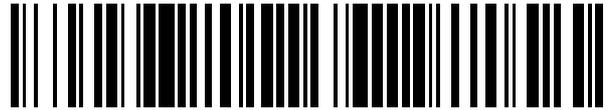


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 707**

21 Número de solicitud: 201330768

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

27.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.11.2014

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA
PAZ (50.0%)**

**Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid ES y**

LLAMAS MATÍAS, Miguel Ángel (50.0%)

72 Inventor/es:

**LLAMAS MATÍAS, Miguel Ángel y
LÓPEZ COLLAZO, Eduardo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL RIESGO DE DESARROLLAR UNA ENFERMEDAD INFECCIOSA**

57 Resumen:

Método para la determinación del riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.

La invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa que comprende la detección y/o cuantificación de un compuesto mitocondrial en una muestra biológica, así como a un método in vitro para predecir dicho riesgo. Además, también se refiere al uso de un kit para el mismo fin. Preferiblemente, el sujeto padece un infarto agudo de miocardio o va a ser sometido o ha sido sometido a una operación quirúrgica.

ES 2 523 707 A2

Método para la determinación del riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa que comprende la detección y/o cuantificación de un compuesto mitocondrial en una muestra biológica. También se refiere al uso de un kit para el mismo fin. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la biomedicina.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La sepsis humana es una enfermedad infecciosa sistémica que desencadena el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Es la única enfermedad situada
15 dentro de las 10 primeras enfermedades de mayor importancia en los países desarrollados que no ha experimentado variación en cuanto a su tasa de mortalidad total desde hace más de 30 años (Artero A. *et al*, 2010 *Journal of Critical Care* 25: 276–281).

20 Este dato se basa en dos razones, en primer lugar los grandes avances científicos de las tres últimas décadas han permitido moderar la tasa de mortalidad gracias principalmente a la mejora de las terapias antibióticas y en segundo lugar a la implantación de “guías clínicas” de actuación para su tratamiento precoz, lo que ha disminuido moderadamente la tasa de muerte. Pero, todos estos avances no han
25 impedido que el número de casos anuales haya seguido ascendiendo a razón de un 4,2 % anual hasta los 1,7 millones de pacientes sépticos en 2009 sólo en EEUU.

Con estos datos y una población actual de 314 millones de habitantes, Estados Unidos posee una prevalencia de pacientes sépticos (sepsis como diagnóstico principal y
30 secundario a otra enfermedad) en torno al 0,67%, lo que supone un gasto de más de 16 billones de dólares en aproximadamente 1,7 millones de pacientes, lo que se traduce en un gasto superior a los 9000 \$ anuales por paciente.

El paciente séptico, puede presentar diversas etiologías, desarrollar una infección
35 primaria o que ésta sea secundaria a cientos de otras posibles enfermedades. El

paciente puede provenir de la unidad coronaria, de traumatología, de urgencias o de cualquier otro servicio del hospital, puede ser una persona sin antecedentes médicos, o con problemas cardíacos, o diabético o con un historial médico sumamente complejo o por el contrario muy sencillo. Es decir, el paciente séptico es un colectivo difícil de
5 estudiar y estandarizar, pero todos comparten un problema, su sistema inmune se ha desregulado ante un ataque masivo en forma de infección.

Las terapias antibióticas han mejorado, pero los microorganismos implicados también han evolucionado y hoy en día cada vez aparecen más poblaciones multirresistentes a
10 terapias antibióticas. Entre las bacterias causantes de septicemia se encuentran bacterias Gram negativas, por ejemplo, el género *Pseudomonas* y la especie *Escherichia coli*. Además, también se asocian con el estado de septicemia, bacterias Gram positivas como por ejemplo los géneros bacterianos *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, más concretamente dentro de éste último la especie
15 *S. aureus*, tanto las cepas resistentes como las no resistentes a meticilina. La sepsis también se ha reportado que además de ser causada por bacterias (bacteriemia), puede ser causada por virus (viremia) o por hongos (fungemia) (Phillip Dellinger R. *et al.* 2013 Crit Care Med 41:580–637).

20 Se han elaborado métodos de diagnóstico de septicemia, por ejemplo Septifast®, un kit de diagnóstico por PCR que permite la identificación de 16 y 6 de las principales bacterias y hongos respectivamente causantes de la septicemia humana; Sepsitest®, capaz de identificar 54 bacterias y 5 hongos; VYOO®, capaz de identificar 33 bacterias anaerobias y 6 hongos; o Plex-ID®, capaz de identificar una amplia gama de bacterias,
25 virus, hongos y ciertos parásitos, y proporcionar información acerca de la resistencia, la virulencia y el tipo de cepa. Sin embargo, a pesar de los avances en la detección de septicemia, no se ha apreciado un descenso significativo ni de la mortalidad, ni del número de personas que anualmente sufren septicemia. Existen tratamientos para intentar paliar los efectos de la sepsis y controlarla, por ejemplo, mantener los niveles
30 de glucosa o presión arterial, disminuir el efecto coagulante, bloquear los receptores del lipopolisacárido (LPS) bacteriano o controlar los niveles de algunas de las citoquinas secretadas al torrente sanguíneo (Phillip Dellinger R. *et al.* 2013 Crit Care Med 41:580–637; Sweeney DA, *et al.* 2008 Intensive Care Med 34: 1955-1960). Sin embargo, no existen medicamentos específicos o estrategias para la sepsis y además
35 existe una infinidad de posibles agentes causantes que hacen difícil su diagnóstico

precoz.

Así, por todos los motivos expuestos, existe la necesidad de encontrar un método que permita predecir qué pacientes son candidatos a sufrir una enfermedad infecciosa y por lo tanto de esta manera también poder prevenir la septicemia. De este modo, en los pacientes que vayan a ser o acaben de ser sometidos a una operación quirúrgica se conseguiría poder adelantar un tratamiento antibiótico en los pacientes que presenten un alto riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa, mientras que se conseguiría evitar el uso indiscriminado de antibióticos en pacientes que no presenten un riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la invención es el de proporcionar un método *in vitro*, para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa para la obtención de un tratamiento personalizado y/o precoz del paciente. El método de la invención se basa en la detección de un compuesto mitocondrial en una muestra biológica aislada de un sujeto y permite predecir qué pacientes son candidatos a sufrir una enfermedad infecciosa y por lo tanto de esta manera también poder prevenir septicemia.

El método de la invención permite conocer si el paciente necesita o no un tratamiento con antibióticos para prevenir una infección. De esta manera, la presente invención es útil también para determinar la dosis de antibióticos a administrar en el caso de que éstos fueran necesarios.

El método de la invención es útil, particularmente, en pacientes que van a ser sometidos o han sido sometidos a una operación quirúrgica. En el primero de los casos, si el paciente presenta una tolerancia a infecciones, es posible posponer la operación quirúrgica o implantar una terapia antibiótica preventiva y por lo tanto, el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la tolerancia a infecciones se previene.

En la presente invención se demuestra que la detección de compuestos mitocondriales en una muestra biológica de un individuo se asocia a un estado de tolerancia a infecciones y se demuestra la utilidad del uso de compuestos mitocondriales para

determinar el riesgo de desarrollar una infección en pacientes que no han presentado una infección previa y que no han recibido un trasplante previamente. Dichos sujetos no han recibido tratamiento inmunosupresor, en adelante nos referiremos a ellos como a “los pacientes de la invención”.

5

En la presente invención se demuestra la utilidad del método en pacientes que habían sufrido un infarto agudo de miocardio (IAM) y también se demuestra la utilidad en pacientes que se iban a someter o se habían sometido a una cirugía mayor y que no presentaban infección en el momento de someterse a ella.

10

En la presente invención se demuestra que en pacientes que sufren un proceso que libera contenido mitocondrial a sangre presentan un mayor riesgo de sufrir una enfermedad infecciosa. El método de la invención permite predecir y por tanto poder prevenir una infección bacteriana después de una lesión, enfermedad o después o antes de cirugía mayor al determinarse el riesgo de desarrollar una infección.

