lineal de 120 minutos de acetonitrilo de 3 - 40%, seguido de un aumento al acetonitrilo al 40% para los siguiente 30 minutos. El espectrómetro de masas para la adquisición de datos permitió mediante el modo DDA (Automated Data Dependent Acquisition) cambiar automáticamente de MS a MS/MS. Se obtuvieron espectros de exploración de MS completa (m/z 400-2.000) en el Orbitrap con una resolución de 30.000 (a m/z 400).

Después de cada exploración, los seis iones más intensos por encima de 1.000 contajes obtenidos en la trampa iónica lineal se fragmentaron secuencialmente mediante **disociación inducida por colisión** (CID). Los precursores con estados de carga de +2 y +3 se seleccionaron específicamente para CID. De esta manera se obtuvo el “espectro de fragmentación” o espectro MS/MS.

Los espectros de fragmentación contienen la información acerca de la secuencia aminoacídica del péptido aislado. De este modo podemos identificar las proteínas, ya no solo a partir de datos de su masa sino también de datos de la secuencia con un alto nivel de confianza.

Los péptidos se excluyeron de un análisis adicional durante 60 segundos usando la característica de exclusión dinámica.

La **búsqueda en bases de datos** se realizó utilizando MASCOT 2.2.07 (Matrixscience, London, UK) frente a una base de datos UNIPROT - Swissprot llena sólo de entradas correspondientes a Homo sapiens (sin isoformas).

Para la identificación de proteínas se adoptaron los siguientes parámetros: carbamidometilación de cisteínas (C) como modificación fija y oxidación de metioninas (M) como modificaciones variables, 10 ppm de tolerancia de masa de péptidos, tolerancia de masa de fragmentos de 0,5 Da y hasta 2 puntos de escisión perdidos, cargas de péptidos de +2 y + 3.

Se empleó Prognesis LC-MS (versión 2.0.5556.29015, Nonlinear Dynamics) para el análisis de expresión de la proteína diferencial libre de etiqueta. Se utilizó una de las ejecuciones como la referencia a la que se alinearon las masas precursoras en todas las demás muestras. Sólo se seleccionaron las características que comprenden cargas de +2 y +3. Las abundancias crudas de cada característica se normalizaron automáticamente y fueron logaritmizadas contra la serie de referencia. Las muestras se agruparon de acuerdo con la comparación que se realizó, y se realizó un análisis de ANOVA. Una lista de picos que contenía la información de todas las opciones se

generó y exportó al motor de búsqueda Mascot (Matrix Science Ltd.). Este archivo fue buscado en una base de datos Uniprot / Swissprot bajo las condiciones indicadas en la sección anterior, y la lista de péptidos identificados fue importada de nuevo a Progénesis LC-MS.

La cuantificación de proteínas se realizó sobre la base de los tres péptidos no conflictivos más intensos (péptidos que se producen en una sola proteína), excepto para las proteínas con sólo dos péptidos no conflictivos. La importancia de los cambios de expresión se probó a nivel de proteína, y las proteínas identificadas con *al menos dos péptidos y un valor de ANOVA p menor de 0,05 y una proporción mayor a 2* en cualquier dirección se seleccionaron para análisis adicionales.

3.3.1. ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

Para la validación de las proteínas obtenidas se utilizó la técnica **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), en español “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”.

Esta técnica se utiliza para cuantificar e identificar determinadas moléculas (proteínas, hormonas, etc.) en distintos tipos de soluciones (sangre, orina, extractos de tejidos, cultivos celulares, etc.).

El estudio de ELISA se realizó en 37 sépticos y 21 controles (en la siguiente tabla están los pacientes y controles analizados por cada proteína):

PROTEÍNAS	SÉPTICOS (n)	CONTROLES (n)
SAA1	27	20
CFAB	29	19
LTF	29	21
sCD163	37	10
sCD25	37	10
LRG1	29	6

La Base para su realización es la siguiente:

La realización de estos ensayos tipo ELISA se basa en que la solución en la que se tiene la molécula problema a estudiar se inmoviliza en una placa de microtitulación de poliestireno y se detecta con otras moléculas específicas para esta molécula problema. La molécula problema se llama antígeno (Ag) y la molécula que la detecta sería el anticuerpo (Ac). Los Ac (monoclonales y policlonales) reconocen estructuras dentro del Ag.

Existen 4 tipos de ELISA. Los más utilizados son el indirecto y el tipo sandwich. En el estudio utilizamos el ELISA tipo sandwich, por ser más, específico y tener mayor sensibilidad.

Pasos del ELISA en Sandwich. Figura 6

1. La placa se sensibiliza con Ac que reconocen el Ag que se quiere detectar. Se utiliza el Ac a una dilución concreta en PBS (Phosphate Buffered Saline) y un pH determinado, dependiendo de las características de cada ELISA. Se incuban permitiendo la fijación del Ac a la placa.
2. Después se elimina el exceso del Ac y el sobrenadante mediante lavados con un tampón adecuado.

Estos 2 primeros pasos ya venían realizados en el método adquirido, USCN Life Science Inc.Houston (Anexo 4).

3. Se procede a bloquear los pocillos rellenando todos los huecos donde no hay Ac y evitar que cuando echemos nuestra muestra se produzcan uniones inespecíficas con otras moléculas no deseadas que pudieran interferir con el resultado. La solución de bloqueo es una proteína que no reacciona con los Ac ni con el resto de los reactivos del ensayo, generalmente se usa albumina sérica bovina. Se incuba el tiempo necesario para que se fije a los mismos.

4. Se elimina la solución de bloqueo y se procede a lavar con una solución adecuada.

A partir de este momento la placa está preparada para realizar el ELISA.

5. Se añade a la placa la muestra donde va el Ag problema y las muestras que se han preparado previamente para poder realizar nuestra curva estándar. La curva estándar se realiza con diluciones que se han hecho del Ag en cantidades conocidas. Se rellenan los pocillos por duplicado con los 2 tipos de muestras (Ag problema y muestras conocidas). El Ag que está presente en la muestra se une al Ac que está en la placa.

6. Se incuba. Se tira el exceso de muestra que no se ha unido al primer Ac.

7. Se añade el Ac secundario, en esta ocasión unido a un enzima, que se va a unir al Ag presente en las 2 muestras.

8. Se incuba permitiendo la unión del Ac secundario con la enzima a los inmunocomplejos previos (Ac primario-Ag)

9. Después de eliminar el Ac secundario y la enzima sobrante se realizan los lavados correspondientes y a continuación se añade el sustrato cromógeno que va a reaccionar con la enzima y que va a dar una intensidad de color en función de la cantidad de Ag que hay en la muestra.

Se incuba durante un tiempo que va a depender de la cantidad de antígeno que hay en las muestras hasta que se desarrolle el color de manera gradual en función de las concentraciones de Ag.

10. La última parte consiste en ver qué cantidad de proteína-Ag se tiene en cada una de las muestras. La intensidad del color se mide en un aparato (espectrofotómetro) a una determinada longitud de onda.

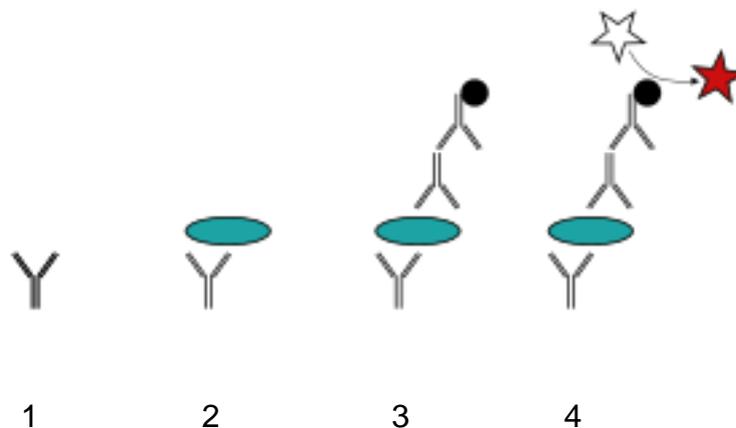
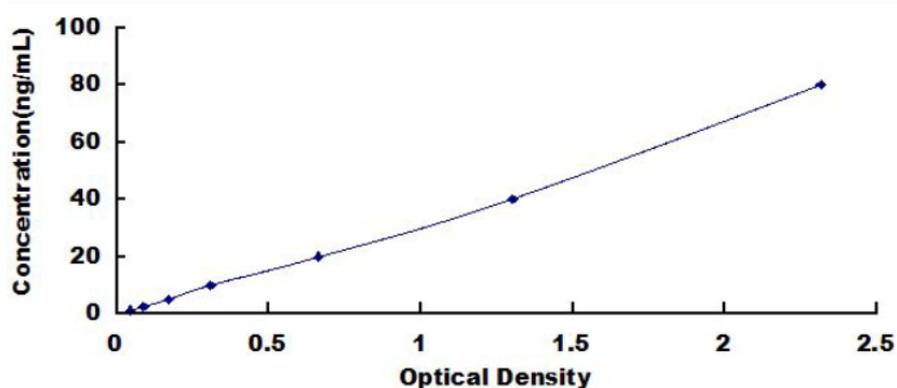


Figura 6. Representación del ELISA sandwich. (1) La placa se sensibiliza con un anticuerpo, (2) se añade la muestra y el antígeno problema se une al anticuerpo (3) Se añade el anticuerpo secundario, en esta ocasión unido a un enzima, que se une al antígeno (4) se añade el sustrato que reacciona con el enzima y da lugar al color.

Los resultados numéricos son medidas de absorbancia-densidad óptica que están relacionadas con intensidad de color, a mayor color mayor valor de densidad óptica, a menor intensidad de color menor valor de intensidad óptica lo que indica una menor concentración de Ag en la muestra. Después se genera

una curva estándar en la que se conocen las concentraciones del antígeno y se puede saber a cada densidad óptica la concentración de antígeno que le corresponde. Un ejemplo de esta curva lo vemos en la figura 7. Con la gráfica estándar que se ha preparado con las concentraciones de Ag conocidas podemos extrapolar los valores de absorbancia de nuestra muestra problema y conocer así el valor de concentración que le corresponde a cada punto.



Typical Standard Curve for CFB, Human ELISA.

Figura 7. Modelo curva estándar

Para la realización de los ELISAs seguimos las indicaciones del proveedor. (Cloud – Clone Corp.) Las referencias de las ELISAS son las siguientes:

- R&D Systems, Minneapolis, MN, USA para sCd25 y sCD163.
- USCN Life Science Inc. Houston, TX, USA para LRG1, LTF, CFAB y SAA1.

(Anexo 4)

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las variables demográficas, clínicas y del laboratorio se utilizó el programa SPSS 23 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) para Windows.

Se analizaron las siguientes variables:

- Datos generales del paciente: edad, sexo, peso y procedencia del ingreso.
- Antecedentes personales: prematuridad, cardiopatía, etc.
- Evaluación inicial: hora de ingreso, foco de la sepsis y motivo de ingreso
- Disfunción de órganos: cardiovascular, respiratorio, neurológico, renal, etc.
- Analítica y constantes próximas a la extracción de la muestra (incluyendo entre otros PCR y PCT), citoquinas y proteínas
- Microbiología, cultivos
- Tratamiento antibiótico
- Tratamiento general: Fluidos, ino vasopresores, ventilación mecánica, corticoides, insulina, terlipresina, concentrado de hematíes, ECMO.
- Resultados: días de ventilación mecánica, soporte vasoactivo, escala de gravedad (PRISM 3), días de estancia en UCIP y en el hospital, resultado en UCIP y en hospital.

Para el análisis descriptivo utilizamos la media, mediana, cuartiles y rangos, en función del tipo de distribución que presentara la variable. Para valorar la distribución que seguían las variables se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para valorar diferencias entre variables utilizamos test no paramétricos (U de Mann-Withney) en el caso de variables que no seguían una distribución normal y la t de Student para aquellas con distribución normal. Valores de $p < 0.05$ fueron aceptados como estadísticamente significativos.

Se realizaron correlaciones bivariadas de las proteínas con biomarcadores utilizados en la práctica clínica mediante la prueba de correlación de Pearson.

Por último, para evaluar la fuerza de las proteínas identificadas como test diagnósticos utilizamos el área bajo la curva ROC (AUROC) con su sensibilidad y especificidad, así como sus intervalos de confianza, determinando el punto de corte óptimo mediante el índice de Youden. La precisión de la prueba AUROCC se definió como: excelente (0.9 a 1.0); bueno / regular (0.7 a 0.9); pobre (0.6 a 0.7); y no es útil (<0,6). Así como su representación en el diagrama de cajas.

Para el análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas se utilizó la base de datos STRING. (STRING: functional protein association networks. <https://string-db.org/>).

La relación entre las proteínas comunes en los grupos estudiados se realizó mediante Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

El gráfico de la relación entre la significación estadística “p” y el fold change se hizo mediante Graphpad. Prism 8.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERISTICAS CLINICAS DEL GRUPO DE PACIENTES

SEPTICOS Y CONTROLES

Durante el periodo comprendido entre marzo del 2013 y octubre del 2016 se recogieron 75 muestras de sangre de 74 niños.

Pacientes sépticos: se incluyeron 51 episodios, en 50 pacientes, de sepsis grave / shock séptico, (1 paciente oncológico presentó durante el periodo de estudio 2 episodios de sepsis); 12 de los casos cumplían los criterios de sepsis grave 23,5% y 39 (76,4%) presentaban al ingreso criterios de shock séptico, de acuerdo con la conferencia consenso para la definición de sepsis pediátrica del 2002, (Goldstein B, *Pediatr Crit Care Med* 2005) comentado en sujetos y método (criterios de inclusión).

Controles: se incluyeron 24 controles sanos siguiendo los criterios reflejados en el apartado sujetos y método (criterios de inclusión) .

4.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES CON SEPSIS

4.2.1. DATOS GENERALES

En la tabla 7 se muestran los datos descriptivos de la población global de pacientes con sepsis.

La mediana de la edad de los pacientes fue de 4,19 años (P₂₅-P₇₅: 2,24-8,81) y la mediana del peso fue de 17, 4 Kg. (P₂₅-P₇₅: 12-29,5).

El motivo de ingreso fue principalmente por un motivo médico (96%), solo 2 pacientes lo fueron por indicación quirúrgica, uno de manera programada y otro de manera urgente.

El 49% de los pacientes referían diferentes comorbilidades o enfermedades crónicas asociadas, destacando la inmunosupresión (22%) fundamentalmente secundaria a cáncer (8) y trasplante renal (3).

El foco principal primario de la infección fue el endovascular (57%).
Presentaron disfunción de órganos 39 pacientes (76,5%).

Tabla 7. Datos generales de la población global de sepsis.

TOTAL DE PACIENTES	SEPSIS	CONTROLES
N	51	24
Sexo (% Mujeres)	25/26 (49%)	12/12 (50%)
EDAD (años), mediana P₂₅-P₇₅	4,19 (2,24; 8,81)	8,2 (3,7-12,44)
PESO (Kg), mediana P₂₅-P₇₅	17,4 (12; 29,5)	
Procedencia		
URGENCIAS	31 (60,8%)	
PLANTA HOSPITALIZACIÓN	10 (19,6%)	
OTRO HOSPITAL	9 (17,6%)	
CIRUGÍA URGENTE	1 (2%)	
Tipo de ingreso		
MEDICO n(%)	49 (96,1%)	
QUIRURGICO	2 (4%)	
Antecedentes Personales		
INMUNOSUPRESION	11 (22%)	
NEOPLASIA	8 (16%)	
ENF NEUROLOGICA	4 (7,8%)	
INSUF RESPIR CRONICA	4 (7,8%)	
PREMATURIDAD	3 (5,9%)	
CARDIOPATÍA CONGENITA	3 (5,9%)	
INSUF RENAL CRÓNICA	3 (5,9%)	
Origen		
ENDOVASCULAR	29 (56,9%)	
RESPIRATORIO	8 (15,7%)	
ABDOMINAL	3 (5,9%)	
OTROS	11 (21,56%)	
Disfunción de órganos		
DISFUNCION CARDIOVASCULAR	39 (76,5%)	
RESPIRATORIA	12 (23,5%)	
RENAL	9 (17,6%)	
PLAQUETOPENIA	9 (17,6%)	
COAGULOPATIA	8 (15,7%)	
NEUROLOGICA	6 (11,8%)	
HEPATICA	3 (5,9%)	

De este grupo general eliminamos del análisis a los 11 casos que cumplían criterios de exclusión: pacientes con inmunodeficiencia primaria o secundaria a otras enfermedades [oncológicos (8) y trasplante renal (3)].

En la Tabla 8 se muestran los datos descriptivos de las poblaciones con sepsis grave (SG) y shock séptico (SS).

Tabla 8. Características de los pacientes con sepsis grave y shock séptico

	TOTAL (n= 40)	SG (n=7)	SS (n=33)
Sexo (% mujeres)	18/22 (55%)	5/2 (71,4%)	17/16 (51,5%)
Edad años (mediana P₂₅-P₇₅)	3,83 (1,6-8,3)	1,04 (0,38-8,7)	4,02 (2,28-8,5)
Peso kg (mediana P₂₅-P₇₅)	16 (11-29)	8,7 (7-35)	17 (12-29)
PRISM (mediana P₂₅-P₇₅)	7 (4-11)	4 (2,7-4,5)	8 (4,5-13,5)
Comorbilidades:			
Prematuridad	3 (7,5%)	2 (28,6%)	1 (3%)
Cardiopatía	3 (7,5%)		3 (9%)
Insuficiencia Respiratoria crónica	4 (10%)	1 (14,3%)	3 (9%)
Enfermedad neurológica	4 (10%)		4 (12%)
Procedencia			
Urgencias	28 (70%)	4 (57,1%)	24 (72,7%)
Sala	2 (5%)		2 (6,1%)
Otro hospital	9 (22,5%)	3 (42,9%)	6 (18,2%)
Quirófano	1 (2,5%)		1 (3%)
Ingreso			
Médica	38 (95%)	7 (100%)	31(94%)
Quirúrgica	2 (2,5%)		2 (6%)
Disfunción de órganos			
Cardiovascular	33 (82,5%)		33 (100%)
Renal	8 (20%)		8 (24%)
Plaquetopenia	2 (5%)		2 (6%)
Coagulopatía	7 (17,5%)		7 (21%)
Hepático	3 (7,5%)		3 (9%)
Respiratorio	12 (30%)	2 (28,6%)	10 (30%)
Neurológico	5 (12,5%)		5 (15%)
Infección			
Microbiológicamente documentada	21 (52%)	4 (57,1%)	17 (51,5%)
Lugar de la infección			
Bacteriemia	21 (52,5%)	2 (28,6%)	19 (57,6%)
Neumonía	8 (20%)	5 (71,4%)	3 (9%)
Intraabdominal	3 (7,5%)		3 (9%)
Otros	8 (20%)		8 (18,3%)
Soporte en UCIP			
Vasoactivos n(%)	33 (82,5%)		33 (100%)

NAD n, dosis µg/k/min	16 (0,3; 0,05-1)		16 (0,3; 0,05-1)
ADR n, dosis µg/k/min	14 (0,3; 0,1-1)		14 (0,3; 0,1-1)
DOP n, dosis µg/k/min	26 (10; 5-20)		26 (10; 5-20)
VM nº	13 (32,5%)	1 (14,3%)	12 (36,4%)
VNI nº	1 (2,5%)	1 (14,3%)	
IRA nº	7 (17,5%)		7 (21%)
Hidrocortisona nº	11 (27,5%)	1 (14,3%)	10 (30,3%)
Insulina nº	1 (2,5%)		1 (3%)
Duración del soporte (d)			
Vasoactivo (mediana P₂₅-P₇₅)	2 (1-3)		2 (1-3)
VM (mediana P₂₅-P₇₅)	3 (2-5)	12	3 (2-5)
Duración estancia (d)			
UCIP	3 (2-6)	2 (1-5)	3 (2-6)
Hospital	7 (6-9,5)	7 (6-14)	7 (6-9)
Resultado Hospital			
Vivo	38	7	31
Muerto	2 (1 urgencias)	0	1

SG: sepsis grave; SS: shock séptico; NAD: noradrenalina, ADR: adrenalina, DOP: dopamina; VM: ventilación mecánica; VNI: ventilación no invasiva; IRA: insuficiencia renal aguda.

4.2.2. SEPSIS GRAVE (SG)

Se registraron 7 episodios de SG, 5 mujeres y 2 hombres (Tabla 8). Con una mediana de edad al diagnóstico de 1,04 años y una mediana de peso de 8,7 Kg. Cuatro pacientes provenían de Urgencias y 3 de otro Hospital. Tres de los pacientes referían diferentes antecedentes personales (2 prematuridad y 1 insuficiencia respiratoria crónica).

El motivo de ingreso en el hospital fue en todos los casos de causa médica. El origen de la infección fue en 5 respiratorio y 2 casos endovascular. Dos pacientes presentaron disfunción respiratoria.

Los resultados de las constantes vitales y analítica en las primeras 24 horas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Analítica y constantes de los pacientes con sepsis grave/shock séptico.

	TOTAL N= 40	SG (n =7)	SS (n= 33)
TAM (mediana P₂₅-P₇₅)	59 ± 18	79,5 (59-79)	56,61 (45-70)
FC media	158 ± 32	179 ± 36	153,5 ± 29,6
FR media	35 ± 12	43 ± 12	33,6 ± 12,2
Tº media	37,8 ± 1,3	38,2 ± 1,1	37,7± 1,3
PVC media	10,2 ± 4,2	6 ± 3	10,7 ± 4
SatvO2 media rango	77,4 ± 12	74,6% ± 8,3	77,9% ± 11
Hemoglobina (g/dL) media	10,79 ± 1,3	11,6 ± 0,9	10,6 ± 1,3
Leucocitos 10³/µL media	14.827 ± 10.390	14.785 ± 10.860	14.836 ± 10.462
Plaquetas 10³/ µL	230.475 ± 110.571	311.571 ± 139.265	213.272 ± 97.570
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,5	0,31 ± 0,3	0,66 ± 0,5
Urea (mg/dL)	35,4 ± 24	17,4 ± 9	39 ± 25
Bicarbonato	18,4 ± 4,7	20,4 ± 2,8	17,9 ± 4,9
pH	7,28 ± 0,13	7,35 ± 0,07	7,27 ± 0,14
Exceso de Bases	-7,8 ± 6	- 4,5 ± 2,4	-8,5 ± 6,3
Bilirrubina (mg/dL)	0,65 ± 0,7	0,4 ± 0,15	0,6 ± 0,7
Glucemia (mg/dL)	105 ± 47	110 ± 12	104 ± 51
Lactato (mg/dL)	29,87 (6-101)	24,5 ± 14	31 ± 23
PCR (mg/dL)	13,9 ± 9,2	14,9 ± 11	13,6 ± 8
Procalcitonina (ng/mL)	35,23 ± 32	11,2 ± 8,1	40 ± 32

Tensión arterial media (TAM); Frecuencia cardiaca (FC); Frecuencia respiratoria (FR). Exceso de bases (EB); Temperatura (Tº). Todos los valores se expresan en media e IC 95%., salvo TAM en mediana y cuartiles.

La mediana de la diferencia de horas entre el inicio de la sepsis y el ingreso en la UCIP, en este grupo fue de 5 horas, (P₂₅ 1 hora - P₇₅ 24 horas) rango 0-26 horas.

La media al ingreso de lactato fue de 24,5 ± 14 mg/dL, la media de PCR fue de 14,9 ± 11 mg/dL y la media de la PCT fue de 11,2 ± 8,1 ng/mL.

Los gérmenes aislados y el tratamiento antibiótico empleado en este grupo de pacientes se muestran en la tabla 10. El porcentaje de hemocultivos positivos en este grupo fue de 57,1% (4 de 7).

Tabla 10. Gérmenes y antibióticos empleados en los pacientes con sepsis grave.

Gérmenes aislados	Antibióticos empleados
1 <i>Streptococcus Pneumoniae</i>	Cefalosporinas de 3 ^a G, 7 (100%)
1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	Clindamicina 2
1 <i>Neisseria Meningitidis</i>	Macrólidos 2
1 <i>Acinertobacter Baumanii</i>	Glucopéptido 2
	Quinolonas 1

Entre las medidas de tratamiento: recibieron expansiones con cristaloides, media de 525 mL ± 383 (rango: 160-1.000) y albumina, media de 600 mL ± 565 (rango: 20 -1.000). La saturación venosa media fue de 74,6%. El lactato medio fue de 2,79 mmol/L.

Otros tratamientos:

Ningún paciente requirió soporte invasivo. Uno hidrocortisona (14,3%). Un paciente fue intubado (14,3%), y uno fue manejado con ventilación no invasiva (VNI). El paciente intubado presento un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y requirió oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO) durante 12 días. El valor de la mediana del PRISM-3 (Riesgo de

mortalidad pediátrica, escala que predice la mortalidad basada en parámetros fisiológicos) fue de 4 (P₂₅-P₇₅, 2,7-4,5).

La mediana de la estancia media en UCIP fue de 2 días (P₂₅ 1 día - P₇₅ 5 días) rango 1-22 días y la mediana de la estancia hospitalaria fue de 7 días (P₂₅ 6 días - P₇₅ 14 días) rango 4-32 días. En este grupo no falleció ningún paciente.

4.2.3. SHOCK SÉPTICO

Se registraron 33 episodios de shock séptico 17 mujeres y 16 hombres (Tabla 8), con una mediana de edad al diagnóstico de 4,02 años y una mediana de peso de 17 Kg. Veinticuatro pacientes provenían de urgencias, 6 fueron trasladados de otros hospitales, 2 de la sala de hospitalización y 1 de quirófano tras una cirugía urgente. Nueve pacientes referían diferentes antecedentes personales (4 asociaban una enfermedad neurológica, 3 una cardiopatía congénita, 3 insuficiencia respiratoria crónica y 1 exprematuridad). El motivo de ingreso en el hospital fue de causa médica en 31 de los pacientes y en 2 tras una intervención.

El origen de la infección fue en 19 casos endovascular, 3 abdominal, 3 respiratorio y en 8 (4 Tejidos blandos, 2 sistema nerviosos central (SNC), 1 Infección por catéter, 1 musculo esquelético).

Disfunción de órganos: los 33 pacientes presentaron disfunción cardiovascular, 10 disfunción respiratoria, 8 disfunción renal, 7 coagulopatía, 5 disfunción neurológica, 3 disfunción hepática y 2 plaquetopenia.

Los resultados de la analítica en las primeras 24 horas se muestran en la Tabla 9.

La mediana de la diferencia de horas entre el inicio de la sepsis y el ingreso en la UCIP, en este grupo fue de 8,25 horas, (P₂₅ 1 hora - P₇₅ 24 horas) rango 0-48,3 horas.

La media al ingreso de lactato fue de 31 ± 23 mg/dL, la media de PCR fue de 13,6 ± 8 mg/dL y la media de la PCT fue de 40 ± 32 ng/mL.

Los gérmenes aislados y el tratamiento antibiótico empleado en este grupo de pacientes se muestran en la tabla 11. El porcentaje de hemocultivos positivos en este grupo fue de 53,1% (17 de 32). De los 32 pacientes, 13 recibieron monoterapia, 10 biterapia y 9 triple terapia antibiótica.

El tratamiento antibiótico inicial fue de Cefalosporinas de 3^a generación en 28 (85%) y carbapenem en 5 (15%). Otros antibióticos asociados fueron: Glucopéptidos 15, Clindamicina 8, Aminoglucósido 3 y Carbapenem en 2.

Tabla 11. Gérmenes y antibióticos empleados en los pacientes con shock séptico.

GÉRMENES AISLADOS	ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS
<i>Neisseria Meningitidis</i> 11	Cefalosporinas de 3 ^a G, 28 (85%)
<i>Streptococcus</i> grupo 3	Glucopéptido 15 (47%)
<i>Streptococcus Pneumoniae</i> 1	Clindamicina 8 (25%)
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> 1	Aminoglucósido 3
<i>Stafilococcus Coagulasa</i> - 1	Macrólidos 2
	Carbapenem 2
	Quinolonas 1

Medidas de soporte: recibieron expansiones con cristaloides, una media de 1.026 mL \pm 647 (rango: 40 – 2.700) y albumina, una media de 628 mL \pm 525 (rango: 50 – 2.000). La saturación venosa media fue de 77,9% (rango: 45-97). El lactato medio fue de 3,4 mmol/L.

Otros tratamientos:

Requirieron soporte inotroactivo los 33 pacientes con una media de 2,2 días. Dieciséis, noradrenalina, 48,5%, (dosis media de 0,3 μ gr/kg/min; rango: 0,05-1 μ gr/kg/min), 14 adrenalina, 42,5%, (dosis media 0,3 μ gr/kg/min; rango: 0,1-1 μ gr/kg/min) y 26 dopamina, 78,8%, (dosis media 10 μ gr/kg/min; rango: 5-20 μ gr/kg/min). Doce, 36,7% recibieron transfusión de concentrado de hematíes, 10 hidrocortisona, 30%, y 1 insulina, presentando una paciente hipoglucemia. Doce pacientes, 36,3%, fueron intubados y conectados a ventilación mecánica una media de 3,7 días, y uno fue manejado con ventilación no invasiva (VNI). En un caso de infección de origen abdominal se necesitó realizar control del foco séptico. En este grupo de pacientes ninguno necesitó terapia de sustitución renal, ni oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO).

El valor de la mediana del PRISM 3 fue de 8 (rango 1-33). Este grupo presenta un nivel de afectación mayor de órganos que el grupo de sepsis grave.

La mediana de la estancia media en UCIP fue de 3 días (rango: 1-51 días) y la mediana de la estancia hospitalaria fue de 7 días (rango 4-63 días).

De los 32 pacientes de este grupo que ingresaron en UCIP con shock séptico falleció 1 (3%), hubo otro paciente que falleció en la urgencia. Mortalidad

total de la serie 2 (6%). Este último paciente no pudo ser incluido en la validación de los ELISAS por carecer de muestra suficiente.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó determinaciones analíticas de PCR y PCT, dentro de los estudios habituales que se realizan en pacientes con sospecha de infección. La PCR fue negativa en 7 pacientes (17,5%), 3 de ellos con infección confirmada por hemocultivo, luego como se confirma en la literatura, un porcentaje alto de pacientes con sepsis no presentan elevaciones de esta proteína y el diagnóstico de sepsis puede establecerse en pacientes con PCR negativa. En el caso de la PCT, 4 pacientes (10%) tuvieron un valor considerado negativo de la proteína, ninguno de ellos tenía una infección confirmada por hemocultivo. Veintitrés pacientes presentaron a su ingreso cifras elevadas de lactato (57,5%), frente a 17 que tenían valores normales. Esto confirma que estos marcadores de infección utilizados habitualmente, incluso realizados a pacientes con alta sospecha clínica de sepsis o shock séptico son poco fiables para determinar si un paciente presenta una infección grave o sepsis.