15

El método de la invención es un método no invasivo, rápido, simple y efectivo.

20

En la presente invención se entiende por “tolerancia a infecciones”, o también “estado refractario”, al estado del sistema inmune innato en que éste ignora, o falla la detección y/o la respuesta contra una infección, donde dicha infección puede ser causada por una bacteria, un hongo, un virus o un parásito.

25

La enfermedad infecciosa a la que hace referencia la presente invención se refiere a una enfermedad infecciosa causada por una bacteria, tanto bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas; un hongo, como por ejemplo *Candida albicans*; un virus, como por ejemplo *Herpes virus* o *Haemofilus influenza*; o un parásito, como por ejemplo el causante de la malaria. En una realización preferida, la enfermedad infecciosa está causada por bacterias.

30

En la presente invención se entiende por “infección bacteriana” a la infección causada por bacterias Gram positivas o Gram negativas. En la presente invención, la infección bacteriana puede ser causada por ejemplo por bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Escherichia coli* o *Serratia*; o por bacterias Gram positivas como *Streptococcus*, *Pneumococcus*, o *Staphylococcus*, más concretamente dentro de éste

35

último la especie *S. aureus*. Las infecciones pueden ser causadas por cepas resistentes o no resistentes a meticilina. La infección puede ser causada por bacterias aerobias o anaerobias. Se incluyen infecciones provocadas por bacterias anaerobias de los géneros *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eggertella*, *Eubacterium* y *Clostridium*.

5

El término “Gram positiva” se refiere a aquellas bacterias que se tiñen de color azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, conocida por el experto en la materia. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular. La envoltura celular de las bacterias Gram positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior y que es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram. Las bacterias Gram negativas presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y esta pared celular está formada por una capa más fina de peptidoglicano que la de la pared de las bacterias Gram positivas. Por lo tanto, las “Gram negativas” son aquellas bacterias que presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y su pared celular es menos gruesa que la pared de las bacterias Gram positivas y no se tiñen de color azul oscuro o violeta por la tinción de Gram.

20 La presente invención describe cómo el estado tolerancia a infecciones se puede predecir mediante la detección de compuestos mitocondriales en la muestra de sangre de un paciente, permitiendo adaptar el tratamiento a cada paciente de acuerdo con el estado inmunológico en el que éste se encuentre.

25 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa que comprende la detección y/o cuantificación de un compuesto mitocondrial en una muestra biológica aislada de un sujeto. En adelante nos referiremos a este como al “método primero de la invención”.

30

En la presente invención se entiende como “predecir el riesgo” a determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa antes de que ésta se haya producido.

Se entiende por “compuesto mitocondrial” a una porción o estructura que forma parte del orgánulo intracelular conocido por un experto en la materia como mitocondria, por ejemplo,

35

ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico, ADN, y ácido ribonucleico, ARN), proteínas, membranas, glúcidos, lípidos y combinaciones de ellos. El compuesto mitocondrial se encuentra en la muestra biológica tras rotura celular de cualquier célula del sujeto. El compuesto mitocondrial puede ser detectado y/o cuantificado por técnicas de biología molecular conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo *Western blot*, *Southern blot*, *Northern blot*, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), PCR, cromatografía, inmunoensayo (por ejemplo ELISA), ensayo enzimático y espectroscopia.

10 El término "muestra biológica" incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica comprende ADN mitocondrial, ARN mitocondrial y/o proteína mitocondrial.

15 El término "sujeto" se refiere a un individuo, preferiblemente humano, que no sufre una infección y que no ha recibido tratamiento inmunosupresor ni ha recibido un trasplante. Por este motivo, una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde el sujeto es un humano.

20 Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde la enfermedad infecciosa es sepsis.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde el sujeto ha sufrido o sufre un infarto agudo de miocardio (IAM).

25

En la presente invención se entiende por "infarto agudo de miocardio" (IAM) a la patología resultante de un riego sanguíneo insuficiente, con daño tisular, en una parte del corazón, producido generalmente por una obstrucción en una de las arterias coronarias, frecuentemente por ruptura de una placa de ateroma. Los IAM se subclasifican como STEMI o NSTEMI en dependencia de si presenta elevación del segmento ST o no, respectivamente. El segmento ST es una región de la curva representada en un electrocardiograma reconocido como tal por un experto en la materia. La clasificación de con o sin elevación de ST, se refiere a una característica que aparece en los electrocardiogramas, y que es conocida por el experto en la materia; si el segmento ST se eleva, es un STEMI, si no se eleva, es un NSTEMI.

35

Estas características clínicas llamadas STEMI y NSTEMI, definen la presencia o no de necrosis en el tejido cardiaco, respectivamente.

Una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un
5 método donde el sujeto va a ser sometido o ha sido sometido a una operación quirúrgica, preferiblemente a una cirugía mayor.

En la presente invención se entiende como “operación quirúrgica” a la práctica de la
10 cirugía que implica manipulación mecánica de las estructuras anatómicas con un fin médico, bien sea diagnóstico, terapéutico o pronóstico. Como “cirugía mayor” se entiende por ejemplo, pero sin limitarse, cirugía del aparato digestivo, del sistema endocrino, del sistema nervioso, del aparato circulatorio o cirugía de reparación de accidentes traumáticos.

15 Otra realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde el compuesto mitocondrial se selecciona de una lista que consiste en ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt), ácido ribonucleico mitocondrial (ARNmt) y proteína mitocondrial. Más preferiblemente el compuesto mitocondrial es ADN mitocondrial. En una realización más preferida, el ADN mitocondrial es el gen
20 12S rRNA.

El gen 12S rRNA (*Gene ID*: 6183, “mitochondrial ribosomal protein S12”, *MRPS12*, de *Homo sapiens*), (*SEQ ID NO*: 1) posee una baja frecuencia de mutaciones, no posee isoformas, y es una región rica en islas CpGs.

25

Por lo aquí descrito, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde el compuesto mitocondrial es una región rica en islas CpGs.

Las “islas CpGs” en la presente invención se definen como regiones de ADN donde
30 existe una concentración de proporción de dinucleótidos CG (citosina-guanina) mayor del 40%.

Otra realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un
35 método donde la muestra biológica es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o sangre.

35

En el método del primer aspecto de la invención la detección y/o determinación de la concentración (cuantificación) del compuesto mitocondrial es llevada a cabo mediante una de las técnicas seleccionada de la lista que consiste en *Western blot*, PCR, cromatografía, inmunoensayo, ensayo enzimático y espectroscopia. En una realización preferida, la técnica utilizada para la determinación de la concentración del compuesto mitocondrial es PCR. Preferiblemente, la PCR utilizada es PCR cuantitativa.

Una realización aún más preferida se refiere al método del primer aspecto de la invención donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de los cebadores cuya secuencia comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 (cebador sentido, de secuencia 5'-ccacgggaaacagcagtgatt-3') y SEQ ID NO: 3 (cebador antisentido, de secuencia 5'-ctattgactgggtaaatcgtgtga-3') y la sonda comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 (secuencia 5'-tgccagccaccgcg-3'). Es decir, la pareja de cebadores utilizada es la pareja de dos cebadores que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. Una realización aún más preferida se refiere al método donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de los cebadores cuya secuencia consiste en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y la sonda consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4. Es decir, la pareja de cebadores utilizada es la pareja de cebadores de secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. La sonda puede estar marcada con fluoróforos por ejemplo, con isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, bromuro de etidio o "SYBR® Green".

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa que comprende detectar y/o cuantificar un compuesto mitocondrial en una muestra biológica de un sujeto.

25

En adelante nos referiremos a éste como al "método segundo de la invención".

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde además se compara el valor de concentración del compuesto mitocondrial obtenido con el valor de concentración del mismo compuesto mitocondrial perteneciente a al menos una muestra control para encontrar una diferencia significativa.

30

Otra realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método que además comprende asociar la diferencia significativa con el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.

5 El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

El término “muestras control” o “muestra de referencia” o “muestra de un voluntario sano”, tal como se entiende en la presente invención se refiere, por ejemplo, pero sin
10 limitarse, a las muestras obtenidas de individuos que no presentan predisposición a desarrollar infecciones, que no hayan sufrido infecciones en un período de 1 a 20 días anterior a la extracción de la muestra, que no presentan enfermedades inmunosupresoras (por ejemplo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA; o lupus) que no están sometidos a tratamientos inmunosupresores (por ejemplo
15 pacientes trasplantados o que vayan a ser sometidos a un trasplante) y que no hayan presentado infartos de miocardio. Los datos obtenidos en la detección y/o cuantificación del compuesto mitocondrial, por ejemplo ADNmt, de la muestra control pueden ser obtenidos en el mismo momento, es decir, simultáneamente a la obtención de los datos del compuesto mitocondrial, por ejemplo ADNmt, del individuo objeto de
20 análisis, o puede ser un valor de referencia establecido con anterioridad.

En el método segundo de la invención se considera una diferencia significativa cuando el valor de la muestra en estudio supera en al menos 2 veces la media más/menos la desviación estándar de una muestra control o de un voluntario sano.

25 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la muestra de referencia y las muestras del sujeto en estudio han sido previamente normalizadas antes de la comparación.

30 Se entiende por “normalización” la eliminación de variaciones experimentales entre las distintas muestras.

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la enfermedad infecciosa es sepsis.

35

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el sujeto ha sufrido un infarto agudo de miocardio.

5 En el caso del método donde el sujeto ha sufrido un infarto agudo de miocardio, la muestra control puede ser la muestra de un individuo que no haya sufrido dicha enfermedad.

10 Una realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde al sujeto va a ser o ha sido sometido a una operación quirúrgica, preferiblemente a una cirugía mayor.

Otra realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el compuesto mitocondrial se selecciona de una lista que consiste en ADN mitocondrial, ARN mitocondrial y proteína mitocondrial. Más preferiblemente el
15 compuesto mitocondrial es ADN mitocondrial. En una realización aún más preferida, el ADN mitocondrial es el gen 12S rRNA. Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde el compuesto mitocondrial es una región rica en islas CpGs.

20 Para la detección y/o cuantificación del compuesto mitocondrial del método primero y segundo de la invención, la muestra biológica aislada puede tratarse física o mecánicamente para romper el tejido o las estructuras celulares y liberar los componentes intracelulares a una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos o proteínas para un posterior análisis. Los ácidos nucleicos o proteínas se
25 extraen de la muestra por procedimientos conocidos por el experto en la materia o comercialmente disponibles.

Otra realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la muestra biológica es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o sangre.

30

La concentración del compuesto mitocondrial se puede medir en copias de ADNmt/ μ l de plasma.

35 En el método del segundo aspecto de la invención la detección y/o determinación de la concentración (cuantificación) del compuesto mitocondrial es llevada a cabo mediante

una de las técnicas seleccionada de la lista que consiste en *Western blot*, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), PCR, cromatografía, inmunoensayo, ensayo enzimático y espectroscopia. En una realización preferida, la técnica utilizada para la determinación de la concentración del compuesto mitocondrial es PCR. Preferiblemente, la PCR utilizada es PCR cuantitativa.

Por otra parte, la detección y cuantificación también se pueden realizar mediante RT-PCR (“Real Time-PCR”), por lo que otra realización preferida del primer y segundo aspectos de la invención se refiere a un método donde la detección y/o cuantificación del ADN mitocondrial (ADNmt) se realiza mediante RT-PCR. El proceso de RT-PCR implica: la amplificación del ADN mitocondrial extraído de la muestra de plasma. Para cada muestra y para cada transcrito de los genes analizados se llevará a cabo la reacción de PCR de manera individualizada. Este proceso implica la repetición cíclica de 3 fases: fase de desnaturalización del ADN, fase de unión específica del oligonucleótido del gen en estudio a la hebra del ADN desnaturalizado y fase de elongación a partir del oligonucleótido unido mediante la que se sintetizará una hebra nueva de ADN. Al tratarse de un proceso que se mide en tiempo real, es necesario usar una molécula fluorescente para monitorizar lo que sucede a lo largo del proceso.

La cuantificación por otro lado también se puede realizar determinando el nivel de proteína mitocondrial. Esta cuantificación proteica se puede realizar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin, como por ejemplo, pero sin limitarnos, métodos de inmunodetección (como *Western Blot*, ELISA, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia), métodos basados en marcajes isobáricos (como *iTRAQ–isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation-*, o *ICAT -Isotope-Coded Affinity Tag-*) o en marcajes isotópicos (como *SILAC –Stable Isotopes Labeling by Amino Acids in Cell Culture-*) o basados en marcajes fluorescentes (como *2D-DIGE -Difference in Gel Electrophoresis-*), así como métodos basados en espectrometría de masas (*MRM, -Multiple Reaction Monitoring-*). También se puede realizar mediante sondas fijadas en un soporte.

Una realización aún más preferida se refiere al método del segundo aspecto de la invención donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y de una sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4. Es decir, la pareja de cebadores utilizada es la

pareja de dos cebadores que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, los cebadores son la pareja de cebadores de secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y la sonda es la sonda de secuencia SEQ ID NO: 4. La sonda puede estar marcada con fluoróforos, como por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, bromuro de etidio o "SYBR Green".

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos para realizar el método primero o segundo de la invención.

Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende cebadores y sondas. Otra realización aún más preferida se refiere al uso de kit que comprende cebadores y sonda, donde los cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y la sonda comprende la secuencia SEQ ID NO: 4, para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa. Una realización aún más preferida se refiere al uso de kit que comprende cebadores y sonda, donde los cebadores son la pareja de cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y la sonda comprende la secuencia SEQ ID NO: 4, más preferiblemente los cebadores son las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y la sonda de la secuencia SEQ ID NO: 4, para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.

Una realización más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a uso del kit donde la enfermedad infecciosa es sepsis.

El kit al que se refiere el tercer aspecto de la invención puede comprender al menos una ADN polimerasa o un fluoróforo. Además el kit puede comprender una mezcla de deoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs), una mezcla de nucleótidos tri-fosfato (NTPs), deoxirribonucleasa (DNasa), dithiothreitol (DTT), pirofosfatasa inorgánica (PPi) y los tampones necesarios para las enzimas proporcionadas en el kit.

Además, en el kit utilizado en el tercer aspecto de la invención las sondas, los cebadores o los anticuerpos pueden estar situados en un soporte sólido, por ejemplo, pero sin limitarse: cristal, plástico, tubos, placas, portas multipocillo, membranas, o cualquier otro soporte conocido por el experto en la materia.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende los elementos necesarios para detectar y/o cuantificar la presencia de un ADN mitocondrial rico en islas CpGs. El uso de dicho kit podría utilizarse para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa, preferiblemente sepsis. Este kit puede comprender
 5 cebadores y/o sondas para la detección de un ADN mitocondrial rico en islas CpGs en una muestra biológica de un sujeto. Además, el kit también puede comprender alguno de los elementos del kit mencionado en el tercer aspecto de la invención y también alguno de sus elementos pueden estar situados en un soporte sólido.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
 15 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig.1. Representa la transformación/polarización hacia un fenotipo tolerante (también conocido como M2) de los macrófagos/monocitos circulantes en pacientes con Infarto
 20 Agudo de Miocardio (IAM). Los macrófagos/monocitos aislados de pacientes-IAM fueron tratados (B, D y F) o no (A, C y E) con LPS (3h, 10 ng/ml). Posteriormente, el mRNA (ARN mensajero o ARNm) total se aisló y el ADNc (ADN complementario) se sintetizó. Con esto se realizó la cuantificación de TNF α (A, B), IL6 (C, D) e IL10 (E, F). Se representan los valores correspondientes a: voluntarios sanos (VS), n=20;
 25 pacientes con: NSTEMI n=24, STEMI n= 21. *p<0.05, **p<0.01 pacientes vs VS (ANOVA/Dunn).