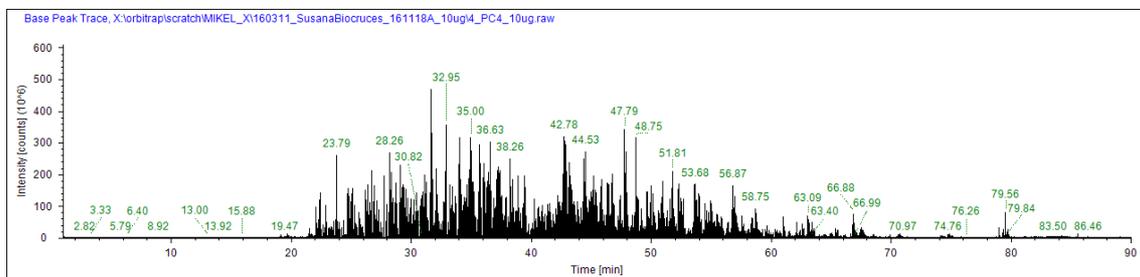
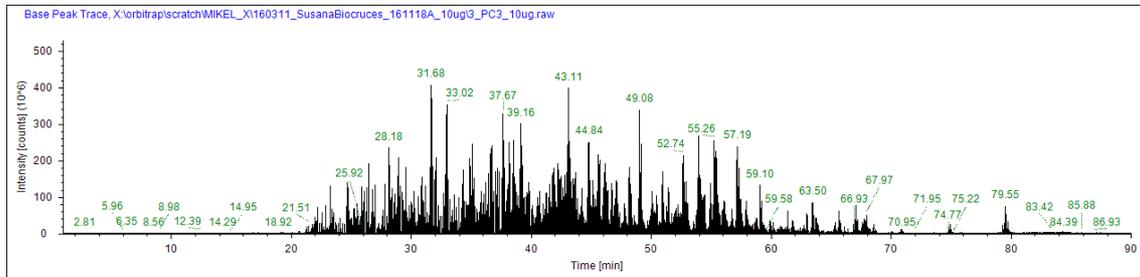
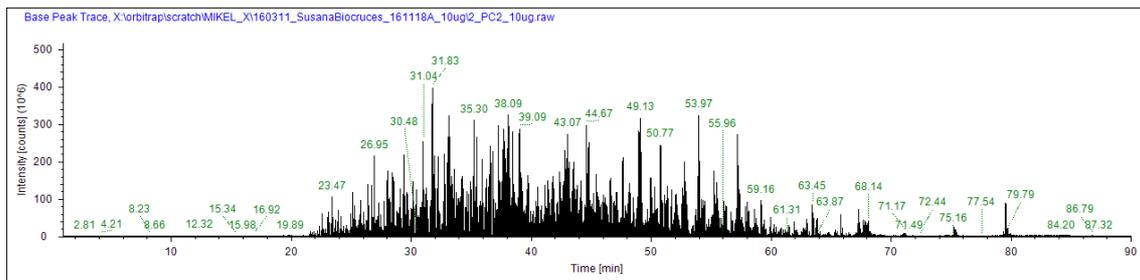
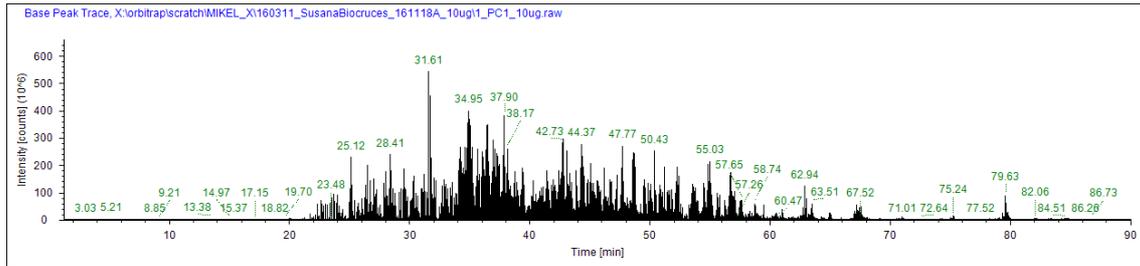
4.3. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES CONTROLES

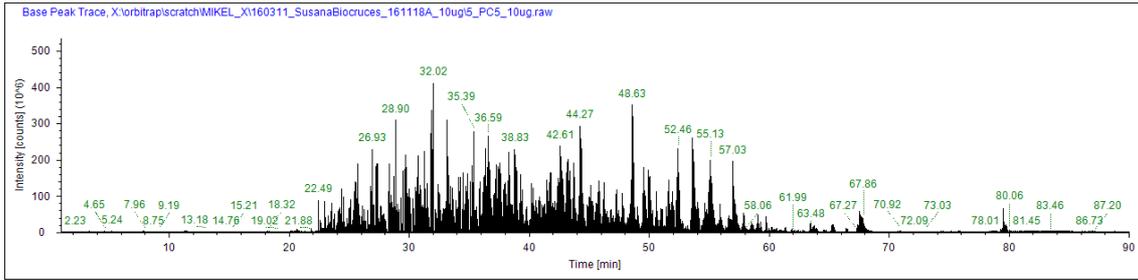
De los controles 12 fueron hombres (50%) y 12 mujeres (50%). La edad mediana fue de 8,2 años [P₂₅-P₇₅: 3,71; 12,44], rango 1,27 -15,68 años. (Tabla 7).

4.4. ANALISIS DEL PERFIL PROTEOMICO SERICO DE LOS PACIENTES SEPTICOS Y CONTROLES

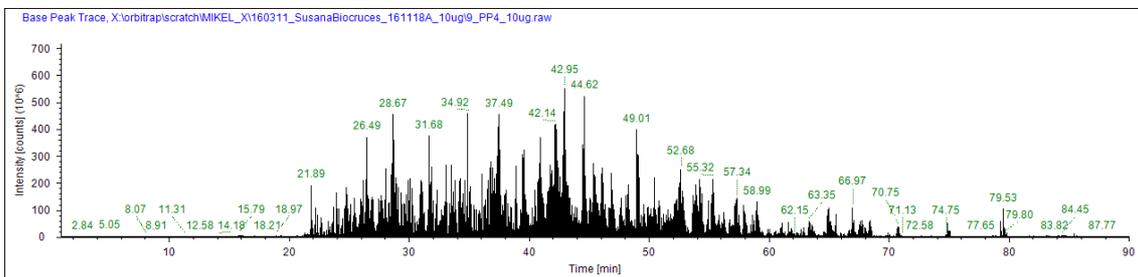
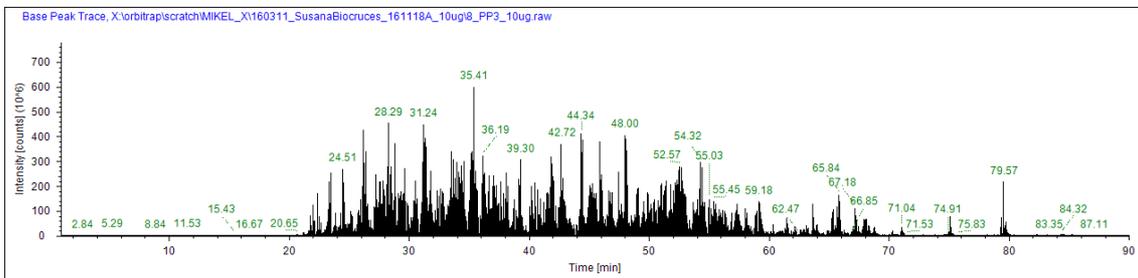
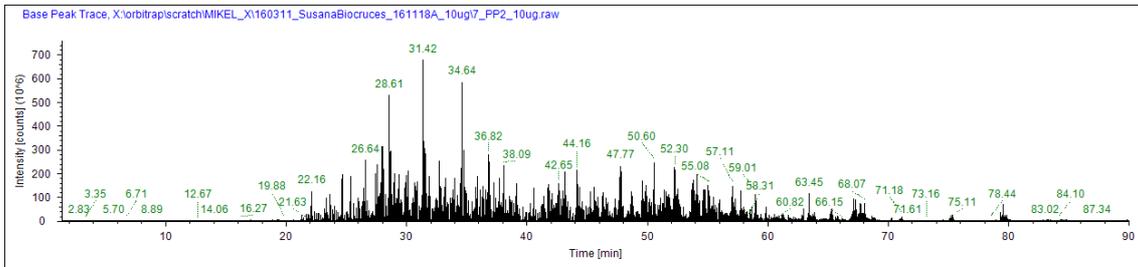
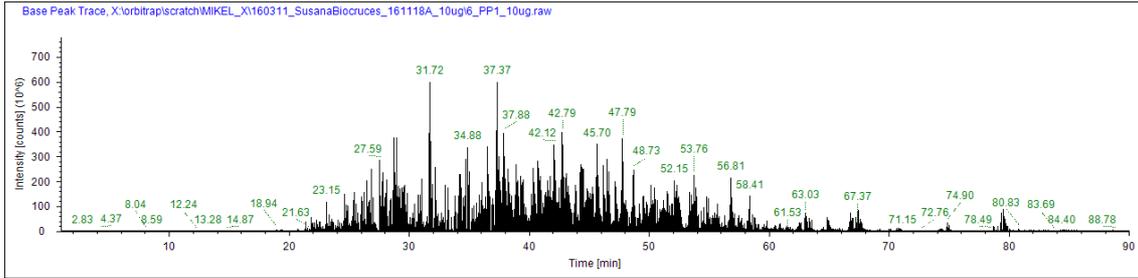
Se analizaron las muestras de sueros de 10 pacientes sépticos y 5 controles. Los pacientes sépticos presentaban 5 sepsis por Gram - y 5 sepsis por Gram +. En la figura 8 se observan los perfiles proteómicos de los pacientes sépticos y los controles.

A. CONTROLES





B. SÉPTICOS



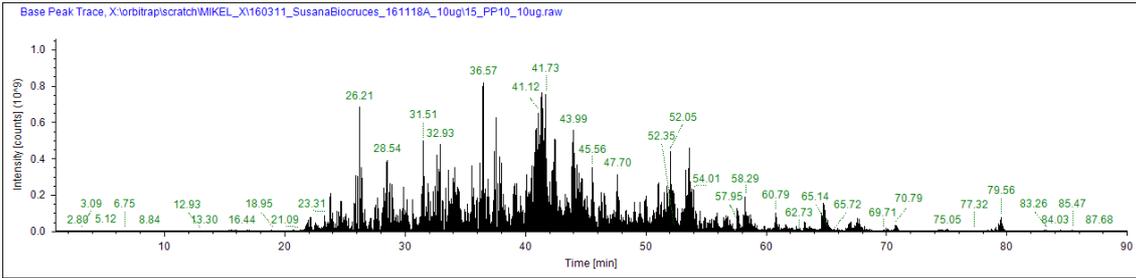
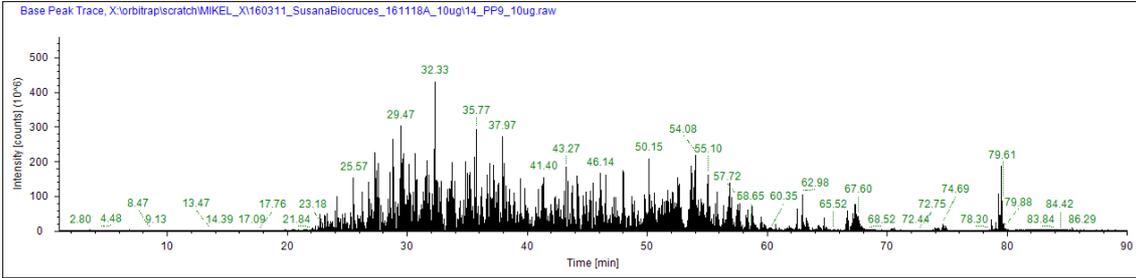
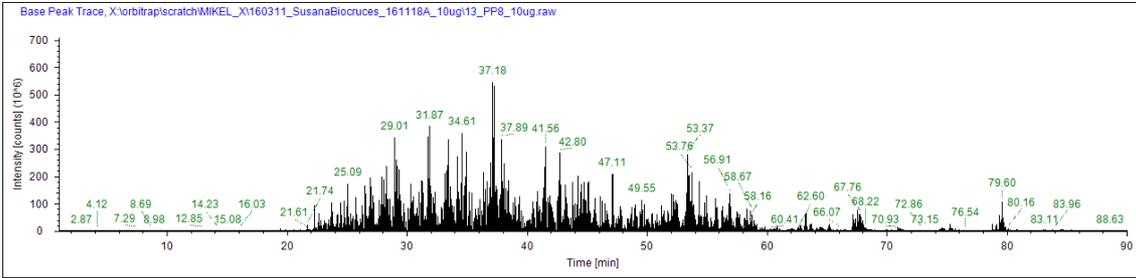
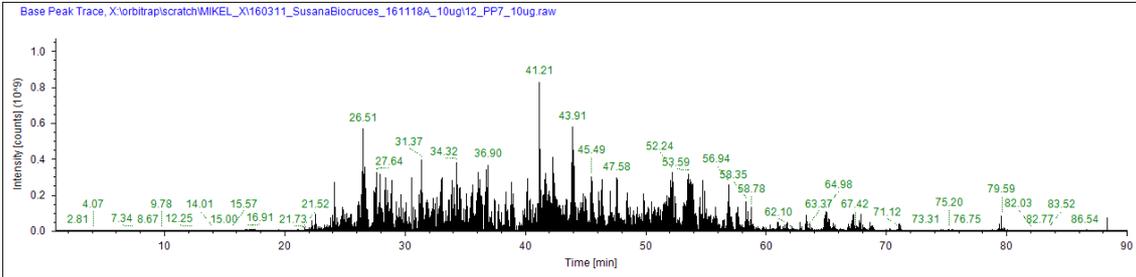
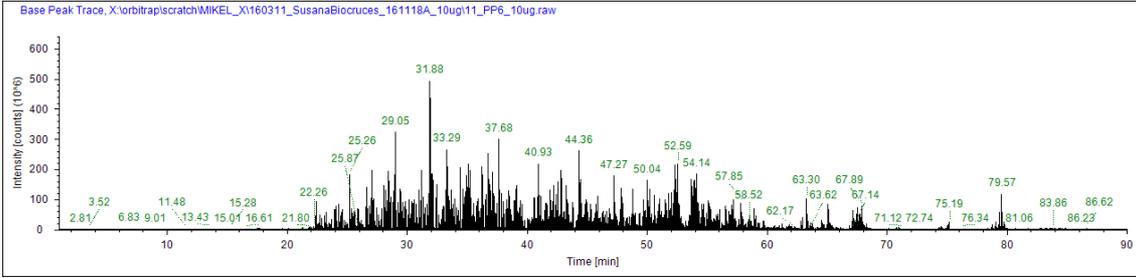
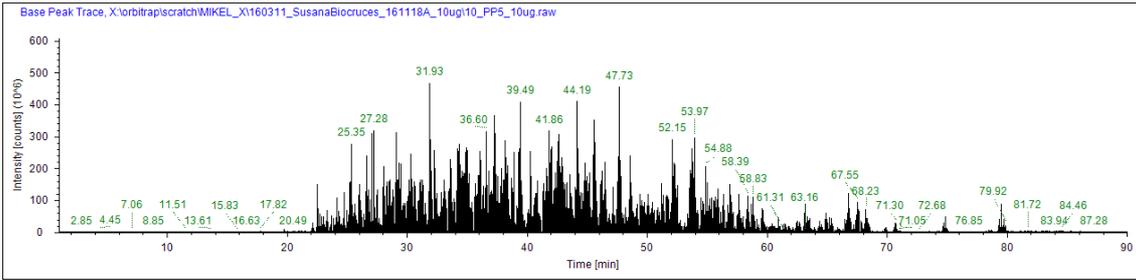


Figura 8. Perfil proteómico de los controles (A) y de los pacientes sépticos (B).

En el análisis proteómico de las 15 muestras de suero (10 sépticos y 5 controles) se identificaron **232 proteínas diferenciadas** (Tabla 12) entre pacientes sépticos y controles. Se eligieron para el estudio aquellas que tenían al menos 2 péptidos únicos por proteína, con un valor medio de 2 o más veces por encima o por debajo del valor medio de los controles (Max fold) y que presentaban una significación de $p < 0,05$. Tras la aplicación de estos criterios de selección se obtuvieron **44 proteínas** (Tabla 13).

Tabla 12. Proteínas diferenciadas entre pacientes sépticos y controles identificadas mediante proteómica.

Accession	Description
LBP_HUMAN	Lipopolysaccharide-binding protein OS=Homo sapiens GN=LBP
A2GL_HUMAN	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1
CRP_HUMAN	C-reactive protein OS=Homo sapiens GN=CRP
ZBT10_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens GN=ZBTB10
SAA2_HUMAN	Serum amyloid A-2 protein OS=Homo sapiens GN=SAA2
IPSP_HUMAN	Plasma serine protease inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINA5
SAM9L_HUMAN	Sterile alpha motif domain-containing protein 9-like OS=Homo sapiens GN=SAMD9L
FINC_HUMAN	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3
VASN_HUMAN	Vasorin OS=Homo sapiens GN=VASN
SAA1_HUMAN	Serum amyloid A-1 protein OS=Homo sapiens GN=SAA1
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1
CATA_HUMAN	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT
HABP2_HUMAN	Hyaluronan-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=HABP2
TTHY_HUMAN	Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR
CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens GN=CA1
EZRI_HUMAN	Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR
CFAB_HUMAN	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB
HBG1_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=HBG1
LYAM1_HUMAN	L-selectin OS=Homo sapiens GN=SELL
NGAL_HUMAN	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin OS=Homo sapiens GN=LCN2
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Homo sapiens GN=TGFB1
B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M
KAIN_HUMAN	Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4
FA12_HUMAN	Coagulation factor XII OS=Homo sapiens GN=F12

CD14_HUMAN	Monocyte differentiation antigen CD14 OS=Homo sapiens GN=CD14
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF
ITIH3_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITIH3
SAP_HUMAN	Prosaposin OS=Homo sapiens GN=PSAP
GPX3_HUMAN	Glutathione peroxidase 3 OS=Homo sapiens GN=GPX3
DEF1_HUMAN	Neutrophil defensin 1 OS=Homo sapiens GN=DEFA1
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2
LIRA1_HUMAN	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 1 OS=Homo sapiens GN=LILRA1 PE=2
A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBP4
CSF1R_HUMAN	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor OS=Homo sapiens GN=CSF1R
PLMN_HUMAN	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2
MA1A1_HUMAN	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA OS=Homo sapiens GN=MAN1A1
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH
SHBG_HUMAN	Sex hormone-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SHBG
SPRC_HUMAN	SPARC OS=Homo sapiens GN=SPARC
HGFL_HUMAN	Hepatocyte growth factor-like protein OS=Homo sapiens GN=MST1
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=APOH
REG1A_HUMAN	Lithostathine-1-alpha OS=Homo sapiens GN=REG1A
FETUB_HUMAN	Fetuin-B OS=Homo sapiens GN=FETUB
HPT_HUMAN	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP
PTX3_HUMAN	Pentraxin-related protein PTX3 OS=Homo sapiens GN=PTX3
6PGD_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD
CLUS_HUMAN	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU
AMBP_HUMAN	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP
ZPI_HUMAN	Protein Z-dependent protease inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINA10
TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF
KLKB1_HUMAN	Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1
RIMS1_HUMAN	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 OS=Homo sapiens GN=RIMS1
CO9_HUMAN	Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1
COR1A_HUMAN	Coronin-1A OS=Homo sapiens GN=CORO1A
PLSL_HUMAN	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN
MA2A1_HUMAN	Alpha-mannosidase 2 OS=Homo sapiens GN=MAN2A1
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ
THRB_HUMAN	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB

CERU_HUMAN	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP
CO8A_HUMAN	Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens GN=C8A
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1
POSTN_HUMAN	Periostin OS=Homo sapiens GN=POSTN
CBPN_HUMAN	Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens GN=CPN1
APOC1_HUMAN	Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L
CNDP1_HUMAN	Beta-Ala-His dipeptidase OS=Homo sapiens GN=CNDP1
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1
ALDOB_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase B OS=Homo sapiens GN=ALDOB
CO8B_HUMAN	Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1
ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFALS
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD
THBG_HUMAN	Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7
FA10_HUMAN	Coagulation factor X OS=Homo sapiens GN=F10
DTNB_HUMAN	Dystrobrevin beta OS=Homo sapiens GN=DTNB
FGL2_HUMAN	Fibroleukin OS=Homo sapiens GN=FGL2
AFAM_HUMAN	Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM
A1AG2_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2
F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=FBP1
FSTL1_HUMAN	Follistatin-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=FSTL1
CCD96_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 96 OS=Homo sapiens GN=CCDC96 PE=2
GP1BA_HUMAN	Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Homo sapiens GN=GP1BA
PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1
PRG4_HUMAN	Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens GN=PRG4
VCAM1_HUMAN	Vascular cell adhesion protein 1 OS=Homo sapiens GN=VCAM1
ACTA_HUMAN	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2
CFAI_HUMAN	Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI
H4_HUMAN	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R
VWF_HUMAN	von Willebrand factor OS=Homo sapiens GN=VWF
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITIH1
TKT_HUMAN	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG
PGRP2_HUMAN	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2
ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM
SEPP1_HUMAN	Selenoprotein P OS=Homo sapiens GN=SEPP1
CO7_HUMAN	Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7

IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3
CFAH_HUMAN	Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1
FCN2_HUMAN	Ficolin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2
PHLD_HUMAN	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D OS=Homo sapiens GN=GPLD1
CO4A_HUMAN	Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC
HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1
IGHG4_HUMAN	Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG
MASP1_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 1 OS=Homo sapiens GN=MASP1
TETN_HUMAN	Tetranectin OS=Homo sapiens GN=CLEC3B
K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2
K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10
PAR14_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 14 OS=Homo sapiens GN=PARP14
PI16_HUMAN	Peptidase inhibitor 16 OS=Homo sapiens GN=PI16
LAC1_HUMAN	Ig lambda-1 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC1
APOM_HUMAN	Apolipoprotein M OS=Homo sapiens GN=APOM
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2
CRIS3_HUMAN	Cysteine-rich secretory protein 3 OS=Homo sapiens GN=CRISP3
CO4B_HUMAN	Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB
TSP4_HUMAN	Thrombospondin-4 OS=Homo sapiens GN=THBS4
CO8G_HUMAN	Complement component C8 gamma chain OS=Homo sapiens GN=C8G
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4
CO3_HUMAN	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1
TITIN_HUMAN	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN
APOC4_HUMAN	Apolipoprotein C-IV OS=Homo sapiens GN=APOC4
COMP_HUMAN	Cartilage oligomeric matrix protein OS=Homo sapiens GN=COMP
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1
CETP_HUMAN	Cholesteryl ester transfer protein OS=Homo sapiens GN=CETP
PROC_HUMAN	Vitamin K-dependent protein C OS=Homo sapiens GN=PROC
C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A OS=Homo sapiens GN=C1QA
BTD_HUMAN	Biotinidase OS=Homo sapiens GN=BTD
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1
NCAM1_HUMAN	Neural cell adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens GN=NCAM1
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=ECM1
NEO1_HUMAN	Neogenin OS=Homo sapiens GN=NEO1
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA
LV302_HUMAN	Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP
CO6_HUMAN	Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6

ROR1_HUMAN	Inactive tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1 OS=Homo sapiens GN=ROR1
LCAT_HUMAN	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase OS=Homo sapiens GN=LCAT
FA11_HUMAN	Coagulation factor XI OS=Homo sapiens GN=F11
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2
CYTC_HUMAN	Cystatin-C OS=Homo sapiens GN=CST3
FBLN1_HUMAN	Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1
PEDF_HUMAN	Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1
UGPA_HUMAN	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Homo sapiens GN=UGP2
HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1
CPSM_HUMAN	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CPS1
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens GN=APOL1
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9
APOD_HUMAN	Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD
AL1A1_HUMAN	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens GN=ALDH1A1
CAMP_HUMAN	Cathelicidin antimicrobial peptide OS=Homo sapiens GN=CAMP
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4
FCN3_HUMAN	Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FCN3
ANGT_HUMAN	Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT
CPN2_HUMAN	Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2
GPV_HUMAN	Platelet glycoprotein V OS=Homo sapiens GN=GP5
C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB
CBG_HUMAN	Corticosteroid-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA6
HGFA_HUMAN	Hepatocyte growth factor activator OS=Homo sapiens GN=HGFA
SCO1_HUMAN	Protein SCO1 homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SCO1
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC
ENPP2_HUMAN	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 OS=Homo sapiens GN=ENPP2
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=CFHR1
C4BPB_HUMAN	C4b-binding protein beta chain OS=Homo sapiens GN=C4BPB
THAP4_HUMAN	THAP domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=THAP4
LYSC_HUMAN	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ
TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1
C163A_HUMAN	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 OS=Homo sapiens GN=CD163
LYVE1_HUMAN	Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 OS=Homo sapiens GN=LYVE1
APOA_HUMAN	Apolipoprotein(a) OS=Homo sapiens GN=LPA
NCHL1_HUMAN	Neural cell adhesion molecule L1-like protein OS=Homo sapiens GN=CHL1
TENX_HUMAN	Tenascin-X OS=Homo sapiens GN=TNXB
PLTP_HUMAN	Phospholipid transfer protein OS=Homo sapiens GN=PLTP
FA9_HUMAN	Coagulation factor IX OS=Homo sapiens GN=F9
GELS_HUMAN	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN
MBL2_HUMAN	Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens GN=MBL2
PROF1_HUMAN	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1
CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein OS=Homo sapiens GN=PPBP
GNAL_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha OS=Homo sapiens GN=GNAL

FA5_HUMAN	Coagulation factor V OS=Homo sapiens GN=F5
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC
KV301_HUMAN	Ig kappa chain V-III region B6 OS=Homo sapiens
SPN90_HUMAN	NCK-interacting protein with SH3 domain OS=Homo sapiens GN=NCKIPSD
CD44_HUMAN	CD44 antigen OS=Homo sapiens GN=CD44
PROP_HUMAN	Properdin OS=Homo sapiens GN=CFP
CHLE_HUMAN	Cholinesterase OS=Homo sapiens GN=BCHE
CO5_HUMAN	Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9 OS=Homo sapiens GN=MMP9
AMPN_HUMAN	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens GN=ANPEP
PF4V_HUMAN	Platelet factor 4 variant OS=Homo sapiens GN=PF4V1
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1
FCG3B_HUMAN	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B OS=Homo sapiens GN=FCGR3B
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2
ADCY9_HUMAN	Adenylate cyclase type 9 OS=Homo sapiens GN=ADCY9
CCNT2_HUMAN	Cyclin-T2 OS=Homo sapiens GN=CCNT2
LUM_HUMAN	Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM
MMP2_HUMAN	72 kDa type IV collagenase OS=Homo sapiens GN=MMP2
C1RL_HUMAN	Complement C1r subcomponent-like protein OS=Homo sapiens GN=C1RL
FBLN3_HUMAN	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=EFEMP1
CO2_HUMAN	Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens GN=APCS
PROZ_HUMAN	Vitamin K-dependent protein Z OS=Homo sapiens GN=PROZ
ATRN_HUMAN	Attractin OS=Homo sapiens GN=ATRN
ZSC29_HUMAN	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 29 OS=Homo sapiens GN=ZSCAN29
LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB
MED23_HUMAN	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23 OS=Homo sapiens GN=MED23

En la tabla 13 se muestran las 44 proteínas diferenciadas con sus valores de significación estadística (p) y el max fold, indicando en que grupos se encuentran elevadas.

Tabla 13. Proteínas diferenciadas estadísticamente significativas entre pacientes sépticos y controles.

Proteínas	Anova p	Número de veces	Situación más alta	Descripción
LBP	2,60E-09	29,31262596	Sepsis	Proteína de unión al lipopolisacárido
A2GL	3,20E-08	4,426431966	Sepsis	Alfa2 glicoproteína rica en leucina
CRP	8,14E-08	30,41797734	Sepsis	Proteína C reactiva
SAA2	7,47E-07	84,27765527	Sepsis	Serum Amiloide 2
IPSP	1,21E-06	5,010881524	Control	Inhibidor de la serina proteasa
FINC	9,13E-06	8,758802062	Control	Fibronectina
HBB	1,11E-05	25,27836532	Sepsis	Hemoglobina subunidad beta
AACT	1,88E-05	5,28365135	Sepsis	Alfa-1-antiquimiotripsina
SAA1	2,97E-05	76,09708591	Sepsis	Serum Amiloide 1
HBA	3,78E-05	16,39969014	Sepsis	Hemoglobina subunidad alfa
CATA	5,92E-05	7,286451137	Sepsis	Catalasa
HABP2	0,000159	2,179074926	Control	Proteína de unión al hialuronato 2
TTHY	0,000214	2,365904777	Control	Transtiretina
CAH1	0,000233	8,950113813	Sepsis	Anhidrasa carbónica 1
CFAB	0,000336	2,04889514	Sepsis	Factor B del complemento
LYAM1	0,000400	2,675522882	Sepsis	L-selectina
NGAL	0,000556	7,169256836	Sepsis	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos
B2MG	0,000752	3,486170968	Sepsis	Beta-2-microglobulina
FA12	0,000830	3,237084548	Control	Factor XII coagulación
CD14	0,000870	2,784850681	Sepsis	Antígeno de diferenciación de monocitos CD14
FIBG	0,000995	5,317048543	Sepsis	Fibrinógeno cadena gamma
TRFL	0,001180	9,346009409	Sepsis	Lactotransferrina
ITIH3	0,001239	2,192084305	Sepsis	Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4
PRDX2	0,001879	7,267809361	Sepsis	Peroxirredoxina-2

A1AG1	0,002062	2,941180349	Sepsis	Glicoproteína alfa-1-ácida 1
FIBB	0,002142	7,926360983	Sepsis	Cadena beta fibrinógeno
APOA4	0,002251	3,062538098	Control	Apolipoproteína A-IV
RET4	0,002343	2,804231401	Control	Proteína de unión al retinol 4
PLMN	0,002494	2,124858228	Control	Plasminógeno
SHBG	0,004819	2,274379563	Sepsis	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SPRC	0,005756	2,146585316	Control	SPARC
FETUB	0,007872	2,061182556	Control	Fetuina-B
HPT	0,008057	9,390239114	Sepsis	Haptoglobina
PTX3	0,008478	8,831503885	Sepsis	Pentraxin PTX3
6PGD	0,008556	3,129852553	Sepsis	6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilación
ZPI	0,011271	2,795039962	Sepsis	Proteína Z-dependiente del inhibidor de la proteasa
PLSL	0,016815	2,81289335	Sepsis	Plastina-2
ACTB	0,019984	3,0241456	Sepsis	Actina citoplasmática
POSTN	0,023622	2,072017036	Sepsis	Periostina
CBPN	0,026209	2,40257809	Sepsis	Carboxipeptidasa N cadena catalítica
APOC1	0,026858	2,093199286	Control	Apolipoproteína C-I
LDHA	0,029134	2,57915749	Sepsis	L-lactato deshidrogenasa cadena A
CD5L	0,033286	6,760591147	Control	Antígeno CD5 like
ALDOB	0,037227	5,740725522	Sepsis	Fructosa-bisfosfato aldolasa B

En la figura 9 vemos representadas las **44 proteínas** según el Max fold (Nº de veces que cambia el valor basal) en los pacientes sépticos. A la derecha las proteínas aumentadas y la izquierda las proteínas disminuidas.