Fig. 2. Representa los niveles de ADN mitocondrial en suero de voluntarios sanos (VS) y pacientes con IAM. Se representan los valores correspondientes a: VS, n=20; pacientes con: NSTEMI n= 24, STEMI n= 21. *p<0.05, **p<0.01 pacientes vs
 30 (ANOVA/Dunn).

Fig. 3. Muestra cómo la exposición a ADN mitocondrial transforma los monocitos a un fenotipo M2 (tolerante/refractario). (A) Diseño experimental: Monocitos aislados de VS se expusieron a ADN mitocondrial (ADNmt), LPS (10ng/ml) o se dejaron sin

tratamiento (“0”, 1^{er} estímulo) durante 5 días, luego se volvieron a estimular con LPS (“5 días”, 2^{do} estímulo). (B-D). En el momento del ensayo o “assay” (a las 24 horas tras estímulo con LPS) se midieron los niveles de las citoquinas TNF, IL6 e IL10 en los sobrenadantes de cultivos de células de paciente vs. VS (medidos por CBA o
 5 “Cytometric bead arrays”, técnica de citometría de flujo donde unas perlas microscópicas unidas a un anticuerpo se unen específicamente a la citoquina deseada). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Fig. 4. Representa la modulación de macrófagos/monocitos humanos debido a la exposición a DAMPs (*Damage Antigen Molecular Pattern*) mitocondriales, entendidos
 10 como lisado mitocondrial (mtLys). Macrófagos/monocitos aislados de VS se expusieron a ADN mitocondrial (ADNmt), LPS (10ng/ml) o se dejaron sin tratamiento durante 5 días, luego se volvieron a estimular con LPS, siguiendo el esquema experimental representado en la figura 3A. (A-C) Niveles de las citoquinas TNF, IL6 e IL10 en el sobrenadante de cultivos (medidos por CBA). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
 15 vs control (VS).

Fig. 5. Representa la modulación de la activación de NF-kappa-B por parte de los DAMPs mitocondriales y el ADN mitocondrial. Monocitos aislados de VS se expusieron a ADN mitocondrial (ADNmt), DAMPs mitocondriales (mtLys), LPS o se dejaron sin tratar durante 5 días, después se estimularon con LPS durante 24 horas como se ha
 20 explicado en la figura 3 (“control”, monocitos sin tratar; “LPS”, monocitos tratados sólo a los 5 días con LPS; “mtADN/LPS”, monocitos tratados en un primer estímulo con ADNmt y en un segundo estímulo con LPS; “mtLys/LPS”, monocitos tratados en un primer estímulo con mtLys y en un segundo estímulo con LPS; “LPS/LPS”, monocitos tratados en un primer estímulo con LPS y en un segundo estímulo con LPS). Se
 25 representa la cuantificación de la translocación de NF-kappa-B (p65) al núcleo realizada por microscopía confocal *p<0.05, **p<0.01 vs control (VS).

Fig. 6. Representa el índice *score* (M1/M2) de los pacientes IAM (M1 es un fenotipo clásico, mientras que M2 es un fenotipo tolerante/refractario). Los pacientes se clasificaron de acuerdo con el índice M1/M2 en la condición basal (A), tras
 30 estimulación con LPS (3h, 10ng/ml). (C-D) representan el número de copias de ADNmt encontradas por mililitro de sangre y su correspondencia con el *score* M1/M2, de los macrófagos/monocitos.

Fig. 7. Representa el tanto por ciento (%) de pacientes, clasificados según el score de la figura 6, que se infectaron.

EJEMPLOS

- 5 Ejemplo 1: determinación del riesgo de desarrollo de una infección en pacientes que habían sufrido un Infarto Agudo de Miocardio (IAM).

El estudio incluyó a 45 pacientes consecutivos con IAM que ingresaron en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario La Paz y se les sometió a una angiografía coronaria. De los cuarenta y cinco pacientes 21 pacientes (46,7%) presentaban elevación del segmento ST en el ECG (electrocardiograma) y 24 pacientes (53,3%) sin elevación del mismo. Veinte voluntarios sanos (VS) con sexo y edades similares sin antecedentes de cualquier enfermedad coronaria o factores de riesgo cardiovascular se incluyeron como controles. Se realizó un estudio de seguimiento de todos los
10 pacientes con IAM que participaron en este estudio. De los 45 pacientes, 7 fueron readmitidos en el hospital con una infección a lo largo de los siguientes tres meses después de la primera inscripción.
15

A lo largo de los tres meses después del alta, seis pacientes con IAM agudo experimentaron infección del tracto urinario (4 pacientes con STEMI, 2 pacientes con NSTEMI) y un paciente en el grupo de STEMI tenía neumonía adquirida en la comunidad (es decir, una neumonía no nosocomial).
20

Sorprendentemente los pacientes que tenían aumentados los compuestos mitocondriales en sangre, presentaron mayor riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.
25

El presente estudio excluyó a los pacientes con infección aguda, enfermedades inflamatorias crónicas, inmunodepresión, enfermedades infecciosas activas y/o crónicas, historia de insuficiencia renal, enfermedades hepáticas o enfermedades malignas, en los últimos 3 meses o en tratamiento con medicamentos supresores inmunes.
30

Además, sorprendentemente, se ha encontrado que los macrófagos y los monocitos circulantes de dichos pacientes presentan un estado refractario de activación (o tolerancia a infecciones) similar al descrito en la denominada “tolerancia a endotoxinas” (ET).

5

Por lo tanto, se utilizó un modelo previamente establecido humano de tolerancia a la endotoxina (Biswas SK y López-Collazo E. 2009 Cell 30(10):475-487) para comprender el porqué de dicha activación de los macrófagos y monocitos.

10 Se ha establecido que los monocitos/macrófagos pueden exhibir diferentes estados de activación. Ellos pueden polarizarse, dependiendo de las señales micro-ambientales, en dos grupos principales: los macrófagos activados clásicamente (M1), cuyo estímulo activador es típicamente IFN- γ , y los macrófagos activados alternativamente (M2), activados por la exposición a IL4, IL13 o IL10. Las células M1 muestran potentes
15 propiedades antimicrobianas, promueven la respuesta Th1 y producen principalmente citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , IL-1 β e IL6. En contraste, las células M2 se identifican en parte por la expresión del receptor *Scavenger* (o carroñero) CD163, producen citoquinas y moléculas anti-inflamatorias, tales como IL10, CCL18 y TGF- β , y citoquinas, quimioquinas y factores solubles de apoyo asociadas a Th2 funciones de
20 efectores (Biswas SK y López-Collazo E. 2009 Cell 30(10):475-487).

Esta activación M2 se encontró en la invención que sorprendentemente coincide con el fenómeno llamado “estado refractario” o “tolerancia a infecciones”.

25 Para el estudio de la función de los macrófagos/monocitos se utilizaron muestras de sangre de sesenta mililitros que se extrajeron de una vena periférica a todos los pacientes con IAM, después de las primeras 30 horas (media 36 ± 6) de ingreso en el hospital para evitar la respuesta aguda proinflamatoria inicial de la lesión isquémica.

30 El ADN mitocondrial de muestras de plasma de los pacientes se extrajo por duplicado según *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó la sonda “ADNmt 12S ribosomal RNA sonda TaqMan” (*Applied Biosystems*) (SEQ ID NO: 4) y se utilizaron cebadores (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3) de la misma casa comercial. La media del número de copias de ADNmt obtenida en

las dos extracciones de la misma muestra de suero se calculó y los resultados se expresaron como el nº de copias de ADNmt/ μ l de suero (Figura 2).