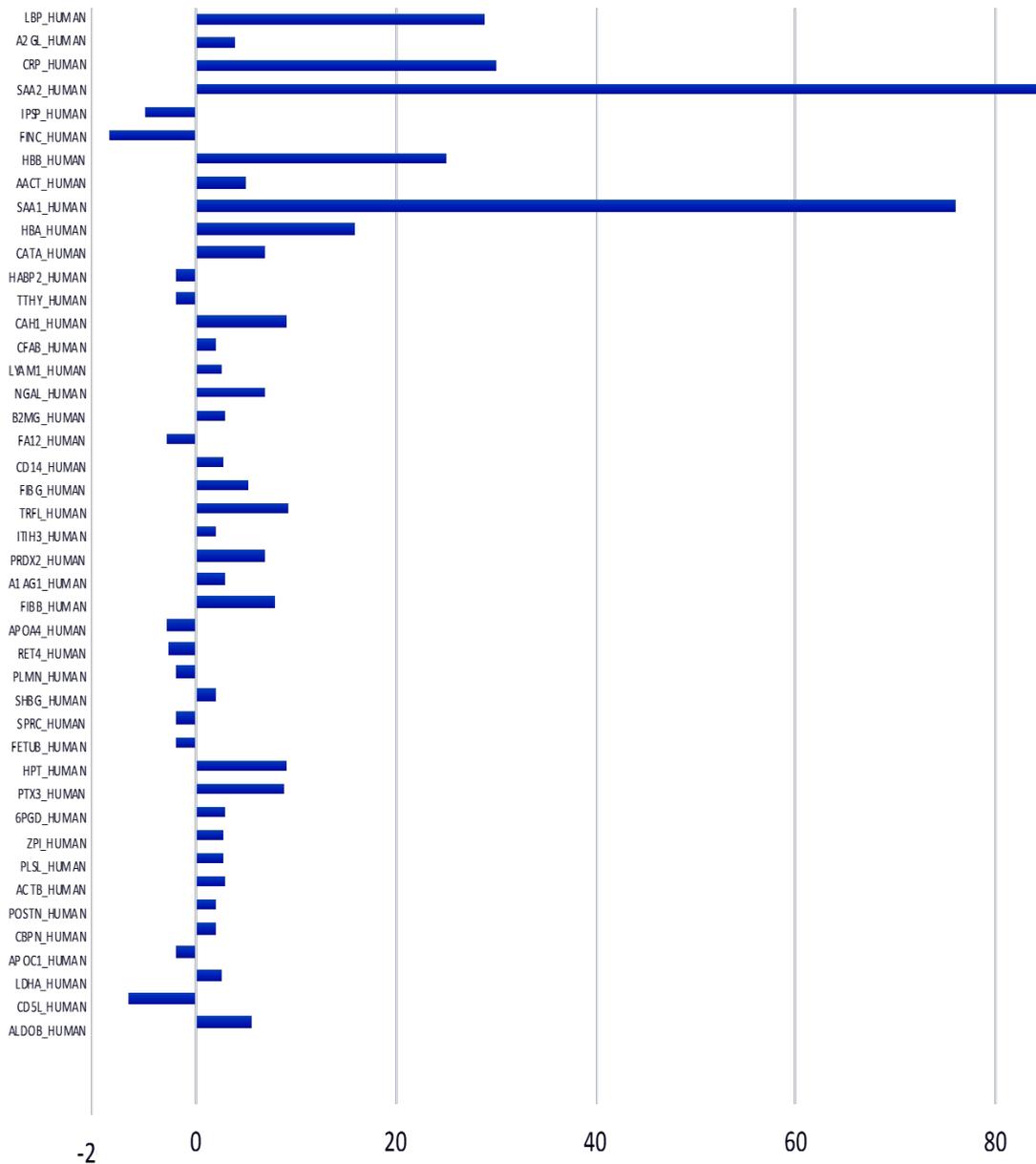


Figura 9. Distribución de las proteínas por cambio en su valor basal.

En el estudio de proteómica también se analizaron las diferencias existentes entre pacientes y controles, controles y sepsis por Gram + y controles y sepsis por Gram -. Se realizó la búsqueda de las proteínas que coincidían en los tres grupos encontrándose 36 **elementos comunes** (Figura 10).

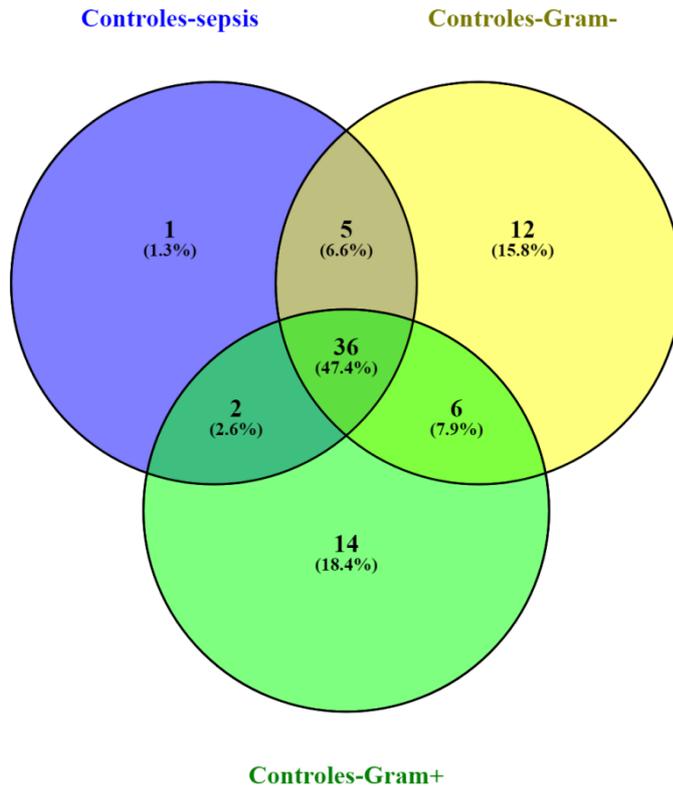


Figura 10. Proteínas comunes entre los 3 grupos pediátricos: controles-sepsis, controles-Gram + y controles-Gram -. Diagrama realizado: Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. Permite comparar 2, 3 o 4 listas de datos y sus posibles relaciones.

Tras esta selección utilizamos el programa STRING (STRING: functional protein association networks. <https://string-db.org/>). STRING es una base de datos de interacciones físicas y funcionales de las proteínas. Las fuentes de STRING vienen de estudios de genómica, investigación de laboratorio, artículos descargados automáticamente de PubMed y OMIN, e información de otras Bases de datos afines a STRING (IntAct, BioGRID, Complex portal, GeneCards). Abarca actualmente el conocimiento de 9.643.763 de proteínas de 2.031 organismos.

Se introdujeron las 36 proteínas en la base de datos STRING con el objetivo de identificar los procesos en los que participan las proteínas y seleccionar aquellas implicadas en el sistema inmune innato y adaptativo y en la respuesta inflamatoria (respuesta a bacterias, regulación de secreción de citoquinas, etc.). (Tabla 14).

Estas 36 proteínas participan en 117 procesos biológicos, 22 relacionados con el sistema inmune, (inflamación, fagocitosis, respuesta inmune innata, respuesta a bacterias, etc.); y 95 con otros procesos relacionados con coagulación (FGB), activación celular (A2GL-LRG1), respuesta a especies reactivas a oxígeno (CATA), metabolismo lipídico (APOC1), sistema del complemento (CFAB), etc. En la tabla 14 se muestran las proteínas y los procesos mayormente vinculados con la respuesta inmune.

Tabla 14. Funciones relacionadas con defensa, inflamación y bacterias en las que participan las diferentes proteínas seleccionadas ($p < 0,05$ y Max fold > 2). Grupo control-sépticos.

Procesos biológicos (GO)

Identificador de la vía	Descripción de la vía	Nº de genes	Proteínas
GO:0002526	Respuesta inflamatoria aguda	9	LBP, SAA2, SERPINA3, FN1, SAA1, F12, CRP, HP, ORM1
GO:0006953	Respuesta de fase aguda	8	LBP, SAA2, SERPINA3, FN1, SAA1, CRP, HP, ORM1
GO:0006952	Respuesta de defensa	19	ACTB, F12, B2M, SAA1, CRP, HP, ORM1, SERPINA3, FN1, FGB, CFB, SAA2, LBP, CD14, LTF, APOA4, LCN2, PTX3, CD5L
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	11	F12, SAA1, CRP, HP, ORM1, SERPINA3, FN1, SAA2, LBP, CD14, PTX3
GO:0045087	Respuesta inmune innata	12	ACTB, F12, B2M, SAA1, FGB, CFB, LBP, CD14, LTF, APOA4, LCN2, PTX3

GO:0002376	Proceso sistema inmune	16	LCP1, ACTB, F12, SAA1, CRP, HP, FN1, FGB, CFB, LBP, CD14, LTF, APOA4, LCN2, PTX3, SELL
GO:0008228	Opsoniación	3	CRP, LBP, PTX3
GO:0006955	Respuesta inmune	13	LCP1, ACTB, F12, B2M, SAA1, FGB, CFB, LBP, CD14, LTF, APOA4, LCN2, PTX3
GO:0009617	Respuesta a bacterias	8	CRP, B2M, HP, FGB, SPARC, LBP, CD14, LTF,
GO:0051707	Respuesta a otros organismos	9	CRP, B2M, HP, FGB, SPARC, LBP, CD14, LTF, PTX3
GO:0032101	Regulación de respuesta a estímulos externos	10	SELL, SAA1, F12, PLG, CFB, FGB, FGG, LBP, LTF, B2M
GO:1903034	Regulación de respuesta a heridas	7	SAA1, F12, PLG, CFB, FGB, FGG, LBP
GO:0048584	Regulación positiva de respuesta a estímulos	14	CAT, ACTB, F12, SAA1, B2M, PLG, CFB, FGG, FGB, SELL, LRG1, LBP, CD14, LTF
GO:0006909	Fagocitosis	5	ACTB, CRP, LBP, CD14, PTX3
GO:0032680	Regulación de producción de FNT	4	ORM1, LBP, CD14, LTF
GO:0042742	Respuesta de defensa a la bacteria	5	CRP, HP, LTF, FGB, LBP
GO:0050707	Regulación de la secreción de citoquinas	4	SAA1, CRP, FN1, CD14
GO:0034145	Regulación positiva de la vía de señalización del receptor TL4	2	LBP, LTF
GO:0071223	Respuesta celular al ácido lipoteicoico	2	LBP, CD14
GO:0002684	Regulación positiva del proceso del sistema inmune	8	SELL; ACTB, B2M, CFB, RBP4, LBP, LTF, CD14
GO:0002252	Proceso efector inmune	6	LCP1, ACTB, CRP, LBP, CFB, PTX3
GO:0002227	Respuesta inmune innata en la mucosa	2	LTF, APOA4

De estas 36 proteínas **24 proteínas** están implicadas directamente en procesos relacionados con la inmunidad del huésped (Tabla 15).

Tabla 15. Relación de las 24 proteínas implicadas, distribuidas en orden al nº de procesos en los que intervienen.

Proteína	nº	Gen	Propiedades
LBP	20	LBP_HUMAN	Respuesta inflamatoria aguda, proceso inmune
CRP	14	CRP_HUMAN	Respuesta inflamatoria aguda, proceso inmune
CD14	14	CD14_HUMAN	Respuesta inmune
LTF	13	TRFL_HUMAN	Respuesta inmune, defensa bacterias
CFB	12	CFAB_HUMAN	Vía alternativa complemento, respuesta inmune
SAA1	11	SAA1_HUMAN	Respuesta inflamatoria aguda, inmune
F12	10	FA12_HUMAN	Coagulación, respuesta a estímulos, respuesta inmune
FGB	10	FIBB_HUMAN	Coagulación y heridas, respuesta inmune
B2M	8	B2MG_HUMAN	Presentación Ag, respuesta inmune
HP	8	HPT_HUMAN	Respuesta a bacterias
FN1	6	FINC_HUMAN	Respuesta inflamatoria, secreción citoquinas
ORM1	5	A1AG1_HUMAN	Respuesta inflamatoria aguda
SERPINA3	5	AACT_HUMAN	Respuesta inflamatoria aguda
FGG	5	FIBG_HUMAN	Coagulación y heridas, respuesta a estímulos
APOA4	5	APOA4_HUMAN	Lípidos, respuesta inmune innata
PLG	5	PLMN_HUMAN	Coagulación, estímulos, heridas
SAA2	4	SAA2_HUMAN	Respuesta inflamatoria aguda
LCN2	4	NGAL_HUMAN	Respuesta inmune innata
SELL	4	LYAM1_HUMAN	Respuesta a estímulos
LCP1	3	PLSL_HUMAN	Respuesta inmune
SPARC	2	SPRC_HUMAN	Respuesta a bacterias
CAT	1	CATA_HUMAN	Protege de peróxido de H, respuesta a estímulos
LRG1	1	A2GL_HUMAN	Respuesta a estímulos
RBP4	1	RET4_HUMAN	Regulación del sistema inmune

Por último, analizamos las diferencias de proteínas entre Gram + y Gram -, en la tabla 16 observamos en primer lugar las proteínas aumentadas en sepsis por gérmenes Gram - y después las proteínas aumentadas en gérmenes por Gram +. Este dato no ha sido valorado para este estudio y quedaría por investigar las diferencias del proteoma entre Gram - y Gram + en otro proyecto.

Tabla 16 Proteínas diferencialmente expresadas entre pacientes con infección ocasionada por bacterias Gram + y bacterias G-.

Gen	Elevado	Proteína
A2MG_HUMAN	Gram -	Alpha-2-macroglobulina
TRFE_HUMAN	Gram -	Serotransferrina
PLMN_HUMAN	Gram -	Plasminógeno
APOA4_HUMAN	Gram -	Apolipoproteína A-IV
FINC_HUMAN	Gram -	Fibronectina
PON1_HUMAN	Gram -	Paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica
ITIH1_HUMAN	Gram -	Inter-alfa inhibidor de tripsina cadena pesada H1
ALDOB_HUMAN	Gram +	Fructosa-bisfosfato aldolasa B
CFAB_HUMAN	Gram +	Complemento factor B
FCN2_HUMAN	Gram +	Ficolina-2
LYAM1_HUMAN	Gram +	L-selectina

4.5 PROTEÍNAS SELECCIONADAS

4.5.1 DISMINUIDAS EN LOS PACIENTES CON SEPSIS

La **apolipoproteína A-IV (APOA4)** es una lipoproteína sintetizada principalmente por los enterocitos del intestino delgado. Se secreta en la linfa como componente de los quilomicrones y en la sangre como componente principal del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y quilomicrones. Se han atribuido numerosas funciones a la ApoA4, (*Wang F, J Lipid Res. 2015*),

entre ellas se incluyen: protección de la arterioesclerosis, acción antiinflamatoria y antioxidante, participación en el transporte reverso del colesterol y en la absorción intestinal de lípidos. La ApoA4 puede actuar en la respuesta antiinflamatoria en enfermedades relacionadas con la SERPINA 3. (Zhang Y, *Biochem Biophys Res Commun* 2017). No existen estudios que vinculen la ApoA4 como biomarcador de sepsis.

La **glicoproteína sérica FA12 (FA12)**, es el factor XII de la coagulación (factor de Hageman). El factor XII es una glicoproteína sérica que participa en el inicio de la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y la generación de bradiquinina y angiotensina. En la sepsis los sistemas que regulan la coagulación y las plaquetas se encuentran fuertemente activados. En esta etapa, solo el factor XII se encuentra disminuido. Posteriormente en el caso de sepsis grave y principalmente en el shock séptico todos los factores de coagulación y las plaquetas disminuyen indicando un agotamiento de la hemostasia (*Mavrommatis AC; Crit Care Med. 2000*).

La **fibronectina (FINC)** es una glucoproteína de alto peso molecular. Se presenta en dos formas, una insoluble en la matriz extracelular y otra soluble en el plasma. Son unas proteínas que unen las superficies celulares y diversos componentes, incluidos el colágeno, la fibrina y la actina. Las fibronectinas están involucradas en la adhesión celular, la motilidad celular, la opsonización, la curación de heridas y el mantenimiento de la forma de las células. Se cree que participa en el aclaramiento inmunológico del tejido lesionado y de los microorganismos recubiertos de anticuerpos. Parece tener un papel importante en el proceso de fagocitosis mononuclear. Mejora la interacción entre los

fagocitos y las bacterias opsonizadas con anticuerpos y aumenta la actividad bactericida en los macrófagos. Mamani et al, estudian el valor de los niveles de Fibronectina y PCR en el diagnóstico de sepsis, comparan sepsis con controles y observan que los valores de fibronectina están disminuidos en los pacientes con sepsis en relación con los controles, el valor diagnóstico de este biomarcador tiene un valor en la curva ROC de 0.65 (95% IC 0,57-0,73), peor que el valor de la PCR (Mamani M, *Acta Med Iran.* 2012).

El **plasminógeno (PLMN)** es una proenzima de 90 kDa que está presente en el plasma en concentraciones abundantes. Está implicado en muchos procesos fisiológicos tales como la migración celular, curación de heridas, angiogénesis y embriogénesis. La coagulación y la fibrinólisis están conectadas con el sistema inmune. Muchas bacterias directamente actúan sobre el sistema homeostático del huésped para incrementar su virulencia. Las bacterias interactúan con el plasminógeno activando su producción utilizando el sistema proteolítico del huésped para su propio beneficio. (Peetermans M, *Crit Rev Microbiol.* 2016). La actividad proteolítica resultante les permite romper la barrera tisular y evadir la respuesta innata inmune de defensa, permitiendo su propagación. Diferentes bacterias producen activadores de plasminógeno específicos.

La **proteína de unión al retinol 4 (RET4)** pertenece a la familia de las lipocalinas y es el portador específico del retinol (alcohol de la vitamina A) en la sangre. Se le relaciona con la obesidad, con la resistencia a la insulina y con la diabetes tipo 2. (Zhou Z, *Lipids Health Dis.* 2017). En un grupo de pacientes con

sepsis esta proteína se encontró disminuida en relación con los controles. (*Hattori N, Shock. 2009*).

La **proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC)** es una molécula matricelular que regula las interacciones entre las células y su matriz extracelular circundante. Esta proteína se relaciona con funciones celulares fundamentales tales como la adhesión celular, la proliferación y la diferenciación. La SPARC también regula la expresión y la actividad de numerosos factores de crecimiento y de las metaloproteinasas de la matriz, esenciales para la degradación y la rotación de la matriz extracelular. Tiene un papel crítico en el desarrollo, lesión y reparación de tejidos y en la regulación de la respuesta inmune. En el cáncer juega un papel importante en la curación de los tejidos inflamados por los tumores.

4.5.2 AUMENTADAS EN LOS PACIENTES CON SEPSIS

La **proteína α 1-ácido glicoproteína (A1AG1)**, también conocida como Orosomucoide 1 (ORM), es una proteína de fase aguda sintetizada en el hígado. Además de ser una proteína de transporte en el torrente sanguíneo tiene una actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora relevante contribuyendo a mantener la homeostasis frente a un excesivo daño inflamatorio. Los estudios in vitro han demostrado que el ORM tiene varios efectos en todos los principales tipos de leucocitos: inhibe la proliferación de linfocitos, la quimiotaxis de neutrófilos, la generación de superóxido y la agregación plaquetaria, (*Hochepped T, Cytokine Growth Factor Rev 2003*). Además de los hepatocitos, los leucocitos y las células endoteliales pueden sintetizar ORM. El nivel sérico de ORM aumenta varias veces en respuesta a los estímulos agudos, como resultado de la

liberación de glucocorticoides y citoquinas (IL 1 β , IL-6, TNF- α), (*Fournier T, Biochim Biophys Acta 2000*).

Se han descrito concentraciones elevadas en suero de ORM en varias situaciones que conllevan activación de la inflamación, tales como enfermedades inmunológicas, enfermedad de Crohn, tumores e infecciones (*Cecilian F, Curr Protein Pept Sci 2007*). Xiao K y cols, han publicado un trabajo sobre el valor de la elevación del ORM sérico (AUC 0,79) como posible marcador de sepsis (*Xiao K, J Crit Care 2015*). El ORM en suero se eleva ligeramente durante la reacción de fase aguda. También se han visto elevaciones tempranas del orosomucoide en orina en pacientes con sepsis (*Kustan P, Clin Chem Lab Med 2017*).

La **alfa 1-antiquimotripsina (AACT)** es una glucoproteína sérica de fase aguda que pertenece a una clase de inhibidores de la serina proteasa llamados serpinas, también se conoce como serpina 3. Se sintetiza en el hígado, aunque se expresa en otros tejidos. Es un reactante de fase aguda y durante la respuesta de fase aguda, la concentración plasmática de serpina 3 aumenta hasta casi cinco veces. Se ha estudiado fundamentalmente en cerebro (Alzheimer) (*Dou C, Curr Alzheimer Res. 2013*), cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, para distinguir tuberculosis pulmonar de infección latente, dolor crónico, etc. No se han encontrado ningún trabajo específico de esta proteína como biomarcador de sepsis.

La **beta 2 microglobulina (B2MG)** es una proteína de bajo peso molecular liberada por los linfocitos T y B activados. Su semivida estimada es corta (2 h). Se ha demostrado que B2MG aumenta en varios trastornos inflamatorios y hematológicos, como el lupus eritematoso sistémico (LES), el

síndrome de inmunodeficiencia adquirida, el mieloma múltiple, el linfoma y la leucemia. Se ha relacionado con la amiloidosis en pacientes en hemodiálisis (Stoppini M, *J Biol Chem.* 2015) y se ha utilizado como marcador de daño renal agudo y marcador urinario de daño tubular. No se han publicado artículos relacionados con la B2MG como biomarcador de sepsis.

La **catalasa (CATA)** es la enzima que convierte el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno. Se produce en casi todos los organismos de respiración aeróbica, tanto plantas como mamíferos y sirve para proteger las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno. Promueve el crecimiento de células que incluyen células T, células B, células de leucemia mieloide, células de melanoma, células de mastocitoma y células de fibroblastos normales y transformados. (STRING). Se ha informado que los niveles de CATA son más altos en pacientes adultos con sepsis en comparación con los controles sanos (Warner A, *Clin. Chem* 1995). Asimismo, en el estudio de Ayar et al, (Ayar G. *Clin Biochem* 2017) se encontró que el nivel de CAT era significativamente más alto en los pacientes pediátricos con sepsis en comparación con el grupo de control. No hay estudios que utilicen la CATA como biomarcador único de sepsis.

El **antígeno de diferenciación de monocitos, (CD14)** es un receptor de reconocimiento de patrones que se presenta de dos formas: uno unido a la membrana (mCD14) y otro de forma soluble (sCD14). Ambas formas juegan un papel en el reconocimiento de LPS y en la activación celular. El subtipo CD14 soluble (sCD14-ST), también llamado presepsina, se eleva significativamente durante la inflamación y parece ser útil para diferenciar infecciones bacterianas de no bacterianas (Endo S, *J Infect Chemother* 2012). La presepsina normalmente

está presente en concentraciones muy bajas en el suero de individuos sanos. En respuesta a las infecciones bacterianas, su concentración aumenta en 2 horas (Masson S, *Intensive Care Med* 2015). Los estudios preliminares mostraron que la presepsina plasmática es un marcador de sepsis altamente sensible y específico, y su concentración se correlaciona significativamente con la gravedad del trastorno y la mortalidad hospitalaria de los pacientes con sepsis grave y shock séptico (Behnes M, *Crit Care*. 2014). En este estudio de Behnes el área bajo la curva (AUC) de la presepsina al diagnóstico fue de 0.80, comparable a la curva de la IL 6 y la procalcitonina. Estos resultados coinciden con los de Liu B con un área bajo la curva entre 0,79-0,82 (Liu B, *Crit Care* 2013). Debido a su peso molecular de 13 kDa, la presepsina se filtra a través de los glomérulos, luego se reabsorbe y se cataboliza dentro de las células tubulares proximales (Nagata T, *PLoS One*. 2015). Cada vez hay más datos de que los niveles de presepsina se ven afectados por la función renal. Se han encontrado niveles elevados de presepsina en pacientes con función renal disminuida y también se describió una correlación inversa entre la presepsina y el GFR. Por lo tanto, los niveles de presepsina deben interpretarse con más atención en pacientes con enfermedad renal. La presepsina en estos trabajos ha sido superior a la PCT, PCR e IL 6 para el diagnóstico de sepsis y ha demostrado un papel importante como factor pronóstico de la sepsis (Bloos F, *Virulence* 2014).

La LYAM1 o SELL también conocida como L-selectina es una molécula de adhesión celular localizada en la superficie de los leucocitos excepto en los T helper que se encuentra sobreexpresada por las citoquinas proinflamatorias. Su función es unirse a las células endoteliales e impedir la extravasación de fluidos. Presenta una forma soluble sL-selectina que se produce de la excisión de la L-

selectina adherida a las células endoteliales. Se ha estudiado más como marcador pronóstico que diagnóstico (*Seidelin JB, ICM 2002*). No existen estudios como biomarcador diagnóstico de sepsis.

La **Proteína C reactiva (PCR)**, ampliamente estudiada, se sintetiza en el hígado en respuesta a las citoquinas (IL-6, etc.) liberadas por la infección/inflamación. La PCR se ha utilizado más en el ámbito pediátrico (*Jaye DL, Ped Infect Dis 1997*). Su pico se alcanza entre las 36 y 50 horas del insulto, más tarde que otros biomarcadores tales como IL-6 y PCT (*Simon L, Clin Infect Dis. 2004*). El principal inconveniente de la PCR es su baja especificidad, su sensibilidad generalmente se considera alta. Como marcador de inflamación se eleva en muchas situaciones infecciosas y no infecciosas (infección viral, trauma, postoperatorio, etc.). Los pacientes con fallo hepático o en tratamiento con esteroides, presentan niveles reducidos de PCR.

La **proteína cadena beta (FIBB)** y la proteína **cadena gamma** del fibrinógeno (**FIBG**), junto con la cadena alfa (**FIBA**), participan en la hemostasia de la sangre en la formación de coágulos (*GeneCards, 2018*). Puede facilitar la respuesta inmune antibacteriana a través de vías innatas y mediadas por células T. Se han utilizado como biomarcadores en diferentes tipos de cáncer, pancreatitis, enfermedades neuromusculares, etc. No se han encontrado estudios que utilicen estas proteínas como biomarcadores únicos para el diagnóstico de sepsis. Se han identificado como marcadores para predecir y diagnosticar la coagulación intravascular diseminada en sepsis. (*Wakabayashi I, Clin Appl Thromb Hemost 2018*).

La **haptoglobina (HPT)** es una proteína plasmática producida principalmente en el hígado cuya función es capturar la hemoglobina (Hb) que se libera durante la hemólisis. La formación del complejo Hb-HPT reduce las propiedades oxidativas de heme/Hb y promueve el reconocimiento por el receptor del macrófago CD163. (*Andersen C, Antioxidants y Redox Signaling. 2017*). Este receptor facilita la fagocitación del complejo en el interior del citoplasma y su posterior transformación a bilirrubina, permitiendo el reciclado del hierro hem y previniendo el daño renal que se produce por el depósito de la hemoglobina libre en el riñón. La concentración de la HPT puede aumentar sustancialmente durante la inflamación aguda en respuesta a mediadores de fase aguda, interleucina-6, y otras citoquinas. A la inversa, la concentración puede disminuir a prácticamente cero durante la hemólisis acelerada debido a la eliminación de HPT mediada por el receptor del macrófago. En la clínica, la HPT es, por lo tanto, un marcador para la fase aguda de la infección (aumento de la HPT en plasma) y para la hemólisis (disminución en el plasma de HPT). La HPT también actúa como un antimicrobiano, antioxidante, tiene actividad antibacteriana y desempeña un papel en la modulación de muchos aspectos de la respuesta de fase aguda. Se ha utilizado junto con otros biomarcadores para el diagnóstico de sepsis, aunque sus valores no han sido lo suficientemente buenos como para incluirla en un panel de biomarcadores. (*Kelly BJ, Diagn Microbiol Infect Dis. 2016*).

La **proteína de unión al lipopolisacárido (LBP)** se ha estudiado como biomarcador para diferenciar entre pacientes infectados y no infectados. Todavía sigue siendo un tema de debate. En el 2016 un metaanálisis publicado por Chen KF y cols, (Chen KF, PLoS One, 2016) concluyen que este biomarcador tiene

débil sensibilidad y especificidad (curva ROC 0,68) para detectar sepsis, por lo que no recomiendan su utilización como único biomarcador. En otro trabajo reciente (*García de Guadiana R, Ann Clin Biochem 2018*) se compara la LBP frente a la PCT y a la PCR en pacientes con sepsis, concluyendo que la seguridad diagnóstica de los tres biomarcadores es similar con un área bajo la curva de 0,7 para LBP, 0,7 para PCR y 0,8 para la PCT.

La **lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)**, está presente en los neutrófilos y en varios otros tejidos tales como, colon, útero, tráquea, pulmón, estómago, próstata y glándula salivar. Su concentración se ha visto incrementada en células renales, intestinales, estómago e hígado en respuesta a una variedad de estímulos nocivos, entre los que se incluye la infección y la isquemia. El daño producido en las células tubulares renales ocasiona una producción local de NGAL que pasa a la sangre y orina (*Singer E, Acta Physiol (Oxf). 2013*). Se ha estudiado como biomarcador para predecir daño renal en pacientes con sepsis. Un reciente metaanálisis (*Kim S, Journal of Critical Care 2016*) destaca su alta sensibilidad y alto valor predictivo negativo para detectar la insuficiencia renal aguda en pacientes adultos con sepsis. Sin embargo, su baja especificidad y valor predictivo positivo limitan su utilidad clínica. Los niveles plasmáticos de NGAL no difieren significativamente en pacientes con sepsis y fallo renal de pacientes con sepsis sin fallo renal. La mayoría de los estudios van dirigidos a su perfil como biomarcador de fallo renal. A nivel de inmunidad, previene la adquisición de hierro por los microorganismos mediante el secuestro de los sideróforos bacterianos cargados de hierro. NGAL se emplea clínicamente en el diagnóstico de lesión renal aguda y puede ser útil en general en el diagnóstico diferencial de un proceso infeccioso mediado por

bacterias. Se han detectado niveles elevados de NGAL en la sangre de pacientes con infección bacteriana del tracto urinario, neumonía adquirida en la comunidad, sepsis, así como en el líquido cefalorraquídeo y líquido peritoneal de pacientes con meningitis bacteriana y peritonitis (*Nasioudius D, Med Microbiol 2015*).

La **Proteína 1 citosólica de linfocitos** (plastina-2) (**PLSL**) es una proteína de unión a la actina. Juega un papel en la activación de las células T en respuesta a la coestimulación a través de TCR/CD3 y CD2 o CD28. Modula la expresión de la superficie celular de IL2RA/CD25 y CD69. La isoforma L-plastina se ha considerado como biomarcador de cáncer. Esta isoforma juega un papel importante en funciones de los macrófagos tales como la defensa del huésped contra las infecciones bacterianas (*Hagi A, Microbiology and Immunology. 2006*). No hay artículos en la literatura que relacionen esta proteína con biomarcadores de sepsis.

La **procalcitonina (PCT)** es un precursor de la calcitonina, hormona capaz de reducir los niveles de calcio plasmático. Junto con la PCR es uno de los biomarcadores más utilizados para el diagnóstico de infección. Es más sensible y específica que la PCR en la infección bacteriana (*Simon L*). Pero al igual que la PCR no es específica para el diagnóstico de infección, este biomarcador se eleva en otras situaciones tales como trauma. También se eleva mas en los pacientes críticos que han sido intervenidos quirúrgicamente.

Un metaanálisis publicado por Scheutz (*Scheutz P, Arch Intern Med 2011*) al igual que Brechot et al (*Brechot N, Int J Antimicrob Agents, 2015*) revisan la validez

de este biomarcador como indicador de discontinuación de tratamiento antibiótico, papel que actualmente está cobrando relevancia en la clínica diaria.

Según concluye Rowland T, en una revisión sobre el papel de la PCT en el diagnóstico y tratamiento de la sepsis, la procalcitonina no debería usarse como una única prueba de diagnóstico para descartar la presencia de sepsis o infección bacteriana, o para el pronóstico. En cambio, si se utiliza como parte de un algoritmo clínico, ha demostrado que puede reducir la prescripción de antibióticos en la UCI (*Rowland T, Adv Clin Chem. 2015*).

4.6 ANÁLISIS DE LAS PROTEINAS PARA VALIDACIÓN

Se realizó otro análisis estadístico mediante representación gráfica de p value frente a Max fold para intentar identificar de las 44 proteínas diferenciadas, cuáles eran las que presentaban más significación estadística y mayor Max fold (Figura 11). Para ello se seleccionaron solo las proteínas diferenciadas entre sépticos y controles que presentaban un valor de $p < 0,001$. Señaladas con números se encuentran aquellas proteínas vinculadas con procesos de defensa.

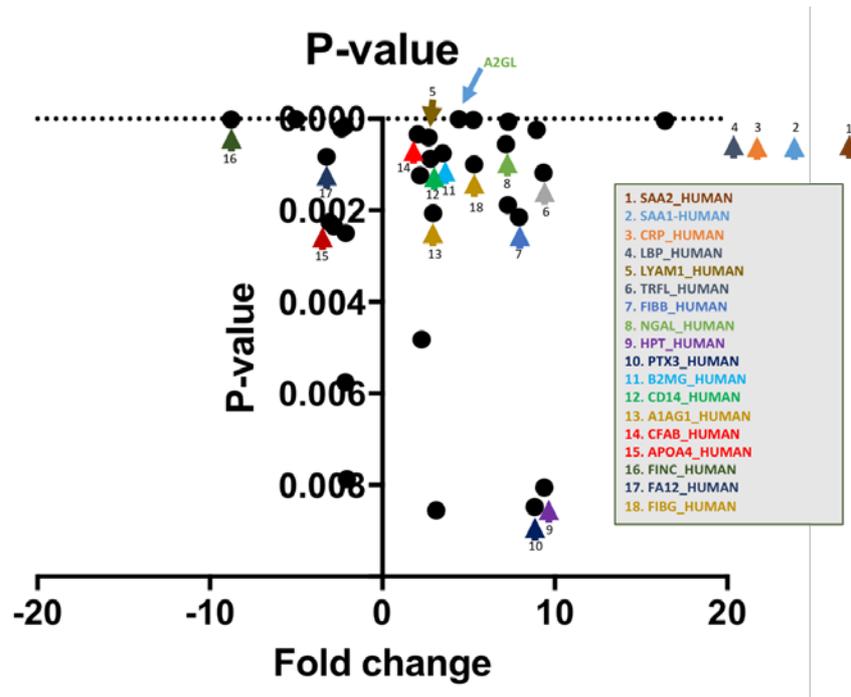


Figura 11. Representación gráfica de las proteínas con mayor fold change y p-value. Marcadas con número y flecha las proteínas que intervienen en los procesos biológicos implicados en la infección.

En base a este análisis previo se decidió estudiar aquellas proteínas que participaran en el mayor número de procesos biológicos (Tabla 15) y que tuvieran un valor estadístico alto (Figura 10). Se descartaron aquellas proteínas ya estudiadas y que presentaban valores altos similares a las proteínas del estudio (LBP, PCR y CD14). En la figura 12 se muestra el flujograma seguido para la selección de las proteínas.

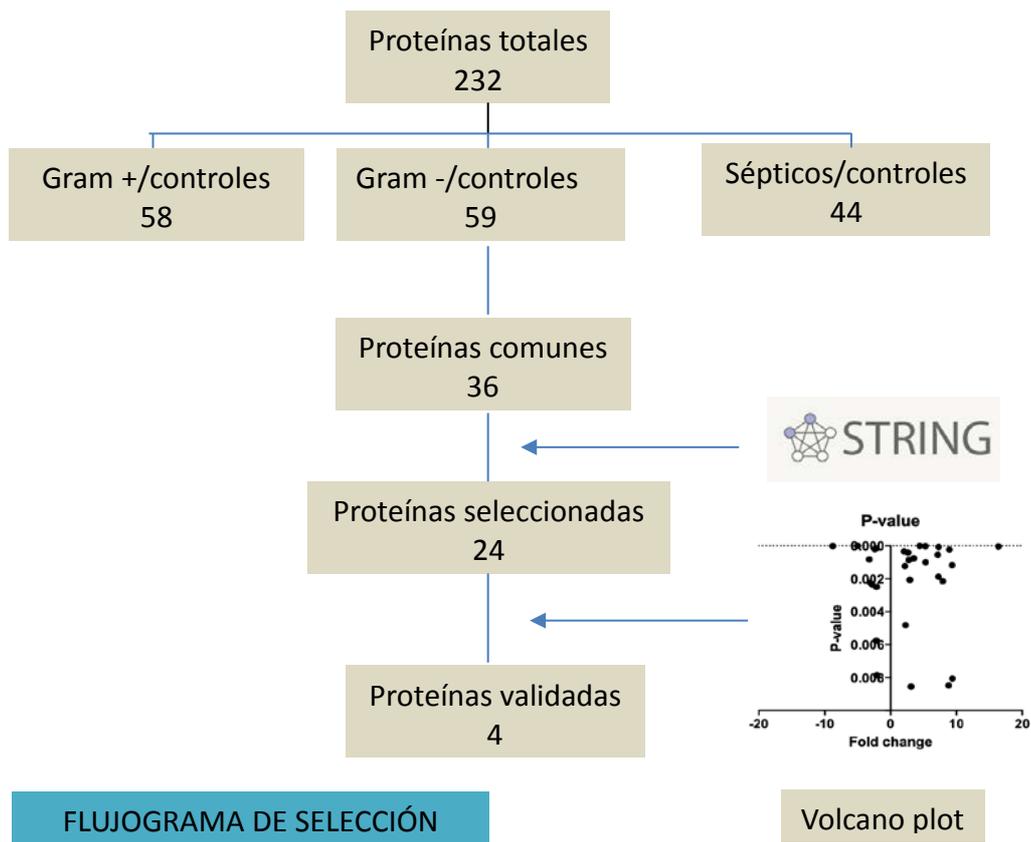


Figura 12. Flujograma para la selección de las proteínas.

Entre las 24 proteínas se eligieron las siguientes: (Ver tabla15 y Figura 11).

- **LTF (TRFL)** Lactotransferrina participa en 13 procesos biológicos de respuesta inmune y defensa frente a bacterias. Con un valor estadístico alto.
- **CFB (CFAB)** proteína factor B del complemento que participa en 12 procesos biológicos y que también posee un valor alto de significación.
- **SAA-1**, Serum Amiloide A 1 participa en 11 procesos biológicos relacionados con la defensa del huésped. Como proteína de respuesta de fase aguda, presenta una de las respuestas más elevadas en la respuesta inflamatoria con incrementos significativos de su valor basal. Demuestra un valor un valor alto de significación.

- **A2GL (LRG1)** alfa-2-glicoproteína rica en leucina 1, proteína detectada como una de las más significativas, aunque no relacionada con mecanismos de defensa inmune conocidos. Participa en la respuesta a estímulos.

Dada la importancia del proceso inflamatorio en la sepsis, a estas 4 proteínas se añadieron otras 2, la cadena alfa del receptor soluble de la interleucina-2 (**sCD25**) y el receptor soluble de barrido tipo 1 rico en cisteína (**sCD163**), que se utilizan como biomarcadores en el diagnóstico y seguimiento de la actividad de la linfocitosis hemofagocítica (HLH) (*Weitzman S, Am Soc Hematol Educ Program 2011*), ejemplo de enfermedad inflamatoria con desregulación inmune y respuesta inflamatoria excesiva (*Tothova Z, J Intensive Care Med 2015*). Varios estudios sugieren que tanto el sCD163 como la sCD25 podrían ser marcadores prometedores de sepsis (*Llewelyn MJ, Crit Care 2013* y *Kjærgaard AG, PLoS One 2014*).

Los valores de las 6 proteínas analizadas en los pacientes y controles se recogen en la tabla 17. Los valores de las proteínas se midieron mediante una técnica de ELISA tipo sándwich utilizada por el fabricante. Se muestran los valores de la media en pacientes sépticos y controles, así como la sensibilidad y especificidad de cada proteína y el valor del área bajo la curva ROC. Las proteínas SAA1, sCD25, LTF y CD163 mostraron valores más altos en los pacientes sépticos y los otros dos, LRG1 y CFAB, valores mas bajos.

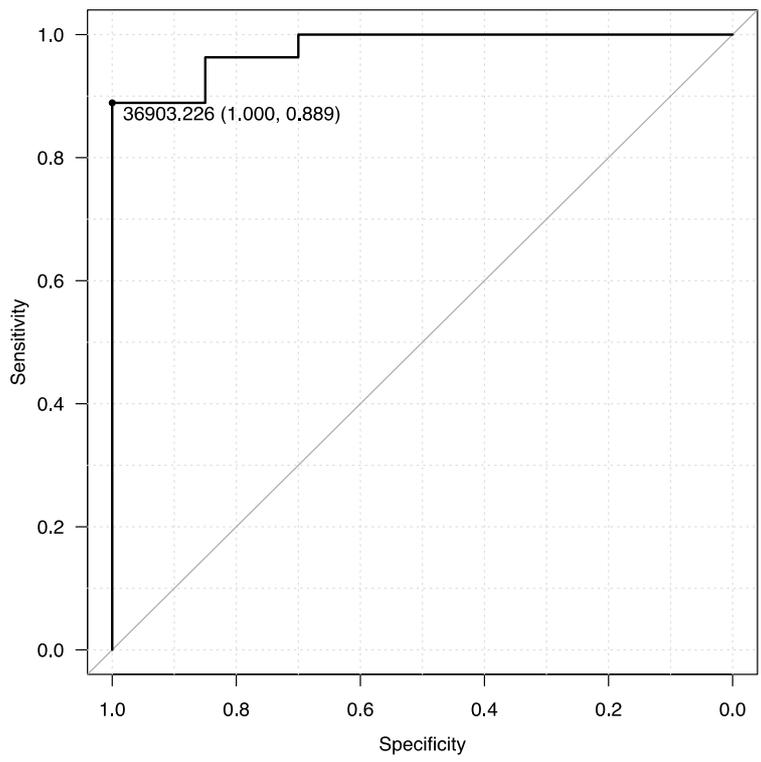
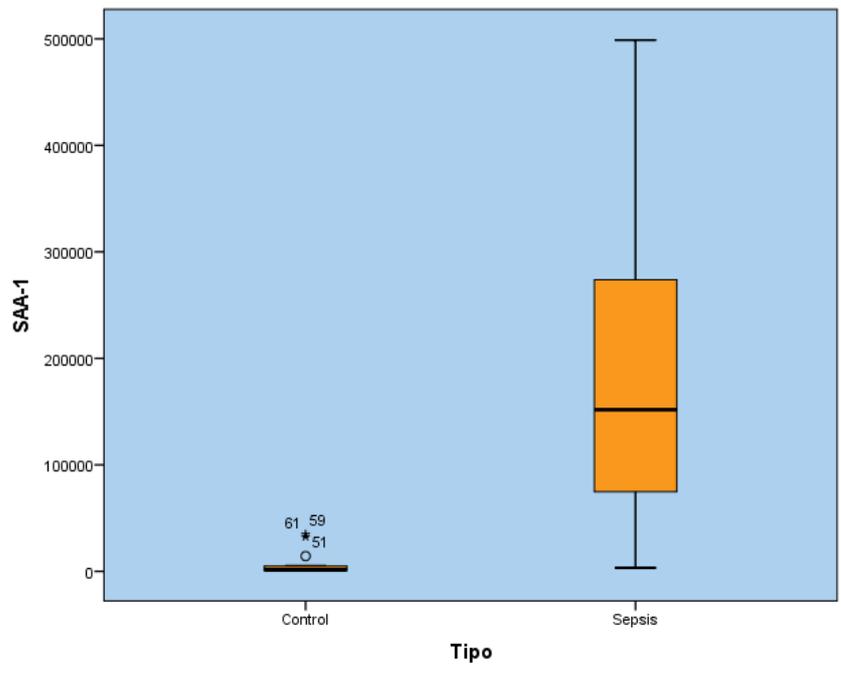
Tabla 17. Concentraciones séricas de las proteínas validadas mediante técnica de ELISA, sensibilidad y especificidad y área bajo la curva.

Proteína	Sepsis (media DS)	Controles (media DS)	Sensibilidad	Especi- ficidad	Área bajo la curva (IC 95%) (DeLong)	Valor de p
SAA1 ng/mL	188.472,7 ± 148.147,6	5.965,7 ± 10.308,8	0,889	1	0,978 (0,946-1)	< 0,001
sCD25 pg/mL	11.886,1 ± 11.334,7	2.119,1 ± 500,5	0,946	1	0,97 (0,92-1)	< 0,001
LRG1 ng/mL	518.033,8 ± 165.660,8	796.404,7 ± 42.626,6	0,897	1	0,937 (0,85-1)	< 0,001
LTF ng/mL	51.940,2 ± 71.933,6	9.640,8 ± 9.840,9	0,724	0,9	0,83 (0,71-0,94)	< 0,001
sCD163 pg/mL	1.291,4 ± 644,4	915,3 ± 377	0,595	0,8	0,68 (0,51-0,85)	0,079
CFAB ng/mL	188.472,7 ± 148.147,6	316.717,6 ± 431.55,4	0,621	0,73	0,65 (0,49-0,8)	0,078

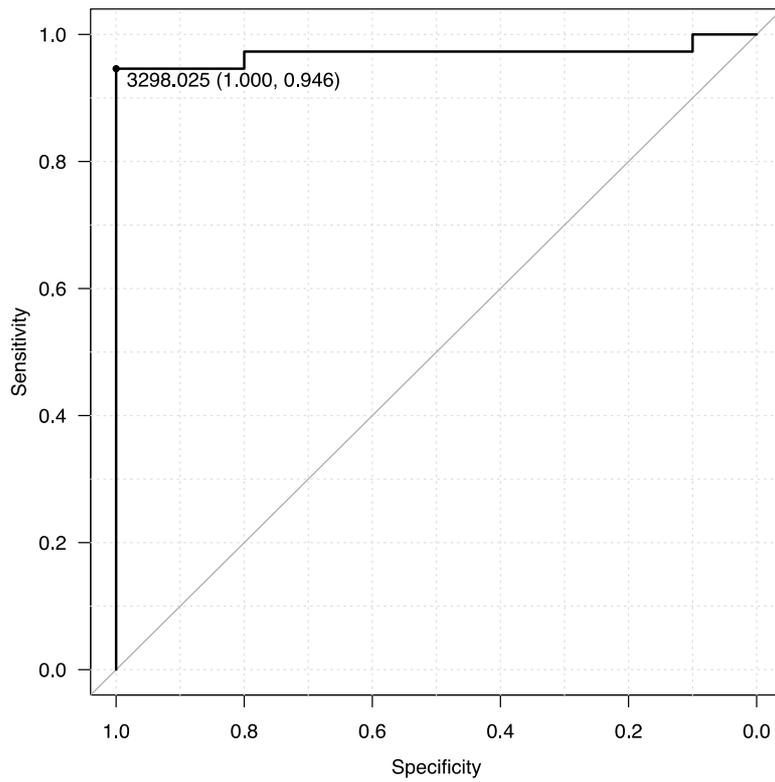
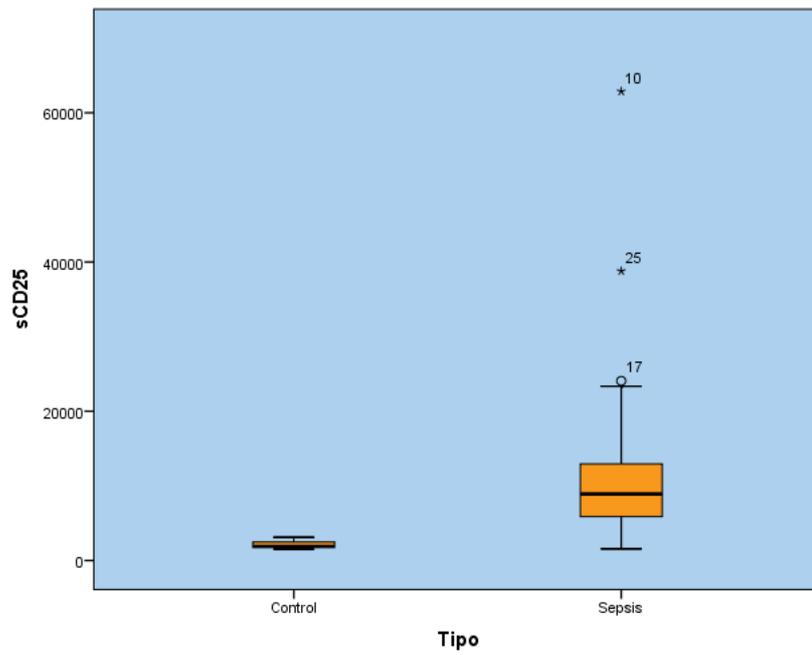
Se realizó la prueba de Kolmogorv-Smirnov para muestras independientes con el objetivo de determinar si las muestras obtenidas de las proteínas seguían una distribución normal. Solamente la sCD163 y la CFAB seguían una distribución normal.

Se realizaron comparación de medias mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney de todas las proteínas estudiadas entre pacientes sépticos y controles. Las proteínas SAA1, sCD25, LRG1 y LTF, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes sépticos y los controles. Los valores de significación estadística se reflejan en la tabla 17.

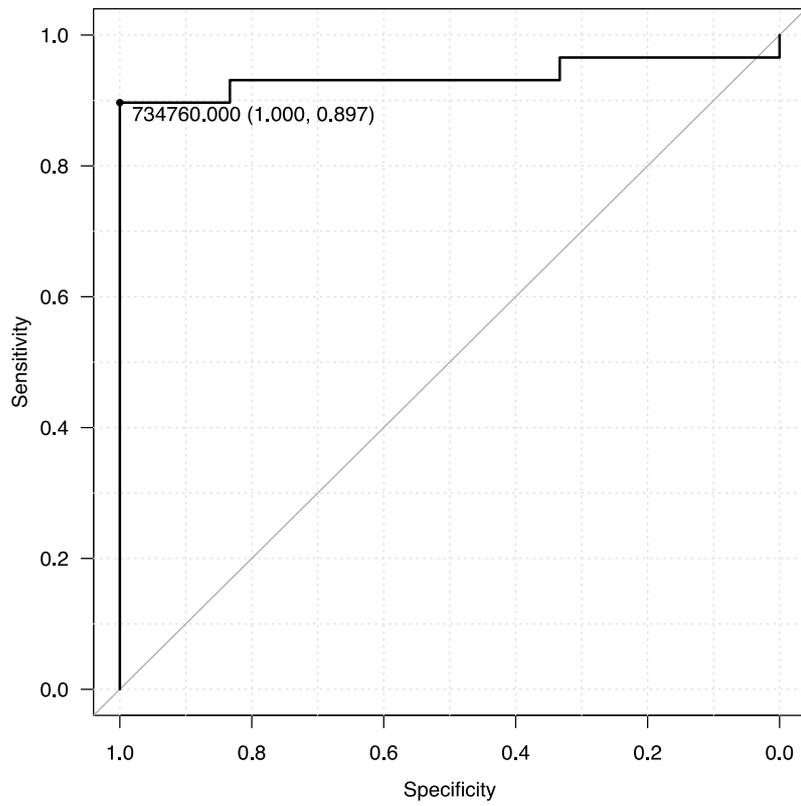
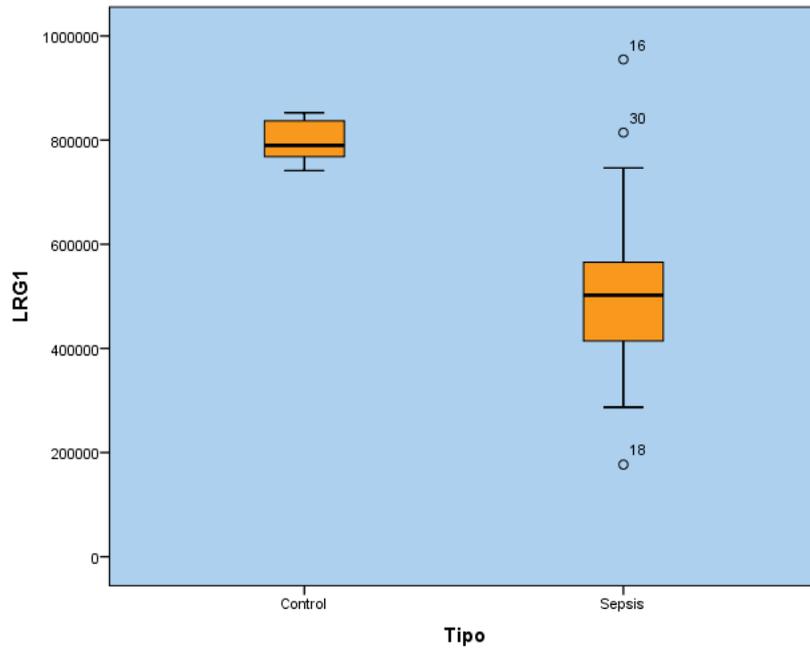
Posteriormente se analizaron las curvas ROC de cada proteína para evaluar su sensibilidad y especificidad como biomarcadores para diferenciar controles de pacientes sépticos. (Tabla 17 y Figura 13)



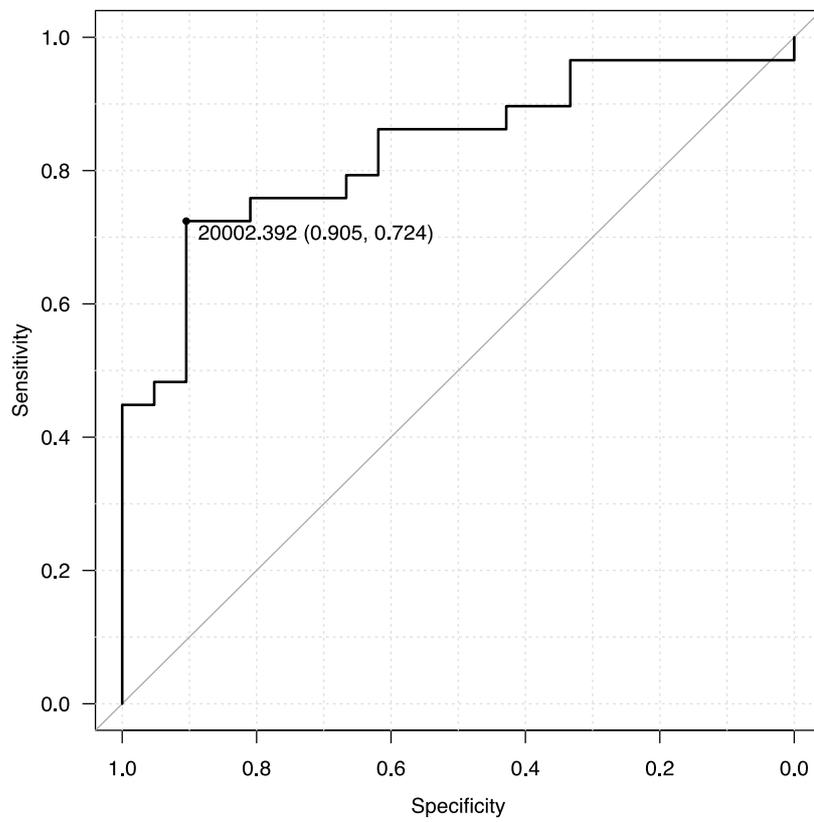
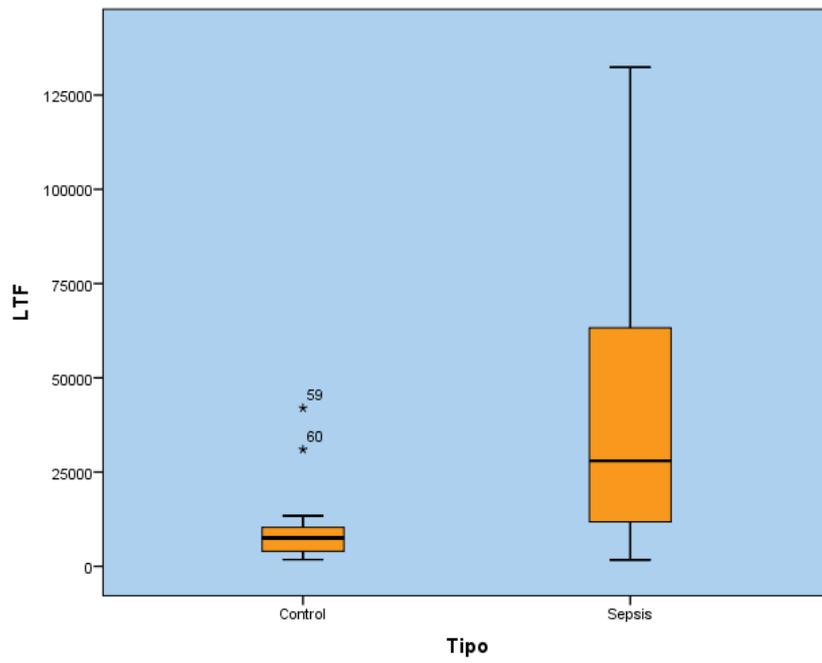
SAA1. ng/mL



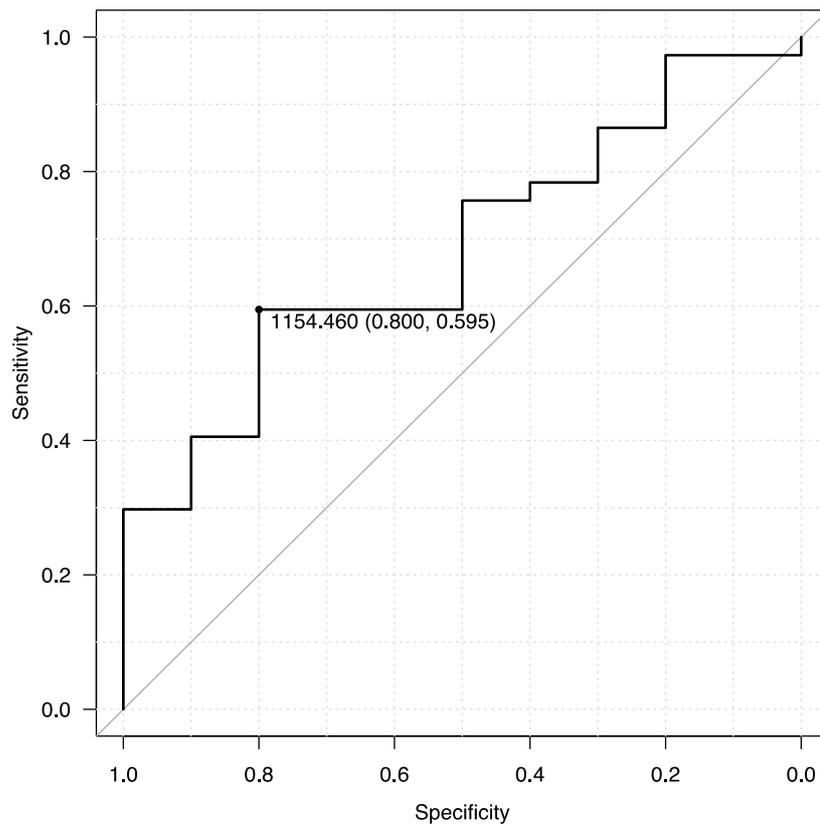
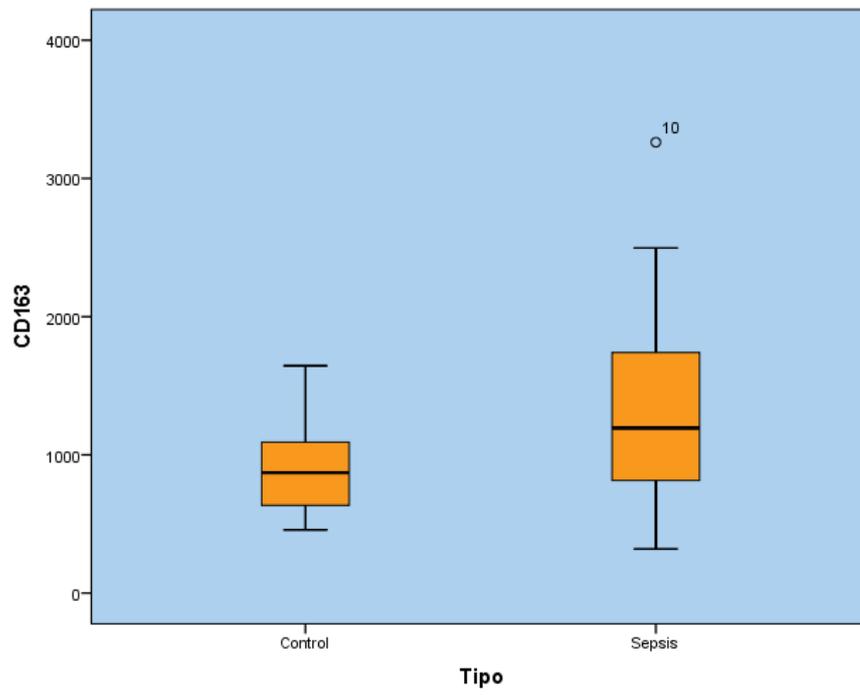
sCD25. pg/mL



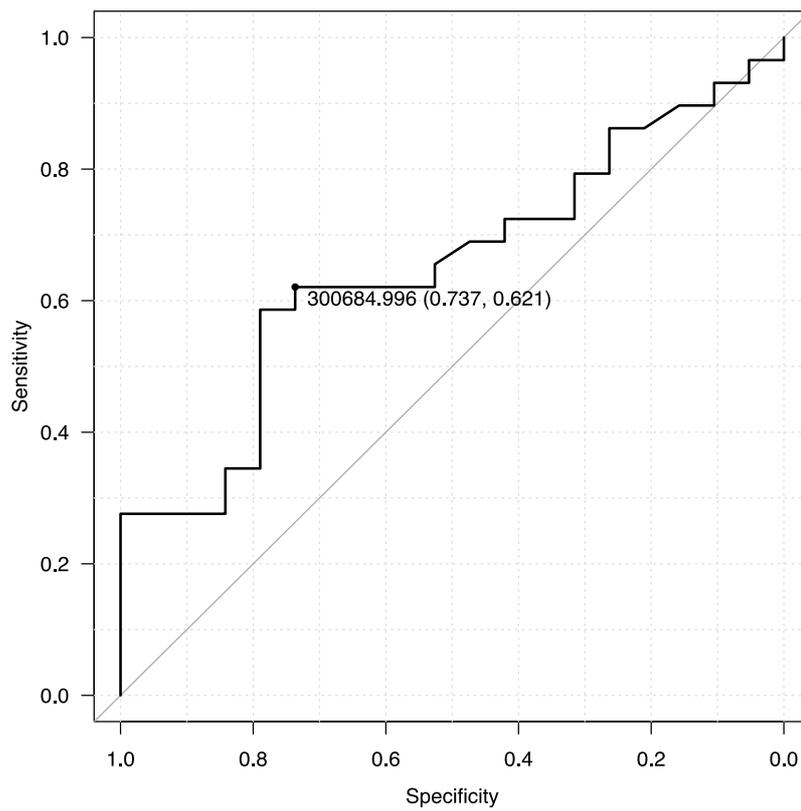
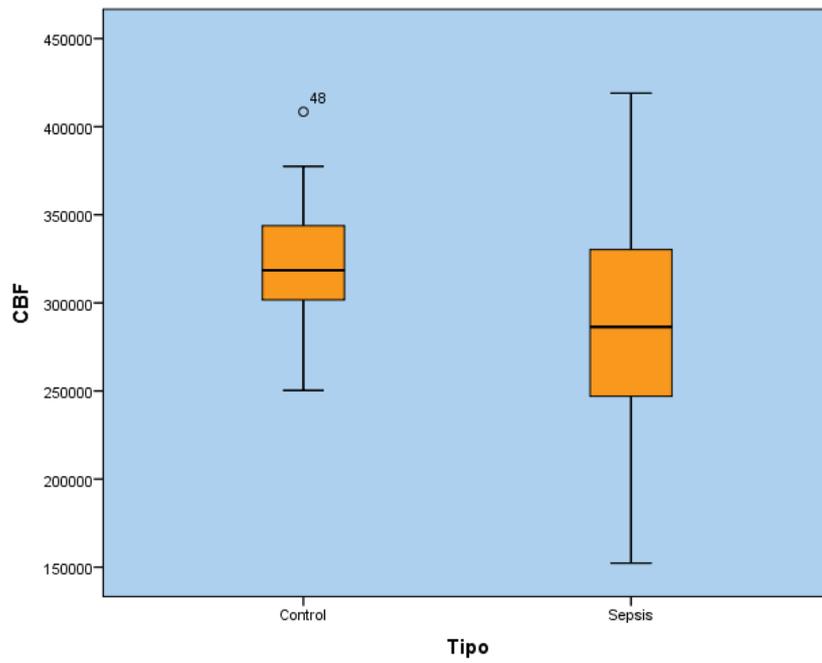
LRG1. ng/mL



LTF. ng/mL



CD163. pg/mL



CFAB. ng/mL

Figura 13. Valores de proteínas en suero de los pacientes y curvas ROC.