El equilibrio M1/M2 se calculó utilizando los niveles de expresión de mRNA de TNF α e IL-10 de Macrófagos de pacientes con IAM en condición basal y después de 3 h de estimulación con lipopolisacárido (LPS) en cultivo (3 horas, 10ng/ml) (Figuras 1A-F). En condiciones basales, se consideró en M1 si los niveles de TNF α fueron superiores a la media \pm SD (desviación estándar o “DE”) de los voluntarios sanos (VS) y los niveles de IL10 valor inferiores a la media-SD del valor VS. Por el contrario, un estado M2 se asignó a los pacientes que tenían niveles de TNF inferior a la media-SD de la alta tensión y los niveles de IL10 superior a la media + SD de la VS. Aquellos pacientes que tenían los niveles de mRNA de ambas citoquinas en el intervalo de la media \pm SD de la VS se consideraron M0. Debido al hecho de que la polarización de macrófagos es un continuo, se consideran dos estados intermedios, M1/M0 (con alta TNF α e IL10 como en un VS) y M0/M2 (con TNF α como en un VS y alta IL10).

Después de la exposición LPS, ninguna muestra poseía sus macrófagos en estado M0, como si ocurría en los VS. Como cualquier persona sana que sufriera un infarto tendría una clásica respuesta proinflamatoria M1, consideramos M1 todos los pacientes que tenían los niveles de mRNA de ambas citoquinas en el intervalo de la media \pm SD de la VS después de la estimulación con LPS. Todos los pacientes con mayor TNF α que la media + SD e IL10 inferior a la media-SD fueron clasificados como M1 “high”, debido a esa elevada cantidad de TNF α , para diferenciarlos de aquellos con pequeños aumentos que pudieran ser fruto del azar. M2 y M2/M0 se calcularon como se describe para la condición basal.

Análisis estadístico: el número de experimentos analizados se indican en cada figura. Los datos fueron obtenidos a partir de un mínimo de tres experimentos y se expresan como media \pm SD. La significación estadística se calculó usando el análisis ANOVA de una vía o el test t no apareado en su caso. Se realizaron correlaciones de Spear-Man con correlación de rango para los datos de distribución no normal. Las diferencias se consideraron significativas con valores de p <0,05 utilizando *software Prism 5.0* (GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.).

Las características clínicas, de laboratorio y angiográficas de los pacientes en estudio también se analizaron. La angiografía coronaria cuantitativa reveló que 10 pacientes tenían lesiones en una arteria, 19 tenían lesiones en dos arterias, y 16 tenían lesiones en tres arterias. No se observaron diferencias significativas en cuanto al grado de estenosis coronaria aterosclerótica grave entre los pacientes con STEMI y NSTEMI. Los valores medios de PCR de IL-6 fueron significativamente mayores en los pacientes con IAM que en los VS.

La respuesta anti-inflamatoria de macrófagos/monocitos circulantes se correlacionó con la gravedad de los pacientes con IAM. Para estudiar las respuestas inmune innata en pacientes con IAM, en primer lugar se cuantificaron los niveles basales de mRNA de factores proinflamatorios (IL6 y TNF α), así como genes anti-inflamatorios (IL10) expresado por los monocitos circulantes en pacientes y VS (Figura 1). Nuestros datos indican que los pacientes con lesiones más graves y estenosis (STEMI y NSTEMI) mostraron niveles más bajos de las citoquinas pro-inflamatorias propias de M1 activadoras de macrófagos (Figura 1A-D). Por el contrario, los factores M2 anti-inflamatorios, IL10 eran mayores en el macrófagos de pacientes STEMI en comparación con VS (Figura 1E-F). Estos hallazgos sugieren que los macrófagos de pacientes STEMI tenían un fenotipo M2. Este hecho fue verificado cuando las células se estimularon *ex vivo* con LPS (Figura 3A). Después de 3 h de estimulación con LPS, los macrófagos de pacientes STEMI y NSTEMI no fueron capaces de aumentar su expresión basal de IL-6 o TNF α , como VS si hicieron (Figura 3B-C). Sin embargo, sólo las células de pacientes con STEMI mostraron un incremento de los niveles de mRNA IL10 (Figura 2D). Estos datos señalan que circulan macrófagos de los pacientes con IAM (STEMI y NSTEMI) que presentan un fenotipo anti-inflamatorio que casi coincide con la anterior activación descrita en M2. Conviene tener en cuenta, que el perfil inflamatorio de estos pacientes se analizó después de las primeras 30 horas de la hospitalización, tiempo medio de 30 ± 6 h.

Una vez establecido que los macrófagos circulantes de pacientes con IAM presentaban un estado refractario, similar al estado de tolerancia a endotoxinas más evidente en los pacientes con STEMI (este protocolo conlleva más de 1 semana de tiempo para conocer los resultados), se procedió a cuantificar los niveles de plasma de ADNmt en nuestro conjunto de pacientes con IAM. Mientras que los niveles de ADNmt en el plasma de pacientes NSTEMI fueron ligeramente superiores a VS, en pacientes

STEMI fue marcadamente elevada (~ 3,5 veces) en comparación con VS (Figura 2). Para comprobar si existía una asociación entre los niveles plasmáticos de ADN mitocondrial y el fenotipo M2 demostrado en pacientes con STEMI, se analizó la correlación entre la expresión de citoquinas y ADNmt plasma. Se encontró que existe una correlación significativa entre el ADN mitocondrial y los niveles de TNF después de la exposición LPS (negativo, Figura 2A) y la IL10 en niveles basales (positivo, Figura 2C). Estos datos confirman que hay un marcado aumento de la circulación de ADNmt en los pacientes con estenosis de la arteria coronaria severa y este hecho se correlaciona con un fenotipo M2 de sus macrófagos. La exposición de manera prolongada de macrófagos a ADN mitocondrial induce un fenotipo M2 y el riesgo de infección secundaria debido a que el paciente está en un estado refractario.

Por lo tanto, los niveles de plasma de ADN mitocondrial son más altos en los pacientes con estenosis de la arteria coronaria y aumento de múltiples lesiones coronarias o pacientes STEMI frente a los que no presentan lesiones tisulares o NSTEMI (Figura 2).

Para confirmar estos resultados, monocitos/macrófagos sanguíneos periféricos humanos de VS se incubaron durante 5 días, con 5µg/ml de ADNmt aislado de la línea celular HeLa humana. A continuación, la producción de citoquinas se midió en sobrenadantes de cultivo. El ADNmt indujo una respuesta inflamatoria leve, con aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias.

Para probar si esta respuesta suave podría inducir una polarización M2 en el macrófago, después de un tiempo de pre-incubación con ADNmt, las células de sangre periférica y en concreto los macrófagos de VS se estimularon con LPS de 10ng/ml (diseño experimental en la figura 3A). Este diseño está destinado a reproducir las condiciones clínicas, donde los monocitos/macrófagos circulantes están en contacto con el ADNmt durante un período de tiempo más largo que 30 horas. Mientras que las células no tratadas produjeron altas cantidades de las citoquinas proinflamatorias después de la estimulación con LPS, la pre-incubación con ADNmt condujo a una reducción significativa en la producción de esta respuesta (Figura 4A-B). Esta alteración de la producción de citoquinas también se encontró en los macrófagos pre-estimulados con LPS en lugar de ADNmt, que hemos utilizado como control positivo de fenotipo M2. En contraste, la proteína de tipo M2 anti-inflamatoria IL10 se incrementó al pretratar células con ADNmt, así como con pre-tratamiento de

LPS (Figura 4C). Estos resultados muestran que, a pesar de que el ADNmt inicialmente desencadena vías de las citoquinas inflamatorias, a continuación, conduce a una respuesta anti-inflamatoria.