Los puntos de corte obtenidos mediante el índice de Youden para cada biomarcador a partir del cual se considera positivo fueron los siguientes:

SAA1: 35.891 ng/mL
sCD25: 3.209 pg/mL
LRG1: 738.036 ng/mL
LTF: 16.349 ng/mL
CD163: 1.123 pg/mL
CFAB: 296.919 ng/mL

Realizamos correlaciones bivariadas entre los diferentes biomarcadores: Lactato, PCT, PCR, sCD25, CD163, SAA1, CFAB, LTF y LRG1. Las correlaciones obtenidas se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Correlaciones entre las diferentes proteínas.

	SAA-1	CFAB	LTF	CD163	sCD25	LRG1	PCR	PCT	Lactato
SAA-1	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 ,228 47	,183 ,000 45	,521** ,539 47	-,104 ,225 37	,204 ,243 33	-,209 ,033 27	,412* ,690 27	,081 ,221 27
CFAB	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,183 ,228 45	1 ,260 48	,166 ,019 48	-,385* ,175 37	-,228 ,121 35	,267 ,140 29	,281 ,007 29	-,488** ,528 29
LTF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,521** ,000 47	,166 ,260 48	1 ,593 50	,088 ,247 39	,190 ,167 35	-,239 ,100 29	,312 ,714 29	-,071 ,707 29
CD163	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,104 ,539 37	-,385* ,019 37	,088 ,593 39	1 ,015 47	,353* ,315 30	,190 ,461 37	-,125 ,028 37	,360* ,343 36
sCD25	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,204 ,225 37	-,228 ,175 37	,190 ,247 39	,353* ,015 47	1 ,736 30	-,064 ,847 37	,033 ,266 37	,188 ,645 36
LRG1	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,209 ,243 33	,267 ,121 35	-,239 ,167 35	,190 ,315 30	-,064 ,736 30	1 ,234 35	-,283 ,221 29	-,025 ,898 29
PCR	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,412* ,033 27	,281 ,140 29	,312 ,100 29	-,125 ,461 37	,033 ,847 37	,234 ,221 29	1 ,644 39	-,076 ,251 38
PCT	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,081 ,690 27	-,488** ,007 29	-,071 ,714 29	,360* ,028 37	,188 ,266 37	-,283 ,137 29	-,076 ,644 39	1 ,936 38
Lactato	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,244 ,221 27	-,122 ,528 29	-,073 ,707 29	,163 ,343 36	-,079 ,645 36	-,025 ,898 29	,191 ,251 38	-,013 ,936 38

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Se observa una correlación entre la proteína SAA1 y LTF con una $r = 0,52$ y entre SAA1 y PCR con una $r = 0,412$. También se observa una correlación negativa entre la PCT y el CFAB con una $r = 0,488$.

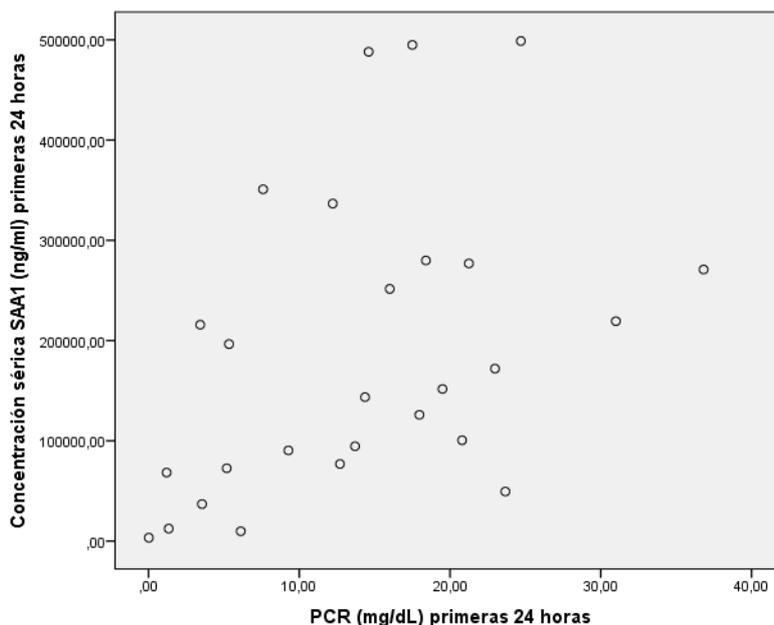


Figura 14. Diagrama de dispersión simple que demuestra la correlación entre las proteínas PCR y la SAA1.

De las 6 proteínas seleccionadas como posibles biomarcadores, 4 proteínas (SAA1, LRG1, sCD25 y LTF) presentaban una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes sépticos y los controles y un área bajo la curva ROC para distinguir sepsis de controles superior a 0,8.

De estas 4 proteínas 3 (SAA1, LRG1 y sCD25) muestran una significación estadística y sensibilidades y especificidades altas con un área bajo la curva para distinguir sepsis de controles excelente $> 0,9$. Como se ha reflejado previamente en la tabla 17.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La sepsis constituye un problema de salud global que asocia una morbilidad y mortalidad significativas y cuya incidencia a pesar de los avances en la prevención sigue en aumento (*Schuller KA Clin Pediatr (Phila) 2017* y *Ruth A Ped Crit Care Med 2014*). El insuficiente conocimiento de la fisiopatología, la falta de marcadores diagnósticos sensibles y específicos tempranos y la incapacidad de estratificar oportunamente a los pacientes con herramientas de pronóstico fiables, pueden explicar el frecuente retraso en su reconocimiento y tratamiento (*Oliveira CF, Pediatr Emerg Care 2008*). Aunque la inmunidad innata y la inflamación sistémica se consideran generalmente como un mecanismo de defensa de primera línea contra la invasión microbiana, la respuesta inmune/inflamatoria aumentada que producen puede contribuir a las complicaciones relacionadas con la sepsis (*Hotchkiss RS, Rev Immunol 2013*).

Se han identificado dos fases en la fisiopatología de la sepsis: una fase caracterizada por un aumento sustancial de los mediadores proinflamatorios que incluyen citoquinas y marcadores inflamatorios sistémicos, entre otros, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (PCR), y otra fase de inmunoparálisis, inmunodisregulación con aumento de mediadores antiinflamatorios (*Gentile LJ, J Trauma Acute Care Surg 2012*), entre los que se incluyen la IL10 y el sCD25. La amplitud de la respuesta necesita ajustarse para lograr por un lado la eliminación efectiva de patógenos y a la vez que se limite y se evite la toxicidad y el daño colateral del tejido producido por el exceso de inflamación (*Chan J J. Clin. Invest 2012*).

La administración precoz de antibióticos sigue siendo el único tratamiento eficaz de la sepsis (*Seymour CW NEJM 2017*), por lo que es fundamental reconocer precozmente la infección. Definir la "Fase precoz" de la sepsis es difícil porque se hace imposible determinar el "tiempo cero" en la sepsis humana. Se recomiendan administrar antibióticos dentro de la primera hora de la presentación (*Rhodes A, Crit Care Med 2017*) porque cada retraso de 1 h se asocia con una supervivencia disminuida del 4-6% (*Kumar A, Curr Infect Dis Res 2010*).

La importancia del tratamiento precoz nos plantea la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, una línea de investigación importante, para llegar a la identificación precoz de la sepsis. Hasta ahora ningún biomarcador por sí solo ha sido lo suficientemente específico y sensible para diagnosticar a los pacientes de sepsis con garantías. Hay un gran interés científico como se demuestra por los más de 7.500 artículos publicados en PubMed si se combinan los términos sepsis y biomarcador.

En el 2010 Pierrakos y Vincent, (*Pierrakos C Crit Care 2010*), publicaron una revisión sobre los biomarcadores en sepsis y encontraron 3.370 referencias y 178 biomarcadores diferentes. Tras su revisión concluyeron que ninguno de ellos tiene la suficiente especificidad o sensibilidad para emplearse de forma rutinaria en la práctica clínica. La PCT y PCR eran ya entonces los más utilizados, pero poseen una capacidad limitada para poder distinguir la sepsis de otras afecciones inflamatorias o para predecir sus resultados. A pesar de las numerosas investigaciones, poco ha cambiado para la práctica clínica en los últimos 8 años. De los 178 biomarcadores que encontraron, 34 habían sido utilizados específicamente en el diagnóstico de sepsis y de estos solo 5 (CD11b,

CD64, IL 12, proteína-10 inducida por interferón gamma y fosfolipasa A2), tenían una sensibilidad y especificidad mayor del 90%.

De estas 34 proteínas valoradas para su uso en sepsis en esta revisión (*Pierrakos C, Crit Care 2010*) dos proteínas (**LBP y pentraxina**) coinciden con las 44 proteínas seleccionadas en nuestro estudio.

El reciente desarrollo de la proteómica está permitiendo descubrir nuevas proteínas implicadas en diferentes procesos biológicos. La Proteómica basada en espectrometría de masas ofrece una herramienta eficaz para identificar biomarcadores y ayudar a entender la fisiopatología de las enfermedades. A diferencia del genoma, el proteoma es dinámico variando según el tipo y el estado funcional de la célula. Durante la última década, los estudios de biomarcadores de proteínas han permitido avances en el diagnóstico precoz y no invasivo de enfermedades importantes, tales como infarto de miocardio y cáncer de próstata (*Catalona WJ, JAMA 1998 y Danesh J, N Engl J Med 2004*).

Existen 2 métodos principales para la separación de proteínas, uno basado en gel (electroforesis bidimensional en gel) y otro basado en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). En nuestro trabajo de investigación decidimos utilizar el método basado en LC-MS por su mayor sensibilidad. En otros estudios en sepsis se han llegado a identificar por este método entre 100 y 3.000 proteínas (*Sharma NK, Shock 2017*).

En los estudios de proteómica de sepsis se utilizan diferentes muestras biológicas, incluyendo líquidos, (plasma, suero, orina), tejidos (hígado y corazón)

y células (neutrófilos y macrófagos). (Figura 15). Cada uno de ellos con sus ventajas y limitaciones.

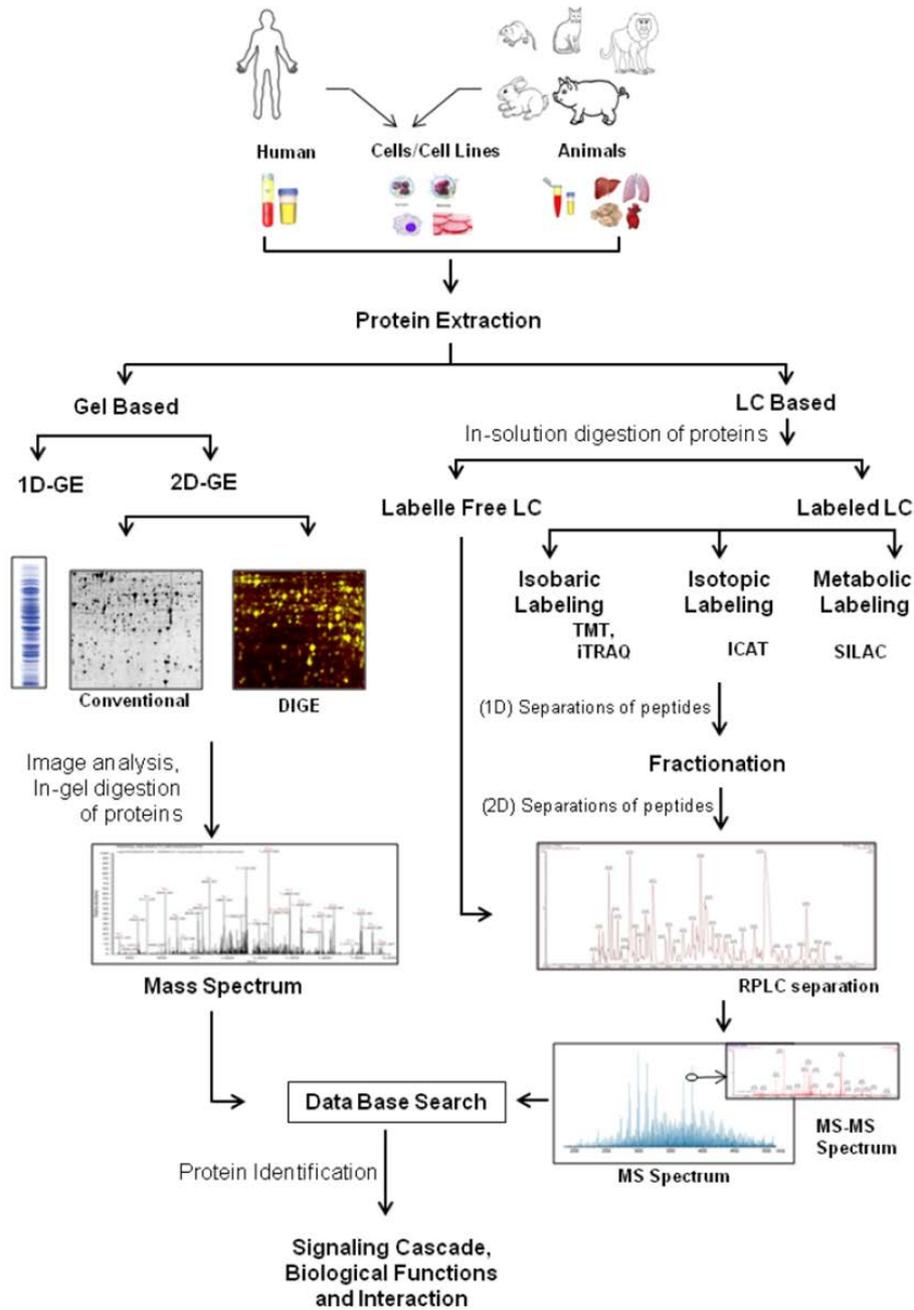


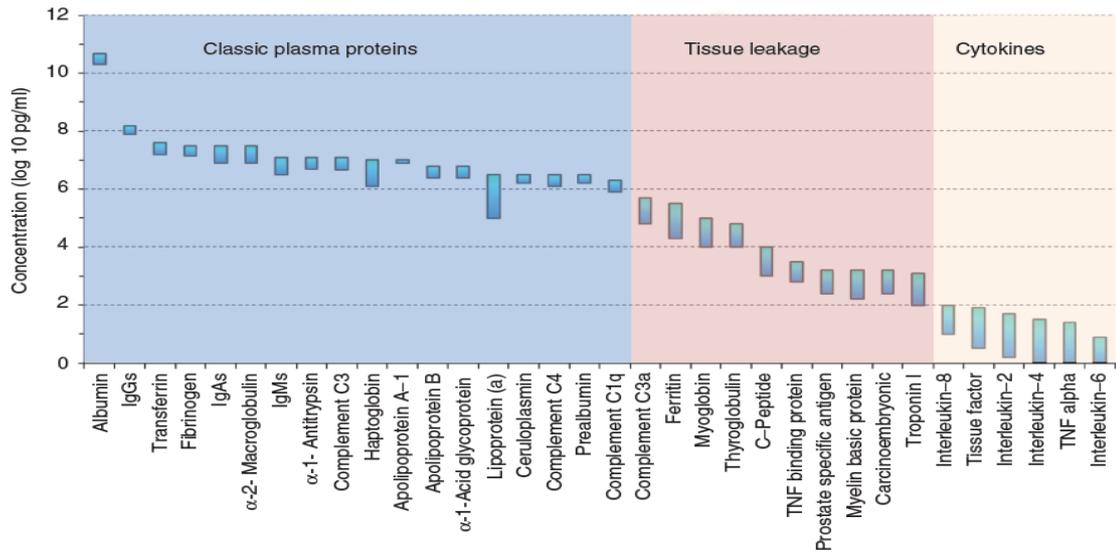
Figura 15. Representación esquemática de un ejemplo del análisis de proteómica. Tomado de Sharma NK. Shock, 2017.

El suero que es la muestra que se ha seleccionado en este estudio tiene como ventajas que no es invasivo, es fácil de obtener, barato, tiene información

del sistema circulatorio y permite obtener biomarcadores diagnósticos y pronósticos. Por el contrario, posee un rango dinámico alto, las concentraciones de los biomarcadores suelen ser bajas y existe una variabilidad alta entre sujetos. Las proteínas detectadas en suero no siempre reflejan plenamente el daño del órgano en cuestión. Existen diferencias en el perfil proteómico según las edades, siendo diferente el proteoma en el neonato que el paciente adulto. Las manifestaciones clínicas, así como la expresión de proteínas de fase aguda (PCT) son diferentes según la edad. (Cao Z, *Proteomics Clin Appl* 2014).

En el suero, las proteínas varían de altas concentraciones como la albúmina, a bajas, como algunas citoquinas y proteínas secretadas o filtradas en la sangre. El proteoma está representado principalmente por proteínas de alta abundancia, así las 22 proteínas más abundantes representan aproximadamente el 99% de la masa total de proteínas (Figura 16) - (Anderson NL, *Mol Cell Proteomics* 2005). Incluso después de la depleción (disminución de la concentración de las proteínas más abundantes) del suero, el análisis de las proteínas plasmáticas restantes supone un enorme desafío. En parte debido a la depleción, proteínas de bajo peso molecular como la PCT no aparezcan entre las proteínas obtenidas en nuestro estudio.

A. Rango de proteínas en plasma.



B. Porcentaje de cada proteína en plasma.

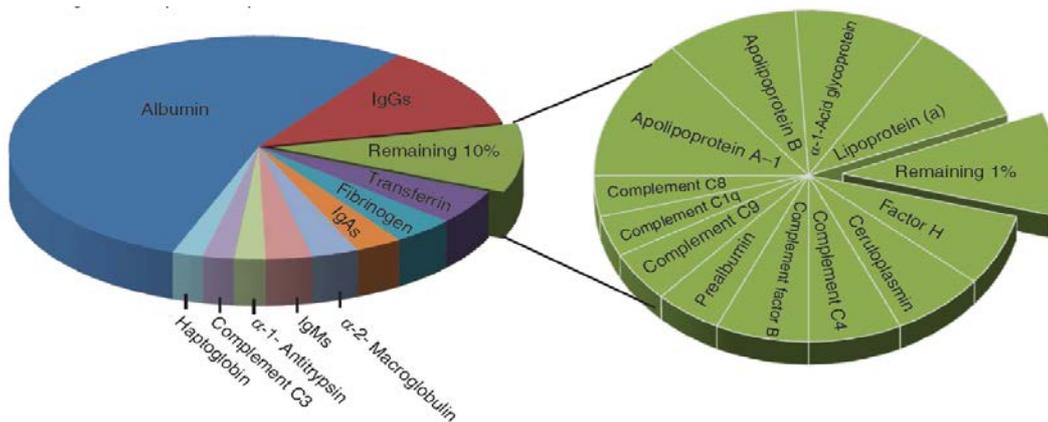


Figura 16. Rango (A) y porcentaje (B) de las proteínas en plasma. Tomado de: Baker ES, Liu T, Petyuk VA, Burnum-Johnson KE, Ibrahim YM, Anderson GA, Smith RD. Genome Med (2012)

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SEPSIS

La población estudiada reúne a 40 pacientes con sepsis ingresados en UCIP, 7 pacientes con una sepsis grave y 33 con shock séptico, de acuerdo con la definición de la conferencia consenso de sepsis pediátrica del 2002, (*Goldstein B PCCM 2005*). Los pacientes seleccionados cumplían criterios clínicos de sepsis. No todos los pacientes tenían una confirmación bacteriológica de infección. La positividad de los cultivos se obtuvo en el 57% de las sepsis graves y en el 51% de los shocks sépticos, cifras similares a los porcentajes referidos en otras series (30-50% de hemocultivos positivos en sepsis y shock séptico) (*Dellinger RP Intensive Care Med 2013*). El foco más frecuente de infección en los pacientes pediátricos fue endovascular (57%), seguido de neumonía. A diferencia de los adultos donde el foco más frecuente es la neumonía. Los gérmenes más frecuentes aislados en este estudio fueron el meningococo (57%), seguido del estreptococo piógeno (19%) y el neumococo (9,5%), gérmenes habituales en las sepsis pediátricas (*Aneja RK, CIDR 2011*). A destacar que un alto porcentaje de pacientes 14 (35%) en la serie estudiada y 25 (49%) en el global de los pacientes sépticos, presentaban comorbilidades. (inmunodeficiencia, enfermedad neurológica, enfermedad respiratoria crónica, cardiopatía congénita).

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizaron determinaciones analíticas de PCR, PCT y lactato, dentro de los estudios habituales que se realizan en los pacientes graves con sospecha de infección. La PCR fue negativa en 7 pacientes (17,5%), 3 de ellos con infección confirmada

por hemocultivo. Como se confirma en la literatura, un porcentaje alto de pacientes con sepsis no presentan elevaciones de esta proteína y el diagnóstico de sepsis puede establecerse en pacientes con PCR negativa.

En el caso de la PCT, 4 pacientes (10%) tuvieron un valor considerado negativo de la proteína. En este caso ninguno de ellos tenía una infección confirmada por hemocultivo. Veintitrés pacientes presentaron a su ingreso cifras elevadas de lactato (57,5%), frente a 17 que tenían valores normales. Esto también confirma que estos marcadores de infección utilizados habitualmente, incluso realizados a pacientes con alta sospecha clínica de sepsis o shock séptico son poco fiables como marcadores diagnósticos para determinar si un paciente presenta una infección grave o sepsis. (*Lautz AJ, J Pediatr. 2016*)

En esta serie de 40 pacientes pediátricos, la mortalidad se sitúa en el rango bajo de las tasas reportadas (10-20%) (*Black RE, Lancet 2010*). Teniendo en cuenta que el 82,5% de los pacientes presentaban un shock séptico, solo fallecieron dos pacientes (5%). Esto confirma los mejores resultados obtenidos en los pacientes pediátricos en relación con la mortalidad en los pacientes adultos. (*Fleischmann C, AJRCCM 2016*).

5.2. PROTEINAS SELECCIONADAS COMO POSIBLES BIOMARCADORES

De las 232 proteínas identificadas, 44 reunían los criterios definidos para el estudio (cambio en el valor basal mayor de 2 y una significación estadística con una p menor de 0,05). Por lo tanto, estas 44 proteínas se postularon como posibles marcadores de diferenciación entre pacientes sépticos y sanos. Doce

proteínas estaban disminuidas y 32 elevadas en los pacientes con sepsis respecto a los controles (Tabla 13 y Figura 11).

En un estudio previo de proteómica realizado por nuestro grupo en pacientes adultos con sepsis mediante el procedimiento basado en electroforesis en gel, se encontraron sólo 7 proteínas diferenciadas entre controles sanos y sépticos (Clusterina, Antitrombina III, SAA1, Apolipoproteína E, Factor H del complemento, Hemoglobina subunidad beta y Filagrina (*García-Obregón S, J Microbiol Immunol Infect 2018*). Todas las proteínas identificadas en este estudio de adultos también fueron identificadas en nuestro estudio pediátrico, pero solo la HBB y la SAA1 cumplían los criterios definidos de una p menor de 0,05 y un cambio en el nivel basal mayor de 2 veces. Esto podría explicarse en parte por la diferente metodología empleada para el estudio de la proteómica y en parte por las diferencias existentes entre la sepsis pediátrica y la de los adultos.

Además del estudio de las diferencias proteómicas entre los pacientes sépticos y los controles, en la investigación desarrollada realizamos un análisis más exhaustivo de las 4 proteínas seleccionadas (SAA1, CFAB, LRG1 y LTF). Se añadieron 2 proteínas implicadas en la fisiopatología del síndrome hemofagocítico (sCD25 y CD163) debido al interés de nuestro grupo en la investigación de la linfohistiocitosis hemofagocítica y en el papel de la desregulación inmune en los procesos infecciosos e inflamatorios graves (*Astigarraga I, An Pediatr 2018*). Ambas proteínas han demostrado su utilidad en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, fundamentalmente la sCD25 o receptor soluble de la IL-2, que se incluye dentro de los criterios diagnósticos de

HLH (*Henter JI, Pediatr Blood Cancer 2007 y Weitzman S, Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011*)

- **El Factor B del complemento (CFAB)** se encontró disminuido en los pacientes con sepsis en relación con los controles. El CFAB no alcanza significación estadística entre controles y sépticos ($p = 0,078$), el valor medio en los sépticos es de 188.472,7 ng/mL frente a 316.717 ng/mL en los controles, aproximadamente el doble. El área bajo la curva para distinguir sepsis de controles es de 0,672 con una sensibilidad de 0,62 y una especificidad de 0,73. Estos valores se consideran pobres como marcadores diagnósticos.

Las razones para explicar el descenso observado en los niveles de CFAB se basan en el funcionamiento del sistema del complemento. Este sistema consiste en múltiples proteínas presentes en fluidos corporales, receptores y proteínas reguladoras. Defiende al organismo de las infecciones y actúa como un regulador de la inmunidad (*Flierl MA, FASEB J 2008*). Su activación puede realizarse por tres vías, la vía clásica (incluye anticuerpos, C1q, C2 y C4), la vía alternativa (incluye al factor B del complemento y la formación de C3b desde el C3) y la vía de la lecitina (incluye a la lecitina de unión a la manosa y ficolinas). (*Charchaflieh J, Disease Markers 2015*). Su activación permite reconocer y eliminar los organismos invasores, aunque una sobreactivación podría amplificar la inflamación y como resultado provocar un daño tisular.

El CFAB es esencial para la activación y amplificación de la vía alternativa del complemento (*Harboe M, Mollnes TE, Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008*). En los modelos animales de sepsis está sobreexpresada en el riñón y puede contribuir al daño tubular. Un estudio sobre el shock séptico en ratones

indicaba que la ausencia del CFAB confería un efecto protector, con mejora en la supervivencia y la función cardíaca y que atenuaba el daño renal. (Zou L, *Journal of Immunology* 2013). La activación de los Toll-like receptores (TLR2, TLR3 y TLR4) aumenta la síntesis y liberación del CFAB por los macrófagos y las células cardíacas. La sepsis polimicrobiana provocada por la ligadura y punción del ciego en el modelo ratón aumentaba los niveles de CFAB en el suero, líquido peritoneal y órganos mayores como el riñón y corazón. También activaba la vía alternativa del complemento. En este modelo animal el CFAB juega un papel importante en la patogénesis de la sepsis grave bacteriana.

Hay pocos trabajos que demuestran la expresión del CFAB en el shock séptico, sin embargo, muchos estudios demuestran la evidencia de que el sistema del complemento se activa en pacientes con sepsis y shock séptico, y que esta activación es en parte responsable de los efectos proinflamatorios vistos en la misma. La activación solo del complemento puede inducir síntomas similares a la sepsis. La vía alternativa contribuye significativamente a la respuesta inmune innata en la sepsis. La forma activa del factor B está elevada en pacientes con sepsis indicando un potencial papel de la vía alternativa en el desarrollo del shock séptico (Charchafliéh J, *Dis Markers* 2015). La activación excesiva del complemento en la sepsis meningocócica fulminante se produce fundamentalmente por la vía alternativa. Los pacientes con shock séptico persistente presentan niveles elevados del CFAB (Brandtzaeg P, *J Infect Dis* 1996).

- La **Lactoferrina** estaba aumentada en los pacientes con sepsis en relación con los controles. Los resultados de nuestro estudio demuestran que los niveles de lactoferrina son diferentes entre los controles y los pacientes sépticos

alcanzando significación estadística ($p < 0,001$), el valor medio en los pacientes sépticos es de 51.940,2 ng/mL frente a 9.640,8 ng/mL en controles. Este valor es seis veces mayor en sépticos que en los controles. El área bajo la curva para distinguir sepsis de controles es de 0,83 con una sensibilidad de 0,72 y una especificidad de 0,90. Valores que se consideran entre regulares y buenos como marcadores diagnósticos.

La lactoferrina humana (HLF), es una glicoproteína catiónica multifuncional sintetizada por glándulas exocrinas (*Masson PL, Eur J Biochem 1968*) y por neutrófilos en respuesta a una infección o inflamación (*Levi O, 2004, J. Leukoc. Biol*). Está presente en numerosos fluidos y secreciones mucosas (lágrimas, saliva, leche materna, calostro, etc.) donde actúa como primera línea de defensa y, en pequeñas cantidades, en el plasma sanguíneo. Pertenece a la familia de la transferrina (proteína transportadora del hierro), siendo un elemento clave en la defensa del huésped.

Es una proteína de unión al hierro en la leche y en las secreciones corporales con actividad antimicrobiana, lo que la convierte en un componente importante del sistema inmunitario innato. Muestra un amplio espectro de propiedades, incluida la regulación de la homeostasis del hierro, la defensa del huésped contra una amplia gama de infecciones microbianas, la actividad antiinflamatoria, la regulación del crecimiento celular y la diferenciación y la protección contra el desarrollo del cáncer y la metástasis. Se ha encontrado actividad antimicrobiana, antiviral, antifúngica y antiparasitaria para esta proteína y sus péptidos. (*Vogel HJ, Biochem Cell Biol 2012*)

La función bacteriostática de la Lactoferrina se debe a la capacidad para secuestrar iones hierro en el sitio de infección. Privando de esta manera de un componente fundamental a las bacterias para su crecimiento. Este efecto es temporal ya que las bacterias desarrollan mecanismos para recuperar este hierro. La función bactericida se atribuye a su interacción directa en la desestabilización de la pared bacteriana. Participa en la inhibición de la formación del biofilm por la bacteria. Sin embargo, el mecanismo exacto de la actividad antimicrobiana de los péptidos de lactoferrina no se ha descrito hasta la fecha (*Martin L, Front. Immunol 2015*).

Otros trabajos han demostrado resultados similares a nuestra investigación con incremento de los niveles de lactoferrina en pacientes con sepsis grave junto con otros polipéptidos antimicrobianos (*Berkstedt I, Journal of Innate Immunity, 2010*). Sus niveles se elevan hasta 10 veces en los pacientes adultos con sepsis, así como se había demostrado previamente en niños (*Thomas NJ, Pediatr Infect Dis 2002*), donde su incremento se relacionaba con el número de neutrófilos. La evidencia actual sugiere que la lactoferrina podría reducir significativamente la incidencia de enterocolitis necrotizante y sepsis tardía, disminuyendo el riesgo y mortalidad de la infección adquirida en el hospital en prematuros. (*He Y, Medicine 2018*), (*Telang S, Nutrients 2018*).

- La **Alfa 2-glicoproteína rica en leucina-2 (LRG1 o A2GL)** se encontró disminuida en los pacientes sépticos frente a los controles. Estos resultados no fueron concordantes con los observados en el análisis inicial del proteoma, que mostraba valores aumentados en los pacientes sépticos en relación con los controles. La LRG1 es diferente entre controles y sépticos alcanzando

significación estadística ($p < 0,001$), el valor medio en los sépticos es de 518.033,8 ng/mL comparado con 796.404,7 ng/mL en los controles. El área bajo la curva para distinguir sepsis de controles es de 0,93 con una sensibilidad de 0,89 y una especificidad de 1. Valores que se consideran excelentes como marcador diagnóstico.

La alfa-2-glicoproteína rica en leucina 1 (LRG1) es una proteína que pertenece a la familia de proteínas leucine-rich repeat (LRR). Estas proteínas participan en la interacción proteína-proteína, la transducción de señales y la adhesión y el desarrollo celular. Su función biológica no está clara, pero algunos estudios han demostrado que la LRG1 se expresa durante la diferenciación de los granulocitos y que participa en la angiogénesis, contribuyendo a la neovascularización patológica. (*Wang X, Nature 2013*).

Rainer et al estudiaron el papel de esta proteína como biomarcador para el diagnóstico de apendicitis aguda (AA) en 84 pacientes con apendicitis y 44 sin apendicitis. Encontraron que los niveles medios en plasma de LRG1 eran mayores en los pacientes con AA que en los que no tenían AA. El área bajo la curva para LRG1 en AA fue de 0,74 (*Rainer TH, Clin Biochem 2017*). Un incremento de su nivel se ha visto tanto en sangre como en orina en un grupo de niños con AA (*Kharbanda AB Acad Emerg Med 2012*)

Hashida T et al, analizaron el proteoma del líquido eliminado por hemofiltración en 20 pacientes con insuficiencia renal (10 sépticos y 10 no sépticos). Los pacientes con sepsis tuvieron con mayor frecuencia proteínas relacionadas con el proceso inmune y con funciones de adhesión biológica. Identificaron un total de 429 proteínas, 197 solo identificadas en los pacientes

con sepsis. Tres proteínas la anhidrasa carbónica 1 (CA1), CysC y la alfa2 glucoproteína rica en leucina (LRG1) se identificaron en todos los pacientes con sepsis y no habían sido reportadas anteriormente en pacientes con sepsis. El análisis de validación reveló que los pacientes con sepsis tenían niveles séricos aumentados de CA1 ($p = 0.015$) y LRG1 ($p = 0,0039$) en comparación con los no sépticos (*Hashida T, 2017, J Artif Organs*).

La función de la LRG1 no se ha determinado por completo (*O'Donnell LC, 2002, J Leukoc Bio*). El aumento de los niveles séricos de LRG1 en pacientes con artritis reumatoide sugiere que la LRG1 es un prometedor candidato como biomarcador inflamatorio en las enfermedades autoinmunes (*Serada S, 2010, Ann Rheuma Dis*). Además, una investigación sobre los mecanismos de la angiogénesis endotelial mostró que LRG1 es un actor clave de la angiogénesis y mejora la vía de señalización proangiogénica al unirse directamente al complejo receptor TGF-beta (transforming growth factor- β 1) localizado en la superficie de la célula (*Wang X, 2013, Nature*).

Shirai et al, en un estudio de laboratorio con inducción de respuestas en hepatocitos a mediadores de fase aguda encuentran que la LRG1 se encuentra sobrepresada tras la administración de IL-6 humana, IL 1Beta y TNF alfa con un patrón similar a las proteínas de fase aguda. También demuestran que la administración de LPS intraperitoneal en ratones aumenta la expresión de LRG mRNA en el hígado. Sugiriendo que la LRG1 es una proteína de fase aguda tipo 1 secretora cuya expresión esta sobrepresada en respuesta a mediadores de fase aguda. (*Shirai R, Biochem Biophys Res Commun 2009*).

Nuestros resultados apoyan el papel del LRG1 como biomarcador en procesos inflamatorios e infecciosos.

- El **Amiloide sérico A1 (SAA1)** está aumentada en los pacientes con sepsis en relación con los controles. La SAA1 es diferente entre controles y sépticos alcanzando significación estadística ($p < 0,001$), el valor medio en los sépticos es de 188.472,7 ng/mL frente a 5.965,7 ng/mL, mas de 30 veces el valor inicial de los controles. El área bajo la curva para distinguir sepsis de controles es de 0,977 con una sensibilidad de 0,89 y una especificidad de 1. Valores que se consideran excelentes como marcador diagnóstico.

Las proteínas amiloides séricas A (SAA) constituyen una familia de apolipoproteínas. Se sintetizan principalmente en el hígado, en respuesta a las citoquinas liberadas por los macrófagos (IL 1 β , IL 6 y TNF- α) tras un estímulo agudo tal como una infección o daño físico. Aunque se han encontrado un total de seis isoformas de SAA, la SAA1 y la SAA2, (SAA2 α y SAA2 β) son las que se hallan principalmente en el suero humano durante la inflamación. El SAA1 y el SAA2 son casi idénticas, probablemente originadas durante la evolución de una duplicación genética (Uhlir, C.M. *Genomics*, 1994). Es una de las mayores proteínas de fase aguda, como la PCR, aunque alcanza valores mayores y responde más rápidamente que la PCR. Puede utilizarse como marcador diagnóstico, pronóstico o de seguimiento de muchas enfermedades. Los aumentos en los niveles séricos de SAA se producen como respuesta a un daño físico del huésped, tal como, infección, trauma, reacción inflamatoria o cáncer. El orden de magnitud del aumento en los niveles de SAA varía considerablemente, de 10 a 100 veces durante eventos inflamatorios limitados a

un aumento de 1.000 veces durante infecciones bacterianas graves y exacerbaciones agudas de enfermedades inflamatorias crónicas. Cuando la inflamación persiste, el hígado continúa produciendo SAA y hace que actúe como un agente antibacteriano.

Se ha estudiado su papel en numerosas patologías tales como la artritis reumatoide (AR), donde se relaciona a la SAA con la patogénesis de la enfermedad, detectándose mayores cantidades de SAA en el líquido articular de pacientes con AR que en pacientes sanos. Se considera más sensible que la PCR (*O'Hara R, Arthritis Res, 2000*). También en la obesidad, debido a la producción local por los adipocitos de SAA y citoquinas, diabetes tipo II donde los niveles de SAA son mayores que en los individuos sanos y arterioesclerosis en estos pacientes con diabetes, AR y obesos. (*King VL, Curr Opin Lipidol, 2011*). Otras enfermedades relacionadas con el aumento de SAA son: enfermedades pulmonares (EPOC, asma, tabaquismo), cáncer (gástrico, mieloma, osteosarcoma), Enfermedad de Crohn, Alzheimer, apnea del sueño y amiloidosis.

A pesar de haber sido estudiada en numerosas situaciones su papel como proteína de fase aguda sigue sin estar aclarado. Existen varios trabajos que apuntan a su papel como biomarcador en la sepsis neonatal. (*Yuan H, Biomed Res Int. 2013*)

- **El receptor soluble de la cadena alfa de la Interleucina 2 (sCD25)** está aumentado en los pacientes con sepsis en relación con los controles. El sCD25 es diferente entre controles y sépticos alcanzando significación estadística ($p < 0,001$), el valor medio en los sépticos es de 11.886,1 pg/mL frente a 2.119,1

pg/mL, casi seis veces el valor de los controles. El área bajo la curva para distinguir sepsis de controles es de 0,97 con una sensibilidad de 0,94 y una especificidad de 1. Valores que se consideran excelentes como marcador diagnóstico.

Aunque se han investigado varios candidatos en la cascada antiinflamatoria, definida en la fisiopatología de la sepsis, los datos más consistentes se refieren a la IL 10 y a la forma soluble del CD25 (sCD25), un antígeno de los linfocitos T reguladores (*Saito K, Tohoku J ExpMed 2008*). Este autor comprobó el aumento de sCD25 en el plasma de los pacientes bacteriémicos en comparación con los pacientes con SIRS no bacteriémicos.

El sCD25 podría tener un papel importante en el diagnóstico de la respuesta inflamatoria bacteriémica. Un hallazgo inesperado es su aumento temprano que, según la literatura, debería estar asociado más con la etapa tardía / inmunosupresora de la sepsis. Kasten et al, (*Kasten KR, Shock 2010*) subrayaron su papel temprano en la patogénesis de la sepsis. Por lo tanto, sCD25 no debe considerarse como un marcador tardío, sino también como marcador temprano de la infección. Este predominio de supresión inmune se ha sugerido que está relacionado con el desarrollo de la disfunción orgánica en la sepsis. (*Matera G, Crit Care 2013*)

En un estudio realizado en adultos con sepsis y fracaso renal agudo (IRA) se estudiaron tres biomarcadores IL 10, sCD25 y NGAL (*Cho E, 2014 Nephrology*). Los niveles séricos de sCD25, marcador representativo de las células T supresoras, estaban elevados en el grupo de pacientes con sepsis e insuficiencia renal aguda (IRA) en comparación con el grupo de pacientes con sepsis sin IRA

o en pacientes con IRA sin sepsis. Estos hallazgos sugieren que la inmunosupresión se relaciona con la disfunción de órganos de la sepsis, en este caso IRA. Y que tanto la IL 10 como el sCD25 serían buenos marcadores para el desarrollo de fallo renal séptico. El valor del área bajo la curva (AU-ROC) de sCD25 para pacientes con sepsis e IRA fue de 0,75 (0,65-0,88). Este resultado es menor al observado en nuestro estudio.

El sCD25 se ha utilizado en la clínica como biomarcador del síndrome hemofagocítico (SH) y de linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), condiciones potencialmente mortales caracterizada por una activación inmune patológica e hipercitocinemia. (*Henter JI, Pediatr Blood Cancer 2007*). En una revisión sistemática de 64 artículos (1975-2016) examinando la utilidad clínica de este receptor para el diagnóstico de SH/HLH (*Lin M, Ann Hematol. 2017*), 22 artículos lo describen como un marcador de diagnóstico sensible para HLH. El sCD25 soluble se ha propuesto como marcador del síndrome de activación macrofágica. También junto con el sCD163 en la Artritis Idiopática Juvenil activa (*Reddy VV, 2014 Int J Rheum Dis*).

Aunque la fuente precisa y el papel biológico de sCD25 no se ha aclarado definitivamente, se ha demostrado que los niveles séricos pretratamiento de sCD25 reflejan la actividad, el avance y la agresividad biológica de muchos tipos de cáncer en adultos y niños, y se correlacionan con pronóstico y supervivencia global. (*Bien E, 2008 Biomarkers*). También se ha visto elevado en múltiples situaciones tanto infecciosas como no infecciosas (enfermedades autoinmunes, neoplasia, rechazo, infecciones, etc.). En base a nuestros resultados se puede

considerar un marcador inespecífico que podría formar parte de un panel de biomarcadores en representación de la fase inmunosupresora de la sepsis.

- El **Receptor soluble de los complejos haptoglobina-hemoglobina (sCD163)** está aumentado en los pacientes con sepsis en relación con los controles. En nuestro estudio el sCD163 no alcanza significación estadística entre controles y sépticos ($p = 0,078$), el valor medio en los sépticos es de 1.291,4 pg/mL frente a 915,3 pg/mL en los controles. El área bajo la curva para distinguir sepsis de controles es de 0,68 con una sensibilidad de 0,62 y una especificidad de 0,80. Valores que se consideran pobres como marcadores diagnósticos.

El sCD163 es una glicoproteína presente en la superficie de la membrana celular de los macrófagos y los monocitos. Es un receptor miembro de la superfamilia de proteínas SRCR (Scavenger receptors cystein-rich) (Møller H. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012). Se ha demostrado que funciona como un receptor para la hemoglobina (HbSR, hemoglobin scavenger receptor) capaz de capturar los complejos de hemoglobina-haptoglobina, que se producen durante la hemólisis intravascular. Este receptor HbSR está directamente involucrado en la respuesta inflamatoria. Situaciones como la coagulación intravascular diseminada (CID), hemólisis, isquemia, reperfusión, así como toxicidad y efectos secundarios de fármacos pueden conducir a la liberación de hemoglobina. Al mismo tiempo reacciones de oxidación y reducción catalizadas por peróxido de hidrogeno conducen a la formación de radicales libres de oxígeno los cuales provocan daño celular. Para evitar todo esto es necesario retirar pronto la hemoglobina libre. La haptoglobina participa en la neutralización de la

hemoglobina disminuyendo así el daño de las reacciones oxidativas que se desencadena. También participa en la respuesta antiinflamatoria. La hemoglobina puede ser retirada por las células fagocíticas solo cuando se une a la haptoglobina a través del receptor CD163.

Estudios in vitro han demostrado que el sCD163 podría estar inducido por los TLR (Tool like receptors) o LPS (Lipopolisacárido). Incluso sin respuesta inflamatoria hay pequeñas cantidades de CD163 en la sangre.

En muchas situaciones como enfermedad coronaria, arterioesclerosis, artritis reumatoide, cáncer y esclerosis múltiple el sCD163 se puede utilizar como un biomarcador específico de los macrófagos. Juega un papel importante en la identificación de la inflamación, sepsis, bacteriemia, mononucleosis, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, síndrome hemofagocítico, síndrome de activación macrofágica, fallo hepático agudo, quemaduras, etc. En muchas de estas situaciones los pacientes están expuestos a grandes cantidades de hemoglobina libre debido a la hemolisis vascular y al daño celular. El CD163 es muy eficiente para la retirada de esta hemoglobina libre de la sangre y de los tejidos con inflamación, luego puede considerarse como un marcador pronóstico en muchas enfermedades, especialmente inflamatorias.

De acuerdo con la literatura publicada podría considerarse como un marcador de sepsis pronóstico mas que diagnóstico. Sapa et al, en un estudio realizado en muestras de sangre de pacientes con sepsis y pacientes graves sin criterios de sepsis, encuentran; para un valor de corte de 1,146 mg/L; un área bajo la curva ROC de 0,847 (intervalo de confianza 0,72-0,93), con una sensibilidad de 82,1% y una especificidad de 91,7%. (*Sapa A, Adv Clin Exp Med.*

2017). Feng et al, en un estudio de pacientes con sepsis y otro con SIRS sin infección, encuentran resultados similares. Según los autores la no disminución de este valor implicaba un mal pronóstico. Los autores concluyen en que el sCD163 tiene valor tanto como marcador diagnóstico como pronóstico. Consideran que es mejor marcador que la PCT y la PCR. (Feng L, *PLoS One*. 2012). Moller et al, en pacientes con bacteriemia por neumococo, observan un valor similar a los estudios previos. El área bajo la curva para predecir el riesgo de muerte era de 0,82 con una sensibilidad de 82% y especificidad de 79%. (Moller HG, *Crit Care Med*. 2006). Kjaergaard et al, encuentran los valores más altos en un grupo de pacientes con sepsis comparados con controles. El área bajo la curva ROC fue de 0,95, como marcador diagnóstico de sepsis. Con una sensibilidad y especificidad de 93% (Kjaergaard AG, 2014). Al igual que Abdelrahman et al, que estudian pacientes con sepsis y SIRS, con una sensibilidad de 93,5% y especificidad de 90,2% que confirma el valor del biomarcador en la sepsis. (Abdelrahman RS, *Tanta Med J*. 2015).

Los resultados de nuestro trabajo con una sensibilidad 0,62 de y especificidad de 0,80 no son tan favorables como los descritos en los estudios previos. Sin embargo, se asemejan más a otros autores como Su, Ingels Y Gaïni. En el estudio de Su et al, de 100 pacientes sépticos y 30 pacientes con SIRS, el valor del área bajo la curva fue inferior a los anteriores, de 0,69. (Su HL, *Mediators Inflamm*. 2013) Los autores consideran que el sCD163 tiene más valor como pronóstico en el seguimiento de la enfermedad. Ingels et al encuentran menores diferencias en los valores entre pacientes sépticos y controles, con área bajo la curva de predicción de mortalidad de 0,68. (Ingels C, *J Clin Immunol*. 2013).

Gaïni et al, estudian pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad y los comparan con un grupo de referencia de pacientes sanos. El área bajo la curva es de 0,58 y no hubo diferencias estadísticas entre los grupos. Concluyen que el sCD163 no sirve para diferenciar a los pacientes con infección de los que no la tienen. (Gaïni S *PMIS*. 2006). Los mismos autores determinan el valor de sCD163 en pacientes sépticos y pacientes con SIRS, en los sépticos las concentraciones eran mayores que en el grupo SIRS, sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre sepsis y SIRS. (Gaïni S, *Clin Exp Immunol*. 2008)

En los estudios previos los autores miden el sCD163 en suero, pero este marcador también se puede medir en orina. En el estudio de Su et al, en el grupo de referencia los valores eran indetectables. El área bajo la curva ROC fue de 0,83 con una sensibilidad de 82,5% y una especificidad de 75%. Los resultados se correlacionan con la concentración en suero del sCD163. ($r=0,511$). (Su HL, 2012).

5.3 BÚSQUEDA DE UN PANEL DE BIOMARCADORES

En el presente estudio, los pacientes con sepsis presentaron un perfil del proteoma estadísticamente diferente al de los controles. Entre las proteínas obtenidas, un número importante de ellas participan en procesos biológicos relacionados con la defensa del huésped (respuesta inmune e inflamatoria, activación de la coagulación y la vía del complemento).

El mayor cambio en el valor basal se observó en las proteínas SAA2 y 1, estas proteínas como se ha comentado alcanzan valores mas elevados que la PCR y su tiempo de respuesta es mas rápido.

Para mejorar el rendimiento de las proteínas como marcadores diagnósticos se han propuesto combinaciones de varias proteínas (*Kokoed K, Crit Care 2007*). Sin embargo, hasta la fecha, en la mayoría de los estudios, estas combinaciones solo proporcionan una mejora diagnóstica de limitada a moderada eficacia, comparando con la rentabilidad diagnóstica de las proteínas aisladas. Esto puede explicarse por un enfoque predominante en los estudios sobre proteínas inducidas por bacterias (por ejemplo, PCT, IL-6, IL-8, SAA1, CRP y sTREM), que comparten vías biológicas y, por lo tanto, son inherentemente sensibles a los mismos factores. Por lo tanto, pensamos que la combinación de proteínas no relacionadas que participen en diferentes vías puede mejorar la precisión diagnóstica.

Las proteínas seleccionadas son bastante representativas de los diferentes procesos biológicos de la respuesta a infecciones. Se incluyen receptores de los macrófagos (sCD163), proteínas de fase aguda (SAA1, CFB), proteínas de la fase inmunosupresora (sCD25) y de activación celular (LRG1). Al incluir proteínas de diferentes fases de la respuesta a la infección se puede incrementar su valor diagnóstico.

Cuatro de estas proteínas (LRG1, sCD25, SAA1 y LTF) presentan diferencias estadísticamente significativas entre controles sanos y pacientes sépticos. Tres de ellas LRG1, sCD25 y SAA1 lo hacen con un área bajo la curva ROC excelente. Estas tres proteínas podrían constituir un potencial panel de marcadores que identificase a los pacientes con sepsis. En el presente estudio al menos una de las tres proteínas identificaba al paciente séptico y ninguna de ellas era positiva en los controles.

El interés en descubrir un método diagnóstico sensible y específico hace que haya que seguir investigando en esta línea para intentar descubrir el panel ideal de marcadores. Proteínas como las descritas además de las ya conocidas PCT, PCR y presepsina podrían ser incluidas en este posible panel. Sin olvidar el papel que representan las diferentes escalas de gravedad (qSOFA, SOFA, sepsis 6 (<https://sepsistrust.org>), national early warning scores (www.england.nhs.uk/ourwork/clinical-policy/sepsis/nationalearlywarningscore/, etc.). La disponibilidad de un panel que pudiera aplicarse a nivel clínico sería muy interesante. Sin embargo, su implantación en la práctica asistencial parece todavía lejana porque la mayoría de estas determinaciones no están disponibles en los laboratorios hospitalarios y no pueden analizarse en los laboratorios de urgencia. En los pacientes con sepsis en situación crítica, los estudios diagnósticos y las decisiones terapéuticas se deben tomar de forma rápida y urgente, a cualquier hora del día. Los paneles tendrían que ser sencillos de utilizar y deberían ofrecer los resultados en un plazo muy breve de tiempo. Todavía se necesita avanzar mucho en la investigación en este campo.

5.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio presenta varias limitaciones. Primero, el tamaño muestral es pequeño, similar a lo que sucede con otros estudios de proteoma previos (Cao Z, *Proteom Clin Appl*, 2014). En segundo lugar, de las 44 proteínas identificadas durante el análisis del proteoma del suero de pacientes con sepsis, que cumplían los criterios de selección, nos centramos en 4 proteínas, validando con éxito tres de ellas (LTF, SAA1 y LRG1). La validación de estas proteínas se realizó en base

a criterios de frecuencia en la participación de los procesos biológicos, fuerza estadística y coste económico. El importe económico de la validación de todas las proteínas no era asumible para este estudio inicial. Por las limitaciones de la dotación económica disponible en los proyectos de investigación sobre sepsis del grupo. Además, existe cierto punto de subjetividad a la hora de la elección de estas proteínas. Un análisis más completo de todas las proteínas diferenciadas podría haber permitido la realización de un estudio estadístico específico que hubiese podido seleccionar mejor el grupo del panel de proteínas.

Los propios estudios de proteómica tienen sus limitaciones. A fecha de hoy pocos de ellos han conseguido nuevos biomarcadores aplicables a la práctica asistencial, aunque se han conseguido significativos avances en la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades. Su metodología es cara y consume mucho tiempo. Los estudios realizados tienen poco poder estadístico debido a su complejidad y fundamentalmente al número pequeño de pacientes que entran en cada estudio. Se necesitan para su validación posterior estudios en cohortes con mayor número de pacientes.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La sepsis continúa siendo un problema de salud importante que asocia una morbi-mortalidad significativa. La etiología en nuestra serie se corresponde con la de la edad pediátrica, siendo el meningococo (57%), seguido del estreptococo, los gérmenes más frecuentes. Uno de cada 2 pacientes sépticos presenta una o más enfermedades crónicas asociadas (inmunodeficiencia, cáncer). Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan un hemocultivo positivo. La fuente principal de infección es la endovascular (52,5%), seguido de la respiratoria. La mayoría de los pacientes precisan soporte inotrópico (82,5%) y un tercio de ellos soporte respiratorio. La mortalidad se encuentra en cifras inferiores (5%) a las registradas en la literatura pediátrica para las sepsis infantiles.

2. Los marcadores utilizados habitualmente para el diagnóstico de infección presentan un importante índice de fallos en nuestro estudio. A destacar que nuestra población es una población seleccionada con un diagnóstico de sospecha de sepsis al ingreso. La procalcitonina fue negativa en el 10 %, la PCR en el 17,5% y el nivel de lactato fue normal en el 42,5% de los pacientes sépticos a su ingreso.

3. En el análisis realizado del proteoma mediante la técnica LC-MS se detectaron 230 proteínas diferenciadas entre los pacientes con sepsis y los controles sanos.

4. De las 230 proteínas detectadas, 44 cumplían los criterios de selección del estudio ($p < 0,05$ y Max fold mayor de 2). Veinticuatro de estas proteínas participan en procesos biológicos relacionados con la inmunidad de acuerdo con la base de datos STRING.

5. Tras el análisis de la bibliografía, los procesos biológicos en los que participan y la significación estadística, las proteínas factor B del complemento, lactotransferrina, Alfa 2-glicoproteína rica en leucina-2 y amiloide sérico A1, junto a las proteínas receptor soluble de la cadena alfa de la interleucina 2 y receptor soluble de los complejos haptoglobina-hemoglobina, fueron seleccionadas para su validación como posibles biomarcadores de sepsis.

6. Las proteínas amiloide sérico A1, receptor soluble de la cadena alfa de la interleucina 2 y alfa 2-glicoproteína rica en leucina-2, presentaron excelentes valores AUROC $> 0,9$ para el diagnóstico de la sepsis. La lactotransferrina presentó un valor AUROC moderadamente bueno ($< 0,9$). Su precisión diagnóstica podría aportar una contribución significativa a la identificación temprana de la sepsis.

7. Con las 3 proteínas que presentaban los mejores valores de AUROC, amiloide sérico A1, alfa 2-glicoproteína rica en leucina-2 y receptor soluble de la cadena alfa de la interleucina 2, se identificaron a todos los pacientes sépticos y ninguna de ellas fue positiva en los controles. Estas 3 proteínas podrían formar junto a otros marcadores (clínicos, laboratorio) un panel diagnóstico de sepsis.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abdelrahman RS, Wagih AA, Elbarbary AH. The diagnostic value of serum level of soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 for sepsis in the ICU. *Tanta Med J* 2015; 43:9–15.
- ❖ Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S et al. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 2010; 376:1339-46.
- ❖ Andersen CB, Stødkilde K, Sæderup KL et al. Haptoglobin. *Antioxidants y Redox Signaling* 2017; 26:814–31.
- ❖ Anderson NL. The roles of multiple proteomic platforms in a pipeline for new diagnostics. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:1441-1444.
- ❖ Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1:845-67.
- ❖ Aneja RK, Varughese-Aneja R, Vetterly CG et al. Antibiotic therapy in neonatal and pediatric septic shock. *Curr Infect Dis Rep* 2011; 13:433–41.
- ❖ Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369:840–51.
- ❖ Annane D, Bellissant E, Cavillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 17:63–78.
- ❖ Astigarraga I, Gonzalez-Granado LI, Allende LM et al. Síndromes hemofagocíticos: la importancia del diagnóstico y tratamiento precoces. *An Pediatr (Barc)* 2018;89:124.e1-8
- ❖ Atkinson SJ, Cvijanovich NZ, Thomas NJ, et al. Corticosteroids and pediatric septic shock outcomes: a risk stratified analysis. *PLoS One* 2014;9: e112702.

- ❖ Ayar G, Atmaca YM, Alışık M et al. Effects of paraoxonase, arylesterase, ceruloplasmin, catalase, and myeloperoxidase activities on prognosis in pediatric patients with sepsis. *Clin Biochem* 2017; 50:414-7.
- ❖ Bai Z, Zhu X, Li M, et al. Effectiveness of predicting in-hospital mortality in critically ill children by assessing blood lactate levels at admission. *BMC Pediatr* 2014; 14:83.
- ❖ Baker ES, Liu T, Petyuk VA, et al. Mass spectrometry for translational proteomics: progress and clinical implications. *Genome Med.* 2012 Aug 31;4(8):63.
- ❖ Bartoletti M, Antonelli M, Bruno Blasi FA, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy: an expert consensus. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Jul 26;56(8):1223-1229. doi: 10.1515/cclm-2018-0259.
- ❖ Behnes M, Bertsch T, Lepiorz D, et al. Diagnostic and prognostic utility of soluble CD 14 subtype (presepsin) for severe sepsis and septic shock during the first week of intensive care treatment. *Crit Care* 2014; 18:507.
- ❖ Berkestedt, I., Herwald, H., Ljunggren, L., et al. Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis. *Journal of innate immunity* 2010; 2:478-82.
- ❖ Bien E, Balcerska A. Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers* 2008; 13:1-26.
- ❖ Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89-95.

- ❖ Black RE, Cousens S, Johnson HL, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: A systematic analysis. *Lancet* 2010; 375:1969–87.
- ❖ Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* 2014; 5:154–60.
- ❖ Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP–SCCM Consensus Conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101:1481–3.
- ❖ Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011;306, 2594–605.
- ❖ Bradshaw C, Goodman I, Rosenberg R, et al. Implementation of an inpatient pediatric sepsis identification pathway. *Pediatrics* 2016;137: e20144082.
- ❖ Brandtzaeg P, Hogåsen, K, Kierulf P et al. The excessive complement activation in fulminant meningococcal septicemia is predominantly caused by alternative pathway activation. *Journal of Infectious Diseases*, 1996;173: 647-55
- ❖ Bréchet N, Hékimian G, Chastre J et al. Procalcitonin to guide antibiotic therapy in the ICU. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46: S19-24.
- ❖ Brocklehurst P, Farrell B, King A, et al. Treatment of neonatal sepsis with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2011; 365:1201–11.
- ❖ Cao Z, Robinson RA. The role of proteomics in understanding biological mechanisms of sepsis. *Proteom Clin Appl* 2014; 8:35–52.
- ❖ Cao Z, Yende S, Kellum JA, Angus DC, Robinson RA: Proteomics reveals age-related differences in the host immune response to sepsis. *J Proteome Res* 2014; 13:422-32.

- ❖ Carcillo JA, Fields AI, Task Force Committee Members: Clinical practice variables for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. *Crit Care Med* 2002; 30:1365–78.
- ❖ Carcillo JA, Kuch BA, Han YY, et al. Mortality and functional morbidity after use of PALS/APLS by community physicians. *Pediatrics* 2009; 124:500–8.
- ❖ Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM et al. Use of the percentage of free prostate specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998, 279:1542-7.
- ❖ Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2007; 8:91–108.
- ❖ Claushuis, TA, van Vught LA, Scicluna BP, et al. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood* 2016; 127, 3062–72.
- ❖ Cruz AT, Perry AM, Williams EA, et al. Implementation of goal-directed therapy for children with suspected sepsis in the emergency department. *Pediatrics* 2011;127: e758–66.
- ❖ Chan, JK, Cheung P, He M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J. Clin. Invest* 2012; 122:2711–19.
- ❖ Charchafliéh J, Rushbrook J, Worah S et al. Activated Complement Factors as Disease Markers for Sepsis. *Dis Markers*. 2015; 2015:382463.
- ❖ Chen KF, Chaou CH, Jiang JY, et al. Diagnostic accuracy of Lipopolysaccharide-Binding Protein as Biomarker for sepsis in adult

- patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0153188.
- ❖ Cho E, Lee JH, Lim HJ, et al. Soluble CD25 is increased in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)*. 2014; 19:318-24.
 - ❖ Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 200; 350:1387-97.
 - ❖ Davis AL, Carcillo JA, Aneja RK, et al. American College of Critical Care Medicine Clinical Practice Parameters for Hemodynamic Support of Pediatric and Neonatal Septic Shock. *Crit Care Med* 2017; 45:1061–93.
 - ❖ de Oliveira CF, de Oliveira DS, Gottschald AF, et al. ACCM/PALS haemodynamic support guidelines for paediatric septic shock: An outcomes comparison with and without monitoring central venous oxygen saturation. *Intensive Care Med* 2008; 34:1065–75
 - ❖ de Souza DC, Barreira ER, Faria LS. The epidemiology of sepsis in childhood. *Shock* 2017; 47:2–5.
 - ❖ Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39:165–228.
 - ❖ Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 2014;40, 463–75.
 - ❖ Dou C, Zhang J, Sun Y, et al. The association of ACT -17 A/T polymorphism with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Curr Alzheimer Res* 2013 Jan; 10:63-71

- ❖ Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2012; 18:891-7.
- ❖ Evans IVR, Phillips GS, Alpern ER et al. Association between the New York sepsis care mandate and in-hospital mortality for pediatric sepsis. *JAMA*. 2018; 32:358-67.
- ❖ Feng L, Zhou X, Su LX, et al. Clinical significance of soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 (sCD163) in sepsis, a prospective study. *PLoS One* 2012;7: e38400.
- ❖ Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193, 259–72.
- ❖ Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J* 2008; 22:3483–90.
- ❖ Folgori L, Livadiotti S, Carletti M, et al. Epidemiology and clinical outcomes of multidrug-resistant, gram-negative bloodstream infections in a European tertiary pediatric hospital during a 12-month period. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33:929–32
- ❖ Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482:157–71.
- ❖ Funk DJ, Kumar A. Antimicrobial therapy for life-threatening infections: speed is life. *Crit Care Clin* 2011; 27:53–76.
- ❖ Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit. Care Clin* 2009; 25:83–101.