5 Aunque hemos probado la pureza de los extractos de ADN mitocondrial y la contaminación por ADN nuclear fue menos de 0,1% (medido mediante PCR cuantitativa), nosotros incluimos el ADN nuclear (nuDNA) como control de estimulación, de cualquier contaminación de ADN genómico residual presente en los extractos de ADN mitocondrial no observándose ninguna estimulación. Por lo tanto, los
10 resultados obtenidos con los extractos de ADNmt, pueden ser atribuidos a la acción únicamente de ADNmt en el macrófago.

En conjunto, nuestros resultados revelan que la tolerancia ADNmt se asemeja a la tolerancia mediada por endotoxina. Estos resultados reflejan la situación observada en
15 los pacientes con IAM (en concreto 4 pacientes con STEMI, 2 pacientes con NSTEMI), que tenían altos niveles circulantes de ADN mitocondrial (Figura 2) y exhibieron tolerancia a infecciones.

En condiciones basales, los macrófagos de todos los pacientes con infección posterior
20 se clasificaron como respuesta M2, o M2 intermedia (Figura 6A). Después de la estimulación con LPS, los macrófagos de todos los pacientes mostraron una respuesta intermedia M2 (Figura 6BV). De acuerdo con estos resultados, los niveles de ADNmt fueron mayores en los pacientes con un fenotipo M2 como muestran las figuras 6C-D.

25 También se midieron los niveles de proteínas inflamatorias en el plasma recogido en el primer registro, ya sea a partir de pacientes con infección posterior o de VS (datos no mostrados). Después de la agrupación jerárquica, todos los pacientes con una infección posterior, excepto uno, fueron agrupados juntos y tenían menores niveles de factores inflamatorios en plasma que los VS, reflejando el cambio de una respuesta
30 anti-inflamatoria.

Por lo tanto, nos encontramos con una alta tasa de infección posterior en pacientes con IAM y monocitos/macrófagos circulantes en estadio M2.

En conjunto, estos resultados confirman que los pacientes después de una lesión isquémica se desplazan hacia una respuesta anti-inmune de tolerancia a infecciones o estado refractario, y por lo tanto son más propensos a infecciones posteriores.

- 5 Ejemplo 2: Determinación del riesgo de sufrir infección en pacientes que fueron sometidos a cirugía mayor

En las mismas condiciones que en el ejemplo 1, estudiamos un grupo de 75 pacientes. Los pacientes iban a ser sometidos a una cirugía mayor. Estos pacientes no
10 presentaban inmunodepresión, infecciones, afectaciones coronarias, ni infecciones virales, ni habían recibido ningún trasplante, ni sufrido ninguna enfermedad previa digna de mención. Se sometieron a cirugía mayor por indicación médica, como por ejemplo apendicitis, reparaciones cardiovasculares, reparaciones intestinales, etc.

- 15 Se extrajeron muestras de sangre de los pacientes 5 ± 2 horas antes de la operación y 30 ± 6 horas después de la operación.

Por un lado, se purificaron monocitos/macrófagos circulantes de una muestra de sangre periférica. Los cultivos y estimulaciones inmunológicas *in vitro* fueron
20 realizados, de manera que los resultados se obtuvieron no antes de 8 días desde la extracción de la muestra para la determinación del estado inmune del paciente.

Por otro lado, se cuantificó el ADN mitocondrial presente en el plasma sanguíneo del paciente, mediante el protocolo descrito anteriormente, la muestra se obtuvo a la vez
25 que la sangre periférica para los cultivos celulares. Los resultados en la determinación de ADN mitocondrial se obtuvieron en unas pocas horas (3 a 5 horas).

Además se obtuvieron los resultados de 20 voluntarios sanos que fueron utilizados como controles. Las muestras se analizaron como previamente se describió en el
30 ejemplo 1 para determinar la tolerancia a infecciones. Dichos pacientes fueron monitorizados durante los tres meses posteriores a su operación.

Se observó una correlación entre el ADN mitocondrial presente en el plasma de pacientes y el estado refractario, el grupo de pacientes que mostraron cantidades de
35 ADN mitocondrial en sangre superiores a $4\cdot 10^4$ copias de ADNmt/ μ l previo a la

- operación, desarrollaron infecciones post-operatorias (tanto de bacterias Gram Positivas como Gram Negativas e incluso un caso de infección fúngica) en el 72% de los casos (13/18). Estos resultados fueron correlacionados con los resultados de tolerancia a infecciones obtenidos días después por los cultivos de células del sistema
- 5 inune *in vitro*. Las infecciones detectadas correspondieron tanto a bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, como Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*. Igualmente con la muestra post-operatoria obtenida, se puede predecir si el paciente durante su evolución post-operatoria es sensible a desarrollar una infección. Si el paciente después de la intervención quirúrgica queda en un estado refractario se
- 10 debería aplicar cuidados especiales y terapias antibióticas para evitar la sepsis post-operatoria. En este caso se detectaron 28 pacientes con altos niveles de ADN mitocondrial circulantes tras la operación, de estos más de un 60% (17 pacientes) desarrollaron una infección post-operatoria.
- 15 Por lo tanto, la presente invención demuestra la relación entre el estado inmunológico refractario de un paciente antes y después de la operación y el riesgo de contraer una enfermedad infecciosa tras la operación.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa que comprende la detección y/o cuantificación de un compuesto mitocondrial en una muestra biológica aislada de un sujeto.
5
2. Método según la reivindicación 1 donde la enfermedad infecciosa es sepsis.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el sujeto ha sufrido un infarto agudo de miocardio.
10
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el sujeto va a ser sometido o ha sido sometido a una operación quirúrgica.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el sujeto es un humano.
15
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el compuesto mitocondrial se selecciona de una lista que consiste en ADN mitocondrial, ARN mitocondrial y proteína mitocondrial.
20
7. Método según la reivindicación 6 donde el compuesto mitocondrial es ADN mitocondrial.
8. Método según la reivindicación 7 donde el ADN mitocondrial es el gen 12S rRNA.
25
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la muestra biológica es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o sangre.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la detección y/o cuantificación del compuesto mitocondrial es llevada a cabo mediante una de las técnicas seleccionada de la lista que consiste en *Western blot*, PCR, cromatografía, inmunoensayo, ensayo enzimático y espectroscopia.
30
11. Método según la reivindicación 10 donde la técnica utilizada es PCR.
35

12. Método según la reivindicación 11 donde la PCR utilizada es PCR cuantitativa.
13. Método según la reivindicación 12 donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3
5 y de una sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.
14. Método según la reivindicación 13 donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de cebadores que consisten en las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3
10 y de una sonda que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4.
15. Método *in vitro* para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa que comprende detectar y/o cuantificar un compuesto mitocondrial en una muestra biológica de un sujeto.
- 15 16. Método según la reivindicación 15 donde además se compara el valor de concentración del compuesto mitocondrial obtenido con el valor de concentración del mismo compuesto mitocondrial perteneciente a un control para encontrar una diferencia significativa.
- 20 17. Método según la reivindicación 16 que además comprende asociar la diferencia significativa con el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 donde la enfermedad infecciosa es sepsis.
25
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 donde el sujeto ha sufrido un infarto agudo de miocardio.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 donde el sujeto va a ser
30 sometido o ha sido sometido a una operación quirúrgica.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 donde el sujeto es un humano.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21 donde el compuesto mitocondrial se selecciona de una lista que consiste en ADN mitocondrial, ARN mitocondrial y proteína mitocondrial.
- 5 23. Método según la reivindicación 22 donde el compuesto mitocondrial es ADN mitocondrial.
24. Método según la reivindicación 23 donde el ADN mitocondrial es el gen 12S rRNA.
- 10 25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 donde la muestra biológica es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o sangre.
26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25 donde la detección y/o cuantificación del compuesto mitocondrial es llevada a cabo mediante una de las técnicas seleccionada de la lista que consiste en *Western blot*, PCR, 15 cromatografía, inmunoensayo, ensayo enzimático y espectroscopia.
27. Método según la reivindicación 26 donde la técnica utilizada es PCR.
- 20 28. Método según la reivindicación 27 donde la PCR utilizada es PCR cuantitativa.
29. Método según la reivindicación 28 donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de los cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y de una sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 25 30. Método según la reivindicación 29 donde la PCR cuantitativa se realiza mediante el uso de los cebadores que consisten en las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y de una sonda que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 30 31. Uso de un kit que comprende cebadores que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y una sonda que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.
- 35 32. Uso según la reivindicación 31 donde el kit comprende cebadores que consisten en la secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y una sonda que consiste en la

secuencia SEQ ID NO: 4 para predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa.