- ❖ Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013; 41:1167–74.
- ❖ Gaïni S, Koldkjær OG, Pedersen SS, et al. Soluble haemoglobin scavenger receptor (sCD163) in patients with suspected community-acquired infections *PMIS*. 2006; 114:103–11.
- ❖ Gaïni S, Pedersen SS, Koldkaer OG et al. New immunological serum markers in bacteraemia: Anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol* 2008; 151:423–31.
- ❖ Garcia de Guadiana R, Albadelejo O, Rebollo A, et al. Diagnostic accuracy of lipopolysaccharide-binding protein for sepsis in patients with suspected infection in the emergency department. *Ann Clin Biochem* 2018; 55:143-8
- ❖ Garcia-Obregon S, Azkargorta M, Seijas I, Pilar-Orive J, et al. Identification of a panel of serum protein markers in early stage of sepsis and its validation in a cohort of patients. *J Microbiol Immunol Infect* 2018; 51:465-72.
- ❖ GeneCards. The Human Gene Database. <http://www.genecards.org> (acceso septiembre 2018).
- ❖ Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg* 2012; 72:1491–501.
- ❖ Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference:

- Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6:2–8.
- ❖ Gorgis N, Asselin JM, Fontana C et al. Evaluation of the Association of early elevated lactate with outcomes in children with severe sepsis or septic shock. *Pediatr Emerg Care* [Epub ahead of print; January 9, 2017.]
 - ❖ Hagi A, Hirata H, Shinomiya H. Analysis of a bacterial lipopolysaccharide-activated serine kinase that phosphorylates p65/L-plastin in macrophages. *Microbiology and Immunology* 2006;50: 331–5,
 - ❖ Hashida T, Nakada TA, Satoh M et al. Proteome analysis of hemofilter adsorbates to identify novel substances of sepsis: a pilot study. *J Artif Organs* 2017; 20:132-37.
 - ❖ Hattori N, Oda S, Sadahiro T et al. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock*. 2009; 32:393–400.
 - ❖ Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008; 12:1074–84
 - ❖ He Y, Cao L, Yu J. Prophylactic lactoferrin for preventing late-onset sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e11976.
 - ❖ Henter JI, Horne AC, Arico M et al. HLH-2004: Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-31
 - ❖ Hershey TB, Kahn JM. State sepsis mandates—A new era for regulation of hospital quality. *N Engl J Med* 2017; 376:2311–3.

- ❖ Hochebied T, Berger FG, Baumann H et al. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:25–34.
- ❖ Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13:260–8.
- ❖ Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:862–74.
- ❖ Hotchkiss RS, Moldawer LL; Opal SM et al. Sepsis and septic shock. *Nature reviews. Disease primers* 2016; 2:16045
- ❖ IDSA Sepsis Task Force. Infectious Diseases Society of America (IDSA) POSITION STATEMENT: Why IDSA Did Not Endorse the Surviving Sepsis Campaign Guidelines. *Clin Infect Dis.* 2018; 66:1631-5.
- ❖ Ingels C, Møller HJ, Hansen TK, et al. Circulating levels of the shed scavenger receptor sCD163 and association with outcome of critically ill patients. *J Clin Immunol* 2013; 33:619–29.
- ❖ Iwashyna TJ, Ely EW, Smith M et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 2010; 304:1787–94.
- ❖ Jacobs JM, Adkins JN, Qian WJ, et al. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res* 2005; 4:1073-85.
- ❖ Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of c-reactive protein in pediatrics. *Ped Infect Dis* 1997; 16:735–8.

- ❖ Karam O, Tucci M, Ducruet T et al. Red blood cell transfusion thresholds in pediatric patients with sepsis. *PCCM* 2011; 12:512-8
- ❖ Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellmann A et al. Procalcitonin: a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 1997; 25:329–34.
- ❖ Kasten KR, Tschöp J, Goetzman HS et al. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. *Shock* 2010; 17:377–83
- ❖ Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D et al. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med* 2015; 372:1629–38.
- ❖ Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. *JAMA* 2014; 311:1308–16.
- ❖ Kelly BJ, Lautenbach E, Nachamkin I, et al. Combined biomarkers discriminate a low likelihood of bacterial infection among surgical intensive care unit patients with suspected sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 85:109–115.
- ❖ Kessler DO, Walsh B, Whitfill T, et al. Disparities in adherence to pediatric sepsis guidelines across a spectrum of emergency departments: A multicenter, cross-sectional observational in situ simulation study. *J Emerg Med* 2016; 50:403-15. e1-3.
- ❖ Kharbanda AB, Rai AJ, Cosme Y et al. Novel serum and urine markers for pediatric appendicitis. *Acad Emerg Med* 2012; 19:56-62.
- ❖ Kim YA, Ha EJ, Jhang WK, et al. Early blood lactate area as a prognostic marker in pediatric septic shock. *Intensive Care Med* 2013; 39:1818–23.

- ❖ Kim S, Kim HJ, Ahn HS, et al. Is plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin a predictive biomarker for acute kidney injury in sepsis patients? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Critical Care* 2016; 33:213–23.
- ❖ King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol* 2011; 22:302-7.
- ❖ Kjærgaard AG, Rødgaard-Hansen S, Dige A, et al. Monocyte expression and soluble levels of the haemoglobin receptor (CD163/sCD163) and the mannose receptor (MR/sMR) in septic and critically ill non-septic ICU patients. *PLoS One* 2014;9: e92331.
- ❖ Klein Klouwenberg PM, Cremer OL, van Vught LA et al. Likelihood of infection in patients with presumed sepsis at the time of intensive care unit admission: a cohort study. *Crit Care*. 2015 Sep 7; 19:319.
- ❖ Kofoed K, Andersen O, Kronborg G et al. Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care*. 2007; 11(2): R38.
- ❖ Kumar A. Early antimicrobial therapy in severe sepsis and septic shock. *Curr Infect Dis Rep* 2010; 12:336–44
- ❖ Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34:1589–96.

- ❖ Kustán P, Szirmay B, Horváth-Szalai et al. Urinary orosomucoid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55:299-307.
- ❖ Lacroix J, Cotting J, Network PALlaSIP. Severity of illness and organ dysfunction scoring in children. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6: S126–34.
- ❖ Lane RD, Funai T, Reeder R et al. High Reliability pediatric septic shock quality improvement initiative and decreasing mortality. *Pediatrics* 2016;138: pii:e20154153
- ❖ Larsen GY, Mecham N, Greenberg R. An emergency department septic shock protocol and care guideline for children initiated at triage. *Pediatrics* 2011;127: e1585–92.
- ❖ Lautz AJ, Dziorny AC. Value of Procalcitonin Measurement for Early Evidence of Severe Bacterial Infections in the Pediatric Intensive Care Unit. *J Pediatr* 2016; 179:74-81.
- ❖ Levi M van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* 2016; 149: 38–44.
- ❖ Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference *Crit Care Med.* 2003; 31:1250-6.
- ❖ Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J. Leukoc Biol* 2004; 76:909-25
- ❖ Lin M, Park S, Hayden A et al. Clinical utility of soluble interleukin-2 receptor in hemophagocytic syndromes: a systematic scoping review. *Ann Hematol* 2017; 96:1241-51.

- ❖ Liu B, Chen YX, Yin Q et al. Diagnostic value and prognostic evaluation of Presepsin for sepsis in an emergency department. *Crit Care* 2013;17: R244.
- ❖ Llewelyn MJ, Berger M, Gregory M, et al. Sepsis biomarkers in unselected patients on admission to intensive or high-dependency care. *Crit Care* 2013;17: R60
- ❖ Mamani M, Hashemi SH, Hajilooi M et al. Evaluation of fibronectin and C-reactive protein levels in patients with sepsis: a case-control study. *Acta Med Iran.* 2012; 50:404-10.
- ❖ Marshall T, Williams KM. Proteomics and its impact upon biomedical science. *Br J Biomed Sci* 2002; 59:47-64.
- ❖ Martin L, van Meegern A, Doemming S et al. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Front Immunol.* 2015; 20;6:404.
- ❖ Masarwa R, Paret G, Perlman A, et al. Role of vasopressin and terlipressin in refractory shock compared to conventional therapy in the neonatal and pediatric population: A systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Crit Care* 2017; 21:1.
- ❖ Masson S, Caironi P, Fanizza C, et al. Circulating presepsin (soluble CD14 subtype) as a marker of host response in patients with severe sepsis or septic shock: data from the multicenter, randomized ALBIOS trial. *Intensive Care Med* 2015; 41:12-20.
- ❖ Masson PL, Heremans JF. Metal combining properties of human lactoferrin (red milk protein). The involvement of bicarbonate in the reaction. *Eur J Biochem.* 1968; 6:579–84.

- ❖ Matera G, Puccio R, Giancotti A, et al. Impact of interleukin-10, soluble CD25 and interferon- γ on the prognosis and early diagnosis of bacteremic systemic inflammatory response syndrome: a prospective observational study. *Crit Care*. 2013;5;17: R64.
- ❖ Mathias B, Mira JC, Larson SD. Pediatric sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2016; 28:380–387.
- ❖ Matics TJ, Sanchez-Pinto LN. Adaptation and Validation of a Pediatric Sequential Organ Failure Assessment Score and Evaluation of the Sepsis-3 Definitions in Critically Ill Children. *JAMA Pediatr*. 2017; 171: e172352.
- ❖ Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A et al. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28:451-7.
- ❖ McGrath EJ, Asmar BI. Nosocomial infections and multidrug-resistant bacterial organisms in the pediatric intensive care unit. *Indian J Pediatr* 2011; 78:176–184.
- ❖ Menon K, McNally D, Choong K, et al. A systematic review and meta-analysis on the effect of steroids in pediatric shock. *Pediatr Crit Care Med* 2013; 14:474–80.
- ❖ Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, et al. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol* 2015; 6:257.
- ❖ Miescier MJ, Lane RD, Sheng X et al. Association between initial emergency department lactate and use of vasoactive medication in children with septic shock. *Pediatr Emerg Care* [EPub ahead of print; January 6, 2017.]
- ❖ Møller H. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72:1–13.

- ❖ Møller HJ, Moestrup SK, Weis C, et al. Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. *Crit Care Med* 2006; 34:2561–6.
- ❖ Nagata T, Yasuda Y, Ando M, et al. Clinical impact of kidney function on presepsin levels. *PLoS One* 2015;10: e0129159.
- ❖ Nasioudis D1, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol* 2015; 204:471-9.
- ❖ Nichols B, Kubis S, Hewlett J et al. Hydrocortisone therapy in catecholamine-resistant pediatric septic shock: A pragmatic analysis of clinician practice and association with outcomes. *Pediatr Crit Care Med* 2017;18: e406–e414.
- ❖ O'Donnell LC, Druhan LJ, Avalos BR. Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 2002;72: 478–85.
- ❖ O'Hara R, Murphy E.P, Whitehead AS, et al. Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res* 2000; 2:142-4.
- ❖ Oliveira CF, Nogueira de Sa FR, Oliveira DS, et al. Time- and fluid-sensitive resuscitation for hemodynamic support of children in septic shock: Barriers to the implementation of the American College of Critical Care Medicine/Pediatric Advanced Life Support Guidelines in a pediatric intensive care unit in a developing world. *Pediatr Emerg Care* 2008;24: 810–5.

- ❖ Opal SM van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med* 2015; 277: 277–93.
- ❖ Pastille E, Didovic S, Brauckmann D et al. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2011;186: 977–86.
- ❖ Paul R, Neuman MI, Monuteaux MC, et al. Adherence to PALS Sepsis Guidelines and Hospital Length of Stay. *Pediatrics* 2012;130: e273–80.
- ❖ Peetermans M, Vanassche T, Liesenborghs L et al. Bacterial pathogens activate plasminogen to breach tissue barriers and escape from innate immunity. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42:866-82.
- ❖ Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010;14: R15.
- ❖ Pizarro CF, Troster EJ, Damiani D, et al Absolute and relative adrenal insufficiency in children with septic shock. *Crit Care Med* 2005; 33:855–9.
- ❖ Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa K et al. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ* 2016;353: i2375.
- ❖ Rainer TH, Leung LY, Chan C et al. Circulating human leucine-rich α -2-glycoprotein 1 mRNA and protein levels to detect acute appendicitis in patients with acute abdominal pain. *Clin Biochem* 2017; 50:485-90.
- ❖ Reddy VV, Myles A, Cheekatla SS et al. Soluble CD25 in serum: a potential marker for subclinical macrophage activation syndrome in patients with active systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Int J Rheum Dis* 2014; 17:261-7.

- ❖ Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006; 24:971-83.
- ❖ Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–77.
- ❖ Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2016. *Crit. Care Med.* 2017; 45:486–552.
- ❖ Rowland T, Hilliard H, Barlow G. Procalcitonin: potential role in diagnosis and management of sepsis. *Adv Clin Chem.* 2015; 68:71-86
- ❖ Ruth A, McCracken CE, Fortenberry JD et al. Pediatric severe sepsis: current trends and outcomes from the Pediatric Health Information Systems database. *Pediatr Crit Care Med* 2014; 15:828–38.
- ❖ Ruth A, McCracken CE, Fortenberry JD et al. Extracorporeal therapies in pediatric severe sepsis: Findings from the pediatric health-care information system. *Crit Care* 2015; 19:397
- ❖ Saito K, Wagatsuma T, Toyama H, et al. Sepsis is Characterized by the increases in percentages of circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J Exp Med* 2008; 17:61–8.
- ❖ Sankar J, Sankar MJ, Suresh CP et al. Early goal-directed therapy in pediatric septic shock: Comparison of outcomes “with” and “without” intermittent superior venacaval oxygen saturation monitoring: A prospective cohort study. *Pediatr Crit Care Med* 2014;15: e157–167.

- ❖ Sapa A, Rak A, Wybieralska M et al. Diagnostic usefulness of sCD163, procalcitonin and neopterin for sepsis risk assessment in critically ill patients. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26:101–8
- ❖ Sarthi M, Lodha R, Vivekanandhan S et al. Adrenal status in children with septic shock using low-dose stimulation test. *Pediatr Crit Care Med* 2007; 8:23–8.
- ❖ Scheutz P, Chiappa V, Briel M et al. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions. *Arch Intern Med* 2011; 171:1322–31.
- ❖ Schlapbach LJ, MacLaren G, Festa M, et al. Prediction of pediatric sepsis mortality within 1 h of intensive care admission. *Intensive Care Med* 2017; 43:1085–96.
- ❖ Schlapbach LJ, Straney L, Alexander J, et al. Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002–13: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015; 15:46–54.
- ❖ Schuller KA, Hsu BS, Thompson AB. The Rate of sepsis in a national pediatric population, 2006 to 2012. *Clin Pediatr (Phila)* 2017; 56:1001–7.
- ❖ Scott HF, Donoghue AJ, Gaieski DF, et al. The utility of early lactate testing in undifferentiated pediatric systemic inflammatory response syndrome. *Acad Emerg Med* 2012; 19:1276–80.
- ❖ Sebat F, Musthafa AA, Johnson D, et al. Effect of a rapid response system for patients in shock on time to treatment and mortality during 5 years. *Crit Care Med* 2007; 35:2568–75.
- ❖ Seidelin JB, Nielsen OH, Strøm J. Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1613-8.

- ❖ Serada S, Fujimoto M, Ogata A et al. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:770–4.
- ❖ Seymour CW, Gesten F, Prescott HC et al. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Engl J Med* 2017; 376:2235–44
- ❖ Sharma NK, Salomao R. Sepsis Through the Eyes of Proteomics: The Progress in the Last Decade. *Shock* 2017;4717-25.
- ❖ Shirai R, Hirano F, Ohkura N, et al. Up-regulation of the expression of leucine-rich alpha (2)-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382:776-9
- ❖ Simon L, Gauvin F, Amre DK et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39:206-17.
- ❖ Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315:801–10.
- ❖ Singer E, Markó L, Paragas N et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013; 207:663-72.
- ❖ Siqueira-Batista R, Mendonca EG, Gomes AP, et al. Proteomic updates on sepsis. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58:376-382.
- ❖ Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils. *J Clin Invest* 2016; 126:1612–20.

- ❖ Stoppini M, Bellotti V. Systemic amyloidosis: lessons from β 2-microglobulin. *J Biol Chem.* 2015;17; 290:9951-8.
- ❖ STRING: functional protein association networks. <https://string-db.org/> (acceso septiembre 2018).
- ❖ Su L, Feng L, Liu C et al. Diagnostic value of urine sCD163 levels for sepsis and relevant acute kidney injury: A prospective study. *BMC Nephrol* 2012; 1:123.
- ❖ Su L, Feng L, Song Q et al. Diagnostic value of dynamics serum sCD163, sTREM-1, PCT, and CRP in differentiating sepsis, severity assessment, and prognostic prediction. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:9699875
- ❖ Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140, 805–20.
- ❖ Telang S. Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense. *Nutrients.* 2018;4;10. pii: E1228.
- ❖ Thomas NJ, Carcillo JA, Doughty LA et al. Plasma concentrations of defensins and lactoferrin in children with severe sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:34–8.
- ❖ Thompson GC, Macias CG. Recognition and management of sepsis in children: practice patterns in the emergency department. *J Emerg Med* 2015; 49:391–9.
- ❖ Tothova Z, Berliner N. Hemophagocytic syndrome and critical illness: new insights into diagnosis and management. *J Intensive Care Med* 2015; 30:401e12.

- ❖ Trzeciak S, Glaspey LJ, Dellinger RP, et al. Randomized controlled trial of inhaled nitric oxide for the treatment of microcirculatory dysfunction in patients with sepsis. *Crit Care Med* 2014; 42:2482–92.
- ❖ Turner DA, Kleinman ME. The use of vasoactive agents via peripheral intravenous access during transport of critically ill infants and children. *Pediatr Emerg Care* 2010; 26: 563-6.
- ❖ Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003; 422:193-7.
- ❖ Uhlar CM, Burgess CJ, Sharp PM et al. Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily. *Genomics* 1994; 19:228-35.
- ❖ van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17:407-20.
- ❖ Ventura AM, Shieh HH, Bousso A, et al. Double-blind prospective randomized controlled trial of dopamine versus epinephrine as first-line vasoactive drugs in pediatric septic shock. *Crit Care Med* 2015; 43:2292–302.
- ❖ Vincent JL, Moreno R, Takala J et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22:707–10.
- ❖ Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34:344–353.
- ❖ Vogel HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem. Cell Biol* 2012;90: 233–244.

- ❖ Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12:216–220.
- ❖ Wang X, Abraham S, McKenzie J et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF β signalling. *Nature* 2013; 499:306-11.
- ❖ Wang F, Kohan AB, Lo CM, Liu M, Howles P, Tso P. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *J Lipid Res.* 2015; 56:1403–18.
- ❖ Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C, Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment, *Clin. Chem.* 1995; 41:867–71
- ❖ Watson RS, Carcillo JA. Scope and epidemiology of pediatric sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6: S3–5.
- ❖ Watson RS, Crow SS, Hartman ME, et al. Epidemiology and outcomes of pediatric multiple organ dysfunction syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2017;18: S4–S16.
- ❖ Weiss SL, Fitzgerald JC, Balamuth F, et al. Delayed antimicrobial therapy increases mortality and organ dysfunction duration in pediatric sepsis. *Crit Care Med* 2014; 42:2409–17.
- ❖ Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J, et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: The sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:1147–57.
- ❖ Weitzman S. Approach to hemophagocytic syndromes. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011:178e83.

- ❖ Wheeler DS. Introduction to Pediatric Sepsis. *Open Inflamm J* 2011; 4:1–3.
- ❖ Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6:359-62
- ❖ Wong HR, Salisbury S, Xiao Q, et al. The pediatric sepsis biomarker risk model. *Crit Care* 2012;16: R174.
- ❖ Xiao K, Su L, Yan P, et al. Alpha-1-acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. *J Crit Care*. 2015; 30:744–51.
- ❖ Yuan H, Huang J, Lv B et al. Diagnosis value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:520294.
- ❖ Yende S, Austin S, Rhodes A, et al. Long-term quality of life among survivors of severe sepsis: analyses of two international trials. *Crit. Care Med* 2016; 44, 1461–67.
- ❖ Zhang Y, He J, Zhao J, et al. Effect of ApoA4 on SERPINA3 mediated by nuclear receptors NR4A1 and NR1D1 in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 487:327-32.
- ❖ Zhou Z, Chen H, Ju H et al. Circulating retinol binding protein 4 levels in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis* 2017; 16:180.
- ❖ Zimmerman JJ, Williams MD. Adjunctive corticosteroid therapy in pediatric severe sepsis: Observations from the RESOLVE study. *Pediatr Crit Care Med* 2011; 12:2–8.

- ❖ Zou L, Feng Y, Li Y, et al. Complement factor B is the downstream effector of TLRs and plays an important role in a mouse model of severe sepsis. *Journal of Immunology* 2013;191: 5625–35.

ANEXOS

Anexo 1. Informes de Comité de ética.



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DE EUSKADI (CEIC-E)

D^a Iciar Alfonso Farnós como Secretaria del CEIC de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CEIC-E)

CERTIFICA

Que este Comité, de acuerdo a la ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos aplicables, ha evaluado el proyecto de investigación, titulado "**Aplicación de la proteómica, estudios celulares y de citocinas para la identificación de los factores inmunológicos del huésped implicados en el fallo multiorgánico de pacientes con sepsis graves y síndromes hemofagocíticos**"

Versión del Protocolo: Diciembre 2012
Versión de la HIP:
PACIENTE ADULTO / versión 2 de fecha 14 Enero 2013
PACIENTE MAYOR DE 12 AÑOS/ versión 2 de fecha 13 Febrero 2013
PADRES-TUTORES PACIENTE MENOR/ versión 2 de fecha 13 Febrero 2013

Y que este Comité reunido el día **30 de enero de 2013** (recogido en acta **01/2013**) ha decidido emitir **Informe Favorable** a que dicho proyecto sea realizado por los siguientes investigadores:

❖ Dra. Itziar Astigarraga *Hospital Universitario Cruces*

Lo que firmo en Vitoria, a 13 de Febrero de 2013

Fdo:



Dra. Iciar Alfonso Farnós
Secretaria del CEIC de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CEIC-E)



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DE EUSKADI (CEIC-E)

D^a Iciar Alfonso Farnós como Secretaria del CEIC de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CEIC-E)

CERTIFICA

Que este Comité, de acuerdo a la ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos aplicables, ha evaluado el proyecto de investigación, titulado "**Sepsis graves y Síndromes hemofagocíticos: Estudio de las alteraciones de la respuesta inmune e inflamatoria de activación linfo-monocitaria para identificar nuevos biomarcadores diagnósticos**"

Versión del Protocolo: Diciembre 2012
Versión de la HIP:
DONACION MUESTRAS BIOBANCO / Versión 1 3 de diciembre 2012
PACIENTE ADULTO / versión 2 de fecha 14 Enero 2013
PACIENTE MAYOR DE 12 AÑOS/ versión 2 de fecha 13 Febrero 2013
PADRES-TUTORES PACIENTE MENOR/ versión 2 de fecha 13 Febrero 2013

Y que este Comité reunido el día **30 de enero de 2013** (recogido en acta **01/2013**) ha decidido emitir **Informe Favorable** a que dicho proyecto sea realizado por los siguientes investigadores:

❖ Itziar Astigarraga Aguirre, Hospital Universitario Cruces, Servicio Pediatría

Lo que firmo en Vitoria, a 13 de Febrero de 2013

Fdo:



Dra. Iciar Alfonso Farnós
Secretaria del CEIC de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CEIC-E)

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

ASISTENTES

PRESIDENTE

D. Alberto Alonso Ruiz

VOCALES

D. Francisco José Álvarez Díaz
D. Francisco Javier Santamaría Sandi
D. Mikel Latorre Guisasola
D. José Ignacio Pijoán Zubizarreta
D. Luis Villoldo Ortega
D. Manuel Zaballa Itigüez
D. Adolfo González Calles
D. Francisco Javier González Mielgo

SECRETARIA

D^a. Amaya Martínez Galarza

ACTA 5/11 Reunión Extraordinaria Mayo 2011

En Cruces-Barakaldo, el día 4 de Mayo de 2011, a las 8 horas 30 minutos, se reúnen los miembros del Comité señalados al margen. Excusa su asistencia D. José Ramón Bilbao Catalá. Se trataron los siguientes temas:

IV-LECTURA DE DOCUMENTACIÓN RECIBIDA

- a) Carta de la Dra. Astigarraga/S^a Pediatría investigadora principal del estudio **"Identificación de nuevos biomarcadores de inflamación y activación linfomonocitaria para desarrollar nuevas herramientas diagnósticas en las Sepsis Graves y Síndromes Hemofagocíticos. Estudio HEMOSEP"** (Dra. Astigarraga) (S^a Pediatría) (código CEIC E10/50) en la que da respuesta a las consideraciones del CEIC según Acta 8/10 y adjunta la Hoja de Información al paciente adulto y Consentimiento Informado versión 19 de Abril de 2011, la Hoja de Información al adulto control y Consentimiento Informado versión 19 de Abril de 2011, la Hoja de Información al paciente menor y Consentimiento Informado versión 19 de Abril de 2011, la Hoja de Información al menor control y Consentimiento Informado versión 19 de Abril de 2011, la Hoja de Información al padre/tutor del paciente menor y Consentimiento Informado versión 19 de Abril de 2011 y la Hoja de Información al padre/tutor del menor control y Consentimiento Informado versión 19 de Abril de 2011. Tras su valoración, este CEIC decide dar su **APROBACIÓN ÉTICA** al estudio aunque tiene que realizar la siguiente consideración:

- dado que algunos participantes son menores y no van a recibir ningún beneficio derivado de su participación, la realización del estudio debe ser puesta en conocimiento del Ministerio Fiscal (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica)

Asimismo, se recuerda a la investigadora que deben informar al CEIC del desarrollo e incidencias del estudio durante su realización, así como de la finalización del mismo, con la presentación del Informe Final. Se informa a la investigadora.

Sin más temas por tratar, se da por finalizada la reunión a las 8 horas 45 minutos del día señalado al principio.

LA SECRETARIA



Osakidetza
Servicio vasco de salud

GURUZETAKO OSPITALEA
HOSPITAL DE CRUCES
IKERKUNTZA KLINIKORAKO BATZORDE ETIKOA
COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Anexo 2. Modelo del consentimiento informado para los pacientes con sepsis.

HOJA DE INFORMACIÓN PADRES/TUTORES DE PACIENTE MENOR

TÍTULO DEL PROYECTO: SEPSIS GRAVES Y SÍNDROMES HEMOFAGOCÍTICOS: ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA DE ACTIVACIÓN LINFO-MONOCITARIA PARA IDENTIFICAR NUEVOS BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS/APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA, ESTUDIOS CELULARES Y DE CITOCINAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES INMUNOLÓGICOS DEL HUÉSPED IMPLICADOS EN EL FALLO MULTIORGÁNICO DE PACIENTES CON SEPSIS GRAVES Y SÍNDROMES HEMOFAGOCÍTICOS

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra ITZIAR ASTIGARRAGA AGUIRRE del HOSPITAL UNIVERSITARIO CRUCES

HOSPITALES PARTICIPANTES: HOSPITAL UNIVERSITARIO CRUCES, HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO Y HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA

ENTIDADES FINANCIADORAS: Programa Saiotek. Dpto. Industria, Innovación, Comercio y Turismo y Dpto. de Sanidad (Gobierno Vasco)

DURACIÓN: Diciembre 2013-Diciembre 2016

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Tanto las sepsis graves como los síndromes hemofagocíticos se caracterizan por una inflamación exagerada y un mal funcionamiento de la respuesta inmune (“nuestras defensas”), que pueden originar una situación grave con fallo en distintos órganos. Pensamos que analizar las alteraciones sanguíneas relacionadas con las “defensas” y la respuesta inflamatoria puede ser importante para conseguir un diagnóstico precoz y nuevos tratamientos que puedan frenar estas graves complicaciones.

Considerando que la sospecha clínica es que su hijo/a presenta una infección grave o un fallo orgánico debido a una reacción inflamatoria excesiva, EL INVESTIGADOR CLÍNICO que le informa..... del HOSPITAL UNIVERSITARIO

.....le invita a su hijo/a a participar en este proyecto de investigación denominado “Sepsis graves y síndromes hemofagocíticos: estudio de las alteraciones de la respuesta inmune e inflamatoria de activación linfo-monocitaria para identificar nuevos biomarcadores diagnósticos/Aplicación de la proteómica, estudios celulares y de citocinas para la identificación de los factores inmunológicos del huésped implicados en el fallo multiorgánico de pacientes con sepsis graves y síndromes hemofagocíticos”, para lo que solicitamos su consentimiento. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Euskadi (CEIC).

La participación de su hijo/a es totalmente voluntaria. Antes de decidir si quiere que su hijo/a participe o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este estudio. Queremos asegurarnos que comprende correctamente el objetivo, los procedimientos del estudio, incluyendo los posibles riesgos y beneficios esperados y lo que implica para su hijo/a la participación en el mismo. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar aclaración sobre cualquier duda. Le rogamos no firme antes de tener la seguridad de entender todos los aspectos y objetivos del estudio.

PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Este estudio se realiza gracias a una colaboración entre la Universidad del País Vasco (UPV-EHU) y la Fundación Vasca para la Innovación e Investigaciones Sanitarias (BIOEF). El proyecto se desarrollará conjuntamente en la Facultad de Medicina y los hospitales de Cruces y de Basurto. Todas las partes implicadas en este estudio tienen amplia experiencia en este tema.

Tanto las sepsis graves como los síndromes hemofagocíticos son enfermedades en las que es necesario descubrir nuevos métodos de diagnóstico rápido y de tratamiento. Para conseguirlo es necesario profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune e inflamatoria de los pacientes y buscar su aplicación clínica para descubrir herramientas que ayuden a evitar el desarrollo de lesiones o secuelas en los órganos del cuerpo.

EXPLICACIÓN DEL ESTUDIO:

El estudio consiste en analizar algunas proteínas y sustancias que circulan por la sangre, y que podrían orientar a conocer si existe alguna alteración de sus defensas y de la respuesta inflamatoria. Los resultados analíticos y de proteómica podrían completarse con estudios

genómicos para descartar ciertas inmunodeficiencias conocidas. No se va a administrar ningún medicamento, ni se va a realizar ningún cambio en el tratamiento que necesita su hijo/a, de manera que su participación en este estudio no tiene ningún tipo de repercusión clínica directa en su hijo/a. El estudio se va a centrar exclusivamente en analizar las muestras sanguíneas. Coincidiendo con los análisis necesarios para la atención de su hijo/a, se le extraerá una muestra adicional de sangre que se utilizará para la investigación. Por la participación en el estudio, su hijo/a no presenta ningún riesgo adicional a la extracción rutinaria de sangre y no recibirá contraprestación económica de ningún tipo.

MUESTRAS A RECOGER

Para realizar este estudio, le proponemos la extracción de una muestra adicional cuya cantidad dependerá de su peso y edad (5 o 10 ml de sangre) y que será utilizada con fines de investigación. La sangre será procesada en el hospital y se depositará en el Biobanco. Posteriormente, una parte se enviará a la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco y las determinaciones se realizarán en el Departamento de Biología Celular.

BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA

Dado el carácter exploratorio de este proyecto de investigación, su hijo/a no va a obtener ningún beneficio directo derivado de su participación en este estudio. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mejor conocimiento de estas enfermedades y un avance de la medicina en beneficio de la sociedad. Debe saber que la participación de su hijo/a en este estudio es completamente voluntaria y que puede decidir que su hijo/a no participe y retirar el consentimiento en cualquier momento. Esta renuncia no alteraría la relación con el equipo médico que atiende a su hijo/a ni produciría ningún perjuicio en su tratamiento, recibiendo todos los cuidados médicos necesarios.

TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y CONFIDENCIALIDAD

Se solicita su consentimiento para la utilización de los datos y muestra de sangre de su hijo/a para el desarrollo de este proyecto de investigación. Tanto los datos personales (edad, sexo, raza), como clínicos o la muestra para investigación, se recogerán empleando un procedimiento de codificación. Sólo el investigador o médico responsable podrá relacionar estos datos con los de su hijo/a, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento. Sólo a él o ella le corresponde garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación.

La información será procesada, pero en ningún caso será posible identificar a su hijo/a, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. De acuerdo a esta ley le informamos que los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado, que reúne las medidas de seguridad de nivel alto. Asimismo, los resultados de esta investigación podrán publicarse en revistas científicas o presentarse en sesiones clínicas, pero siempre garantizando el completo anonimato. Se garantiza el respeto a la calidad de los proyectos de investigación biomédica y el respeto a la dignidad de las personas durante su consecución, en cumplimiento de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

FINALIDAD DEL DEPÓSITO DE SUS MUESTRAS EN EL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN

Una vez que el estudio finalice el material biológico sobrante será **destruido**, salvo que usted autorice su **utilización para otros estudios** sobre **enfermedades inmunológicas** y líneas de investigación de **sepsis graves y síndromes hemofagocíticos**. A tal fin, se le ofrece, y Vd. deberá decidir si consiente o no, la opción de donar la muestra excedente de su hijo/a al **Biobanco Vasco para la Investigación**, de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitaria (BIOEF). Un biobanco es un centro de conservación en condiciones adecuadas de muestras, tejidos, ADN y otros derivados, que representan un valioso instrumento con destino a la investigación de enfermedades y que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes. El Biobanco de BIOEF está constituido en nodos, dos de los cuales están ubicados en el Hospital de Cruces y Basurto, donde irán sus muestras.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad. La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales o patentes. Con la firma de este consentimiento, Vd. autoriza al Biobanco Vasco para la Investigación, junto con el empleo de la muestra biológica, a utilizar los datos sobre salud o condición física o psíquica de su hijo/a, cuando éstos puedan ser relevantes para los fines de la investigación.

Firmando el consentimiento, Vd. autoriza a que las muestras de su hijo/a así conservadas se puedan ceder para la realización de proyectos de investigación relacionados con la adquisición de conocimiento de las enfermedades inmunológicas. Se le garantiza que estos proyectos de investigación serán autorizados por un Comité de Ética de la Investigación, y, la cesión de las muestras cumplirá las exigencias éticas y legales vigentes. En este caso, el Biobanco únicamente transferirá a los investigadores la muestra y los datos clínicos relevantes asociados de manera codificada. Ni los investigadores, ni el Biobanco en ningún caso tendrán acceso a su identidad.

Si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre las muestras y su hijo/a, puede optar por su conservación anonimizada, es decir, de manera que no sea posible unirla en el futuro a su identidad. De realizarlo así se romperá irreversiblemente la posibilidad de relacionar las muestras y los datos almacenados con los datos de identificación personal de su hijo/a. Tanto el Biobanco Vasco para la Investigación, como el investigador al que en un futuro se puedan ceder las muestras, son responsables del manejo de los Datos, conforme a las Leyes señaladas previamente sobre Protección de Datos de Carácter Personal, Autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley de Investigación biomédica.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la expresada habrá de ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento, siempre y cuando se le haya suministrado previamente la información que fuere necesaria.

ACCESO A LAS MUESTRAS Y/O LA INFORMACIÓN

Usted tiene derecho a conocer los datos genéticos clínicamente relevantes que se obtengan a partir del análisis futuro de las muestras de su hijo/a donadas, siempre que así lo desee, lo solicite y no hayan sido anonimizadas. Sin embargo, dado el carácter exploratorio de este estudio, no es previsible que se obtengan datos genéticos relevantes. En cualquier caso, si lo fuera, la información que se obtenga puede ser relevante también para sus familiares. Es decisión personal suya informar a dichos familiares, pero sería aconsejable con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y se valore su riesgo personal y familiar. Cuando la muestra se integre en el Biobanco Vasco para la Investigación, usted tendrá a su disposición toda la información relativa a la utilización de su muestra en proyectos de investigación solicitándose a su médico ITZIAR ASTIGARRAGA AGUIRRE. La muestra estará disponible si su hijo/a la requiere por motivos de salud siempre que no se haya anonimizado.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

En cualquier momento usted podrá revocar el consentimiento ya otorgado para participar en el Proyecto de Investigación o en la utilización de las muestras obtenidas, sin necesidad de dar explicaciones, sin que represente para su hijo/a ningún inconveniente y sin perder el derecho a recibir la atención médica necesaria. No se procederá a recoger nuevos datos ni muestras después del abandono del estudio. Si usted decidiera retirar a su hijo/a o no desea que su hijo/a participe en el estudio, la relación con el médico de su hijo/a NO se verá alterada en modo alguno. También puede solicitar la destrucción o la rotura definitiva del vínculo que une las muestras a los datos de identificación personal de su hijo/a, aunque los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente con las mismas.

Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos ante la Dra. ITZIAR ASTIGARRAGA del servicio de PEDIATRIA del Hospital de CRUCES, responsable clínico de la donación de su muestra biológica. Si necesita más información o alguna aclaración no dude en dirigirse a la Dra. ITZIAR ASTIGARRAGA (teléfono: 94 6006357)

CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Investigador/Responsable clínico: Dra. ITZIAR ASTIGARRAGA

TÍTULO DEL PROYECTO: SEPSIS GRAVES Y SÍNDROMES HEMOFAGOCÍTICOS: ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA DE ACTIVACIÓN LINFO-MONOCITARIA PARA IDENTIFICAR NUEVOS BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS/APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA, ESTUDIOS CELULARES Y DE CITOCINAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES INMUNOLÓGICOS DEL HUÉSPED IMPLICADOS EN EL FALLO MULTIORGÁNICO DE PACIENTES CON SEPSIS GRAVES Y SÍNDROMES HEMOFAGOCÍTICOS

Yo.....
.....con DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información para los padres/tutores, de la que se me ha entregado una copia. En el caso de que mi hijo/a sea mayor de 12 años, declaro haber leído también la hoja de información del paciente mayor de 12 años, entregándome asimismo una copia. Me han explicado las características y el objetivo del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar mi hijo/a, los derechos que puedo ejercitar, y las previsiones sobre el tratamiento de datos y muestras. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas, que han sido respondidas a mi entera satisfacción. Sé que se mantendrá en secreto la identidad de mi hijo/a y que se identificarán las muestras de mi hijo/a con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo doy mi consentimiento para que se utilicen las muestras y los datos asociados de mi hijo/a como parte de **este proyecto de investigación**. Consiento en que mi hijo/a participe voluntariamente en este proyecto de investigación y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por la participación de mi hijo/a en el estudio.

Confirmando que conozco la posibilidad de recibir información relativa a la salud de mi hijo/a derivada de los **análisis proteómicos o genómicos** que se realicen sobre mi muestra biológica una vez finalizada la investigación

SÍ quiero ser informado **NO** quiero ser informado

Confirmando que conozco la posibilidad, al finalizar el proyecto de investigación, de donar el excedente de la muestra de mi hijo/a, si lo hubiera, para realizar otros estudios y decido:

SÍ quiero la **destrucción** de la muestra excedente

NO quiero la **destrucción** (*depósito en el Biobanco Vasco para la Investigación O+ehun*)

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal: **Relación con el paciente:**

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR: Certifico que he explicado a la persona firmante la naturaleza y propósitos del estudio, beneficios potenciales y posibles riesgos asociados con la participación de su hijo/a en el mismo y las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados. He respondido a las preguntas que me han sido formuladas y he sido testigo de la firma en la fecha indicada a continuación. Me comprometo a que tanto las muestras como los datos personales de las personas participantes en el estudio serán protegidos e incluidos en un fichero con las medidas de seguridad y garantías que ampara la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999 de 13 de diciembre, según el cumplimiento de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

(Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información)

Fecha Firma.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo,revoco el consentimiento prestado en la fecha.....y declaro que, tras la información recibida, deseo que mi hijo/a abandone el estudio

Fecha.....

FirmaFirma del Dr/Dra.....

CONSENTIMIENTO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS AL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN DE BIOEF

Responsable clínico: Dra. ITZIAR ASTIGARRAGA

Yo _____

—
Afirmo haber obtenido información adecuada sobre la posibilidad de transferir y almacenar la muestra biológica junto con la información clínica relacionada al Biobanco Vasco para la Investigación de la Fundación BIOEF para su uso en otros estudios sobre enfermedades inmunológicas y líneas de investigación de sepsis graves y síndromes hemofagocíticos. Además, he obtenido información adecuada sobre la finalidad del proceso y **conservación**, así como sobre la seguridad y garantía de cumplimiento de la legalidad vigente y de la posibilidad de ceder a terceros **las muestras** para futuros proyectos de investigación que cumplan con las exigencias éticas y legales aplicables.

Me han informado que el Hospital Universitario de CRUCES/BASURTO/DONOSTIA puede transferir las muestras y los datos de salud relevantes de mi hijo/a (excepto los que le identifiquen) de las enfermedades inmunológicas al Biobanco Vasco para la Investigación.

Yo **SÍ** quiero donar la muestra

Yo **NO** quiero donar la muestra

Me han informado que puedo **donar la muestra y los datos clínicos sobre la salud asociados de mi hijo/a** de forma:

Que la **muestra SÍ** pueda ser relacionada con datos identificativos

Que la **muestra NO** pueda ser relacionada con datos identificativos

Me han advertido sobre la posibilidad de **recibir información derivada de futuros análisis genéticos** que pudieran realizarse sobre la muestra biológica de mi hijo/a (solo si la muestra SÍ puede ser relacionada con los datos de identificación personal de mi hijo/a).

Yo **SÍ** solicito información

Yo **NO** quiero recibir información

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal/familiar.....

Anexo 3. Kit específico para la depleción de las 12 proteínas abundantes

INSTRUCTIONS



Pierce™ Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns

85164 85165

2807.0

Number	Description
85164	Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns, 6 columns, each column contains 62% slurry in 10mM PBS, 0.15M NaCl, 0.02% sodium azide, pH 7.4
85165	Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns, 24 columns, each column contains 62% slurry in 10mM PBS, 0.15M NaCl, 0.02% sodium azide, pH 7.4

Storage: Upon receipt store at 4°C. Product shipped with an ice pack. Do not freeze product.

Introduction

The Thermo Scientific Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns are used for single-step removal of twelve high-abundance proteins from 10µL of human serum or plasma. The resin uses highly specific immobilized antibodies for protein removal, providing minimal nonspecific interactions with other proteins.

Plasma proteome studies are limited by the vast dynamic range (10 orders of magnitude) of protein abundance. Many proteins of pharmaceutical interest are present at low concentrations in the plasma and are difficult to detect in the presence of high-abundant proteins. The proteins listed in the table below constitute ~95% of all plasma proteins. The Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns remove > 95% of these 12 high-abundant proteins from 10µL of serum or plasma samples and enable the identification and quantitation of low-abundant proteins in samples by mass spectrometry (MS).

Table 1. List of the top 12 proteins removed by the Thermo Scientific Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns.

α1-Acid Glycoprotein	Fibrinogen
α1-Antitrypsin	Haptoglobin
α2-Macroglobulin	IgA
Albumin	IgG
Apolipoprotein A-I	IgM
Apolipoprotein A-II	Transferrin

Important Product Information

- The depletion spin columns contain a storage solution used as a dilution and binding buffer for direct processing of 10µL of serum or plasma.

Note: No other additions or solvent exchanges are required before protein depletion.

- Each depletion spin column processes a maximum of 10µL of human serum or plasma. To process larger serum sample volumes, use multiple depletion spin columns. For serum samples containing abnormally high amounts of albumin or IgG, the sample load may need to be reduced.
- The depletion spin columns are designed for single use. Do not reuse the resin.
- The depletion spin columns are designed for use with human serum or plasma samples and have not been tested on other species. Alternative human biological fluids (e.g., cerebrospinal fluid or amniotic fluid) may be used with this product, but may require optimization.

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 966-0747
(815) 966-7316 fax

www.thermoscientific.com/biarc

Additional Materials Required

- Microcentrifuge capable of operating at 1000 × g
- 2mL collection tubes
- End-over-end mixer

Spin Column Procedure for Top 12 Protein Removal

Note: The concentration of serum/plasma proteins can vary widely depending on the origin of the sample. Each 810µL of antibody resin slurry is optimized to process 10µL (600µg) of serum or plasma. For best results, optimize the ratio of sample to slurry volume for each specific application.

1. Equilibrate the depletion spin column to room temperature.
2. Remove the column screw cap and add 10µL of sample directly to the resin slurry in the column.
3. Cap the column and invert the column several times until the resin is completely suspended in the solution.
4. Incubate the mixture in the column with gentle end-over-end mixing for 60 minutes at room temperature. Make sure the sample mixes with the resin during the incubation period. Alternatively, vortex every 5 minutes.
5. Twist off the bottom closure and loosen the cap. Place column into a 2mL collection tube and centrifuge at 1000 × g for 2 minutes.
6. Discard the column containing the resin.
7. Filtrate contains sample with the top 12 proteins removed. Use for further processing or store for later use. The depleted sample will be in 10mM PBS, 0.15M NaCl, 0.02% azide, pH 7.4.
8. Sample processing will depend on the type of downstream analysis and may require buffer exchange and/or concentration for 2D gel electrophoresis and MS analysis. Use Thermo Scientific Pierce Protein Concentrators for buffer exchanging and/or concentration (see Related Thermo Scientific Products Section).

Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
Incomplete removal of albumin or IgG	Sample exceeds binding capacity	Reduce amount of sample processed
	Incomplete binding	Increase incubation time
	Sample is not mixed during incubation	Mix the sample with resin by gentle end-over-end mixing and make sure that the sample is mixing with the resin during the incubation period.

Related Thermo Scientific Products

89875	Pierce Albumin/IgG Removal Kit
85161	Pierce Top 2 Abundant Protein Depletion Spin Columns, 6 columns
85162	Pierce Top 2 Abundant Protein Depletion Spin Columns, 24 columns
31876	Pierce Normal Human Serum
87748	Pierce Protein Concentrators, 9K MWCO, 7mL
23225	BCA Protein Assay Kit
24590	GelCode [™] Blue Stain Reagent, 500 mL
84840	Pierce MS Sample Prep Kit

General Reference

Anderson, N.L. and Anderson, N.G. (2002). The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1:845-67.

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 998-0747
(815) 998-7318 fax

www.thermoscientific.com/pierce

Anexo 4. Modelo de ELISA para SAA

Cloud-Clone Corp.

CEA88Hu 88 Tests
Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit
For Serum Amyloid A (SAA)
Organism Species: Homo sapiens (Human)
Instruction manual

FOR IN VITRO AND RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN CLINICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES

12th Edition

[INTENDED USE]

The kit is a competitive inhibition enzyme immunoassay technique for the in vitro quantitative measurement of SAA in human serum, plasma, tissue homogenates, cell lysates, cell culture supernates and other biological fluids.

[REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED]

Reagents	Quantity	Reagents	Quantity
Pre-coated, ready to use 96-well strip plate	1	Plate sealer for 96 wells	4
Standard	2	Standard Diluent	1X20mL
Detection Reagent A	1X120µL	Assay Diluent A	1X12mL
Detection Reagent B	1X120µL	Assay Diluent B	1X12mL
TMB Substrate	1X9mL	Stop Solution	1X6mL
Wash Buffer (30 X concentrate)	1X20mL	Instruction manual	1

[MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED]

- Microplate reader with 450 ± 10nm filter.
- Single or multi-channel pipettes with high precision and disposable tips.
- Microcentrifuge Tubes.
- Deionized or distilled water.
- Absorbent paper for blotting the microplate.
- Container for Wash Solution.
- 0.01mol/L (or 1X) Phosphate Buffered Saline (PBS), pH7.0-7.2.

[STORAGE OF THE KITS]

- For unopened kit: All the reagents should be kept according to the labels on vials. The Standard, Detection Reagent A, Detection Reagent B and the 96-well strip plate should be stored at -20°C upon receipt while the others should be at 4°C.
- For used kit: When the kit is used, the remaining reagents need to be stored according to the above storage condition. Besides, please return the unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack, and zip-seal the foil pouch.

23683 W. Forehand Dr., Unit 2281, Katy, TX 77494, USA | 801-432-538-0979 | www.cloud-clone.com | mail@cloud-clone.com

Cloud-Clone Corp.

Note:

It is highly recommended to use the remaining reagents within 1 month provided this is prior to the expiration date of the kit. For the expiration date of the kit, please refer to the label on the kit box. All components are stable up to the expiration date.

[SAMPLE COLLECTION AND STORAGE]

Serum - Use a serum separator tube and allow samples to clot for two hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 20 minutes at approximately 1,000g. Assay freshly prepared serum immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for 15 minutes at 1,000g at 2-8°C within 30 minutes of collection. Remove plasma and assay immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Tissue homogenates - The preparation of tissue homogenates will vary depending upon tissue type.

- Tissues were rinsed in ice-cold PBS to remove excess blood thoroughly and weighed before homogenization.
- Minced the tissues to small pieces and homogenized them in fresh lysis buffer (catalog: IS007, different lysis buffer needs to be chosen based on subcellular location of the target protein) (w/v = 1:20-1:50, e.g. 1mL lysis buffer is added in 20-50mg tissue sample) with a glass homogenizer on ice (Micro Tissue Grinders works, too).
- The resulting suspension was sonicated with an ultrasonic cell disrupter till the solution is clarified.
- Then, the homogenates were centrifuged for 5 minutes at 10,000g. Collect the supernatant and assay immediately or aliquot and store at <-20°C.

Cell Lysates - Cells need to be lysed before assaying according to the following directions.

- Adherent cells should be washed by cold PBS gently, and then detached with trypsin, and collected by centrifugation at 1,000g for 5 minutes (suspension cells can be collected by centrifugation directly).
- Wash cells three times in cold PBS.
- Resuspend cells in fresh lysis buffer with concentration of 10⁷ cells/mL. If it is necessary, the cells could be subjected to ultrasonication till the solution is clarified.
- Centrifuge at 1,500g for 10 minutes at 2-8°C to remove cellular debris. Assay immediately or aliquot and store at <-20°C.

Cell culture supernatants and other biological fluids - Centrifuge samples for 20 minutes at 1,000g. Collect the supernatant and assay immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note:

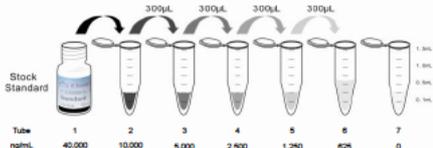
- Samples to be used within 5 days may be stored at 4°C, otherwise samples must be stored at -20°C (<1 month) or -80°C (<2 months) to avoid loss of bioactivity and contamination.
- Sample hemolysis will influence the result, so hemolytic specimen should not be used.
- When performing the assay, bring samples to room temperature.
- It is highly recommended to use serum instead of plasma for the detection based on quantity of our in-house data.

23683 W. Forehand Dr., Unit 2281, Katy, TX 77494, USA | 801-432-538-0979 | www.cloud-clone.com | mail@cloud-clone.com

Cloud-Clone Corp.

[REAGENT PREPARATION]

- Bring all kit components and samples to room temperature (18-25°C) before use. If the kit will not be used up in one time, please only take out strips and reagents for present experiment, and leave the remaining strips and reagents in required condition.
- Standard** - Reconstitute the Standard with 1.0mL of Standard Diluent, kept for 10 minutes at room temperature, shake gently (not to foam). The concentration of the standard in the stock solution is 40,000ng/mL. Please firstly dilute the stock solution to 10,000ng/mL, and the diluted standard serves as the highest standard (10,000ng/mL). Then prepare 5 tubes containing 0.3mL Standard Diluent and produce a double dilution series according to the picture shown below. Mix each tube thoroughly before the next transfer. Set up 5 points of diluted standard such as 10,000ng/mL, 5,000ng/mL, 2,500ng/mL, 1,250ng/mL, 625ng/mL, and the last EP tubes with Standard Diluent is the blank as Original.



- Detection Reagent A and Dilution Reagent B** - Briefly spin or centrifuge the stock Detection A and Detection B before use. Dilute them to the working concentration 100-fold with Assay Diluent A and B, respectively.
- Wash Solution** - Dilute 20mL of Wash Solution concentrate (30X) with 580mL of deionized or distilled water to prepare 600mL of Wash Solution (1X).
- TMB substrate** - Aspirate the needed dosage of the solution with sterilized tips and do not dump the residual solution into the vial again.

Note:

- Making serial dilution in the wells directly is not permitted.
- Prepare standard within 15 minutes before assay. Please do not dissolve the reagents at 37°C directly.
- Detection Reagent A and B are sticky solutions, therefore, slowly pipette them to reduce the volume errors.
- Please carefully reconstitute Standards or working Detection Reagent A and B according to the instruction, and avoid foaming and mix gently until the crystals are completely dissolved. To minimize imprecision caused by pipetting, use small volumes and ensure that pipettors are calibrated. It is recommended to suck more than 10µL for one pipetting.
- The reconstituted Standards, Detection Reagent A and Detection Reagent B can be used only once.
- If crystals have formed in the Wash Solution concentrate (30X), warm to room temperature and mix gently until the crystals are completely dissolved.
- Contaminated water or container for reagent preparation will influence the detection result.

23683 W. Forehand Dr., Unit 2281, Katy, TX 77494, USA | 801-432-538-0979 | www.cloud-clone.com | mail@cloud-clone.com

Cloud-Clone Corp.

[SAMPLE PREPARATION]

- We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
- Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments.
- Serum/plasma samples require about a 2 fold dilution. A suggested 2-fold dilution is 100µL Sample + 100µL PBS. Sample should be diluted by 0.01mol/L PBS (PH=7.0-7.2).
- If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of the kit is necessary.
- Tissue or cell extraction samples prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected ELISA results due to the impacts from certain chemicals.
- Due to the possibility of mismatching between antigen from other origin and antibody used in our kits (e.g., antibody targets conformational epitope rather than linear epitope), some native or recombinant proteins from other manufacturers may not be recognized by our products.
- Influenced by the factors including cell viability, cell number or sampling time, samples from cell culture supernatant may not be detected by the kit.
- Fresh samples without long time storage is recommended for the test. Otherwise, protein degradation and decarboxylation may occur in those samples and finally lead to wrong results.

[ASSAY PROCEDURE]

- Determine wells for diluted standard, blank and sample. Prepare 5 wells for standard points, 1 well for blank. Add 50µL each of dilutions of standard (read Reagent Preparation), blank and samples into the appropriate wells, respectively. And then add 50µL of Detection Reagent A to each well immediately. Shake the plate gently (using a microplate shaker is recommended). Cover with a Plate sealer. Incubate for 1 hour at 37°C. Detection Reagent A may appear cloudy. Warm to room temperature and mix gently until solution appears uniform.
- Aspirate the solution and wash with 350µL of 1X Wash Solution to each well using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher, and let it sit for 1-2 minutes. Remove the remaining liquid from all wells completely by snapping the plate onto absorbent paper. Repeat 3 times. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against absorbent paper.
- Add 100µL of Detection Reagent B working solution to each well. Incubate for 30 minutes at 37°C after covering it with the Plate sealer.
- Repeat the aspiration/wash process for total 5 times as conducted in step 2.
- Add 90µL of Substrate Solution to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for 10 - 20 minutes at 37°C (Don't exceed 30 minutes). Protect from light. The liquid will turn blue by the addition of Substrate Solution.
- Add 50µL of Stop Solution to each well. The liquid will turn yellow by the addition of Stop solution. Mix the liquid by tapping the side of the plate. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.

23683 W. Forehand Dr., Unit 2281, Katy, TX 77494, USA | 801-432-538-0979 | www.cloud-clone.com | mail@cloud-clone.com

- Remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate and confirm there is no bubble on the surface of the liquid. Then, run the microplate reader and conduct measurement at 450nm immediately.
- Note:**
- Assay preparation:** Keep appropriate numbers of wells for each experiment and remove extra wells from microplate. Rest wells should be resealed and stored at -20°C.
- Samples or reagents addition.** Please use the freshly prepared standard. Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of standards, samples, and reagents. Also, use separated reservoirs for each reagent.
- Incubation:** To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents are added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay. Incubation time and temperature must be controlled.
- Washing:** The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and false elevated absorbance reading.
- Controlling of reaction time:** Observe the change of color after adding TMB Substrate (e.g. observation once every 10 minutes), if the color is too deep, add Stop Solution in advance to avoid excessively strong reaction which will result in inaccurate absorbance reading.
- TMB Substrate** is easily contaminated. Please protect it from light.
- The environment humidity which is less than 60% might have some effects on the final performance, therefore, a humidifier is recommended to be used at that condition.

[TEST PRINCIPLE]

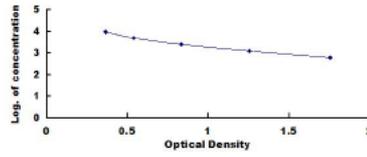
This assay employs the competitive inhibition enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific to SAA has been pre-coated onto a microplate. A competitive inhibition reaction is launched between biotin labeled SAA and unlabeled SAA (Standards or samples) with the pre-coated antibody specific to SAA. After incubation the unbound conjugate is washed off. Next, avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) is added to each microplate well and incubated. The amount of bound HRP conjugate is reverse proportional to the concentration of SAA in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is reverse proportional to the concentration of SAA in the sample.

[CALCULATION OF RESULTS]

This assay employs the competitive inhibition enzyme immunoassay technique, so there is an inverse correlation between SAA concentration in the sample and the assay signal intensity. Average the duplicate readings for each standard, control, and samples. Create a standard curve on log-log or semi-log graph paper, with the log of SAA concentration on the y-axis and absorbance on the x-axis. Draw the best fit straight line through the standard points and it can be determined by regression analysis. Using some plot software, for instance, curve expert 1.30, is also recommended. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

[TYPICAL DATA]

In order to make the calculation easier, we plot the O.D. value of the standard (X-axis) against the log of concentration of the standard (Y-axis), although concentration is the independent variable and O.D. value is the dependent variable. The O.D. values of the standard curve may vary according to the conditions of assay performance (e.g. operator, pipetting technique, washing technique or temperature effects). Typical standard curve below is provided for reference only.



Typical Standard Curve for SAA, Human ELISA.

[DETECTION RANGE]

625-10,000ng/mL. The standard curve concentrations used for the ELISA's were 10,000ng/mL, 5,000ng/mL, 2,500ng/mL, 1,250ng/mL, 625ng/mL.

[SENSITIVITY]

The minimum detectable dose of SAA is typically less than 25 ng/mL. The sensitivity of this assay, or Lower Limit of Detection (LLD) was defined as the lowest protein concentration that could be differentiated from zero. It was determined by subtracting two standard deviations to the mean optical density value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

[SPECIFICITY]

This assay has high sensitivity and excellent specificity for detection of SAA. No significant cross-reactivity or interference between SAA and analogues was observed.

Note: Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between SAA and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist.

[RECOVERY]

Matrices listed below were spiked with certain level of SAA and the recovery rates were calculated by comparing the measured value to the expected amount of SAA in samples.

Matrix	Recovery range (%)	Average(%)
serum(n=5)	80-97	85
EDTA plasma(n=5)	78-105	90
heparin plasma(n=5)	82-95	88

[LINEARITY]

The linearity of the kit was assayed by testing samples spiked with appropriate concentration of SAA and their serial dilutions. The results were demonstrated by the percentage of calculated concentration to the expected.

Sample	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16
serum(n=5)	91-103%	86-103%	87-97%	83-96%
EDTA plasma(n=5)	85-94%	81-98%	93-104%	79-102%
heparin plasma(n=5)	80-92%	95-106%	79-98%	80-99%

[PRECISION]

Intra-assay Precision (Precision within an assay): 3 samples with low, middle and high level SAA were tested 20 times on one plate, respectively.
Inter-assay Precision (Precision between assays): 3 samples with low, middle and high level SAA were tested on 3 different plates, 8 replicates in each plate.
 CV(%) = SD/meanX100
 Intra-Assay: CV<10%
 Inter-Assay: CV<12%

[STABILITY]

The stability of ELISA kit is determined by the loss rate of activity. The loss rate of this kit is less than 5% within the expiration date under appropriate storage condition. To minimize extra influence on the performance, operation procedures and lab conditions, especially room temperature, air humidity, incubator temperature should be strictly controlled. It is also strongly suggested that the whole assay is performed by the same operator from the beginning to the end.

[ASSAY PROCEDURE SUMMARY]

- Prepare all reagents, samples and standards;
- Add 50µL standard or sample to each well. And then add 50µL prepared Detection Reagent A immediately. Shake and mix. Incubate 1 hour at 37°C;
- Aspirate and wash 3 times;
- Add 100µL prepared Detection Reagent B. Incubate 30 minutes at 37°C;
- Aspirate and wash 5 times;
- Add 90µL Substrate Solution. Incubate 10-20 minutes at 37°C;
- Add 50µL Stop Solution. Read at 450 nm immediately.

[IMPORTANT NOTE]

- Limited by the current conditions and scientific technology, we can't completely conduct the comprehensive identification and analysis on the raw material provided by suppliers. So there might be some qualitative and technical risks to use the kit.
- The final experimental results will be closely related to validity of the products, so the kit should be used prior to the expiration date. And please store the kits exactly according to the instruction.
- Kits from different batches may be a little different in detection range, sensitivity and color developing time. Please perform the experiment exactly according to the instruction attached in kit while electronic ones from our website is only for reference.
- Do not mix or substitute reagents from one kit lot to another. Use only the reagents supplied by manufacturer.
- Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent the evaporation and contamination of microorganism. TMB Substrate should remain colorless till it is reacted with the enzyme which binds to the microplate.
- There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results. Do not remove microplate from the storage bag until needed.
- Wrong operations during the reagents preparation and loading, as well as incorrect parameter setting for the plate reader may lead to incorrect results. A microplate reader with a bandwidth of 10nm or less and an optical density range of 0-3 O.D. at 450 ± 10nm wavelength is acceptable for use in absorbance measurement. Please read the instruction carefully and adjust the instrument prior to the experiment.
- Variation in sample preparation and each step of experimental operation may cause different results. In order to get better reproducible results, the operation of each step in the assay should be controlled.
- Each kit has been strictly passed Q.C test. However, results from end users might be inconsistent with our in-house data due to some unexpected transportation conditions or different lab equipments. Intra-assay variance among kits from different batches might arise from above factors, too.
- Kits from different manufacturers with the same item might produce different results, since we haven't compared our products with other manufacturers.
- The standard of the kit and immunogen used for antibody preparation are commonly recombinant proteins, as different fragments, expression systems, purification methods might be used in recombinant protein preparation, we can not guarantee the kit could detect recombinant protein from other companies. So, it is not recommended to use the kit for the detection of recombinant protein.
- Please predict the concentration of target molecules in samples, or arrange a preliminary experiment, it is a good way to solve specific problem, e.g. the concentration of samples are beyond the detection range of the kit.
- The kit might not be suitable for detection of samples from some special experiment, for instance, knock-out experiments, due to their uncertainty of effectiveness.
- The instruction manual is also for the kit of 48T, but all reagents of 48T kit are reduced by half.

[PRECAUTION]

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

[TROUBLE SHOOTING]

Problem	Possible Source	Correction Action
Poor Standard Curve	Improper standard curve preparation	Ensure accurate operation of the dilution
	Incomplete washing and aspiration	Adequate washing and adequate aspiration
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
Poor Precision	Incomplete washing of wells	Ensure sufficient washing
	Inadequate mixing and aspiration reagents	Adequate aspiration and mixing reagents
	Reused pipette tips, containers and sealers	Change and use new pipette tips, containers and sealers
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
Low O.D Values	Inadequate reagent volumes added to wells	Calibrate pipettes and Add adequate reagent
	Incorrect incubation times	Ensure sufficient incubation times
	Incorrect incubation temperature	Reagents balanced to room temperature
	Conjugate or substrate reagent failure	Mix conjugate & substrate, color should develop immediately
	No stop solution added	Follow the assay protocol in the kit manual
	Read beyond suggested reading time	Read within the time recommended in the manual
Sample Values	Improper Sample Storage	Store the sample properly and use the fresh sample
	Improper sample collection and preparation	Take proper sample collection and preparation method
	Low quantity of analyte in samples	Use new sample and repeat assay