33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 o 32 donde la enfermedad
5 infecciosa es sepsis.

Fig. 1 A

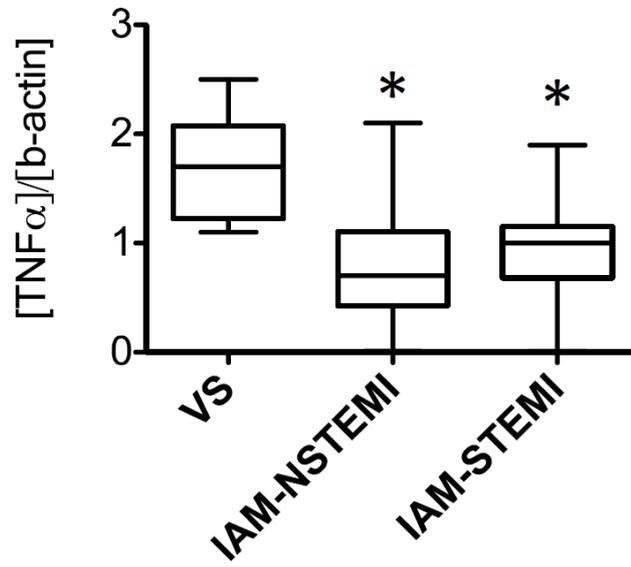


Fig. 1 B

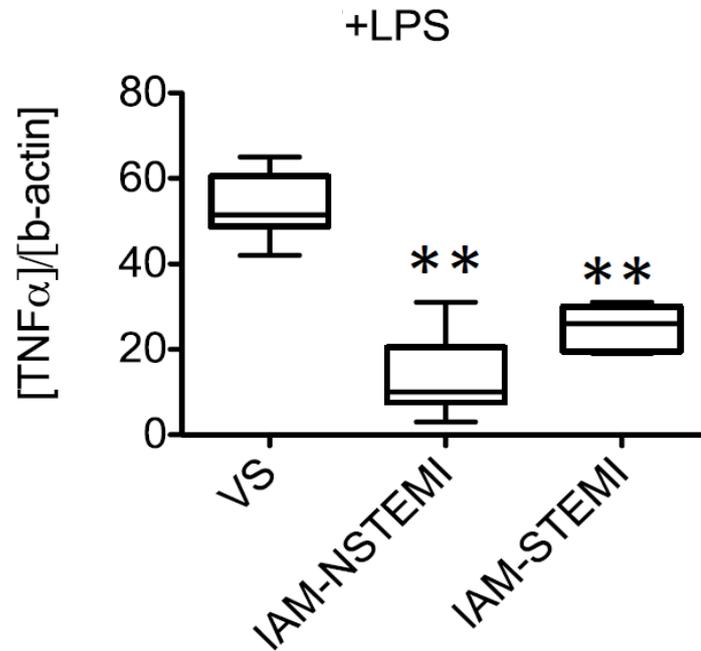


Fig. 1 C

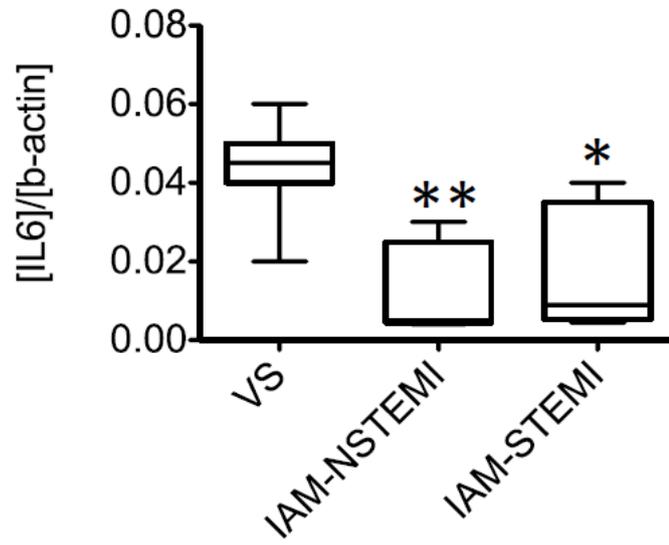


Fig. 1 D

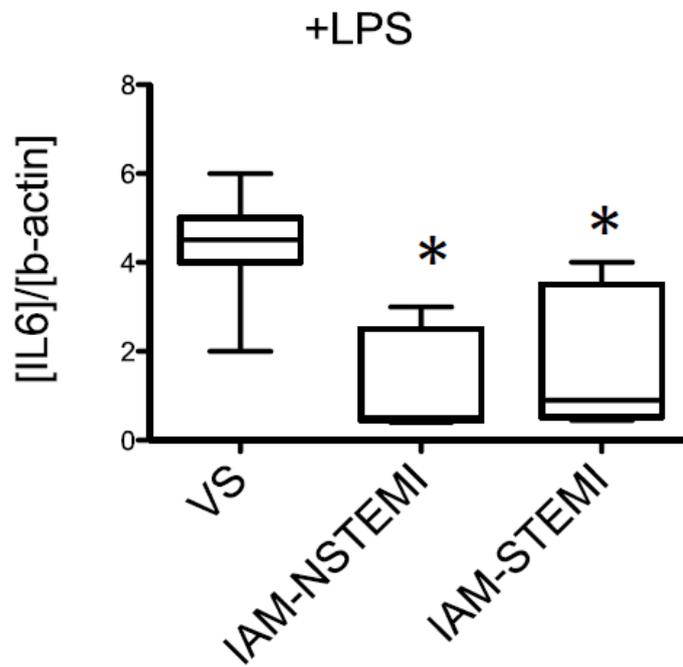


Fig. 1 E

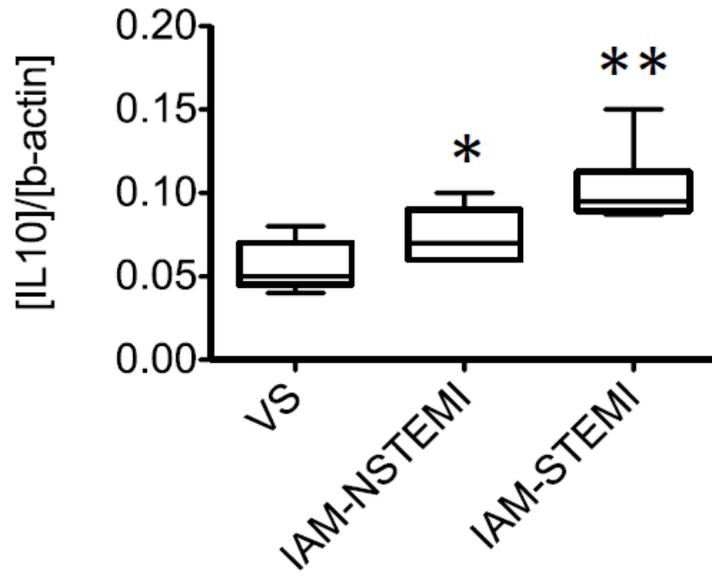


Fig. 1 F

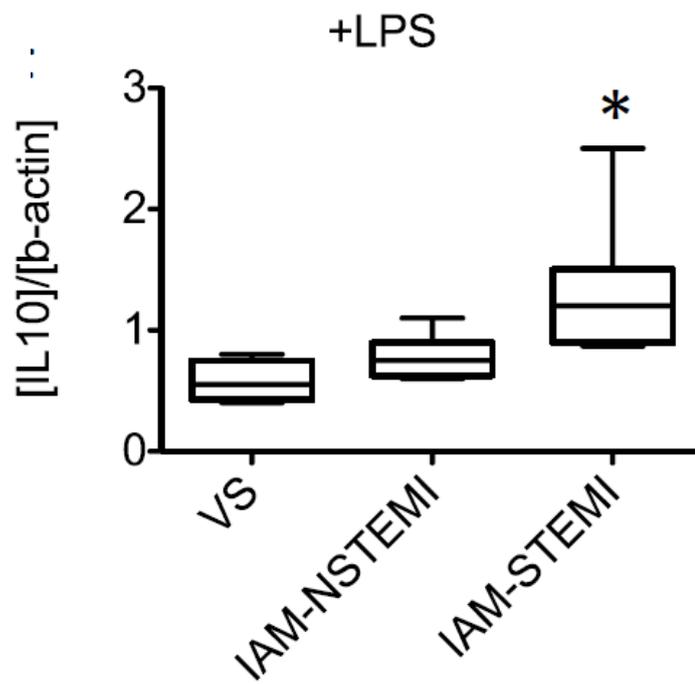


Fig. 2

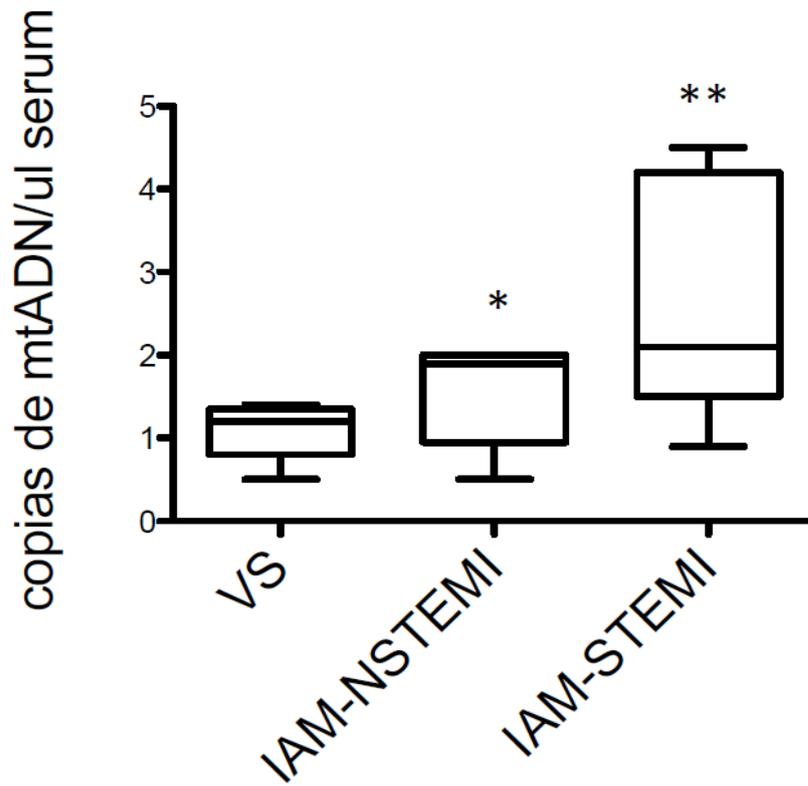


Fig. 3A

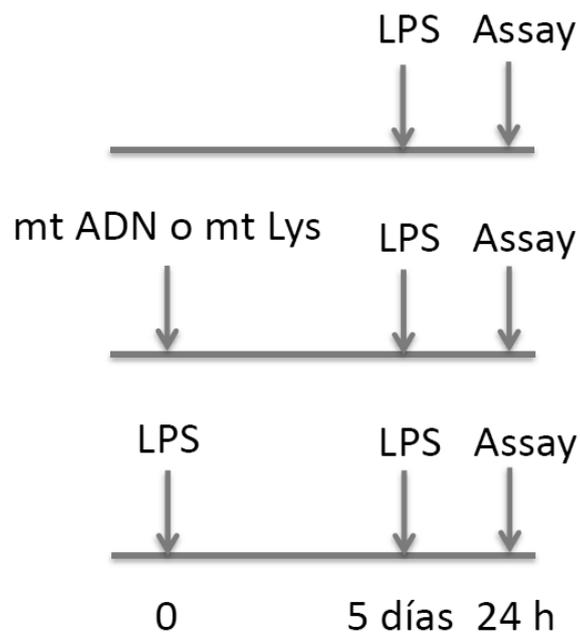


Fig. 3B

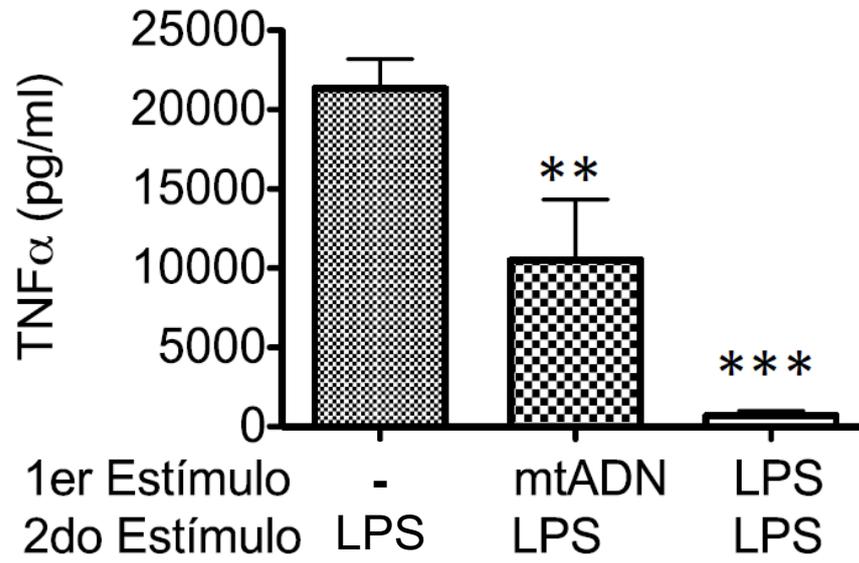


Fig. 3C

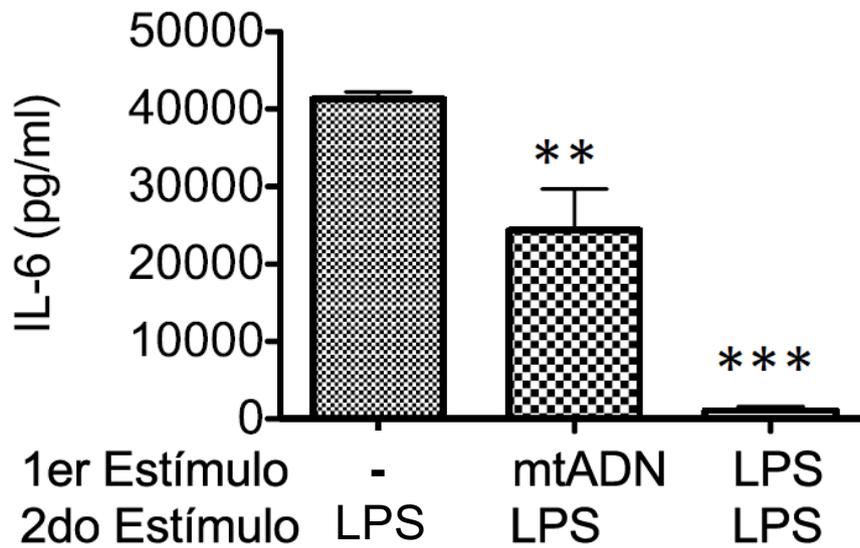


Fig. 3D

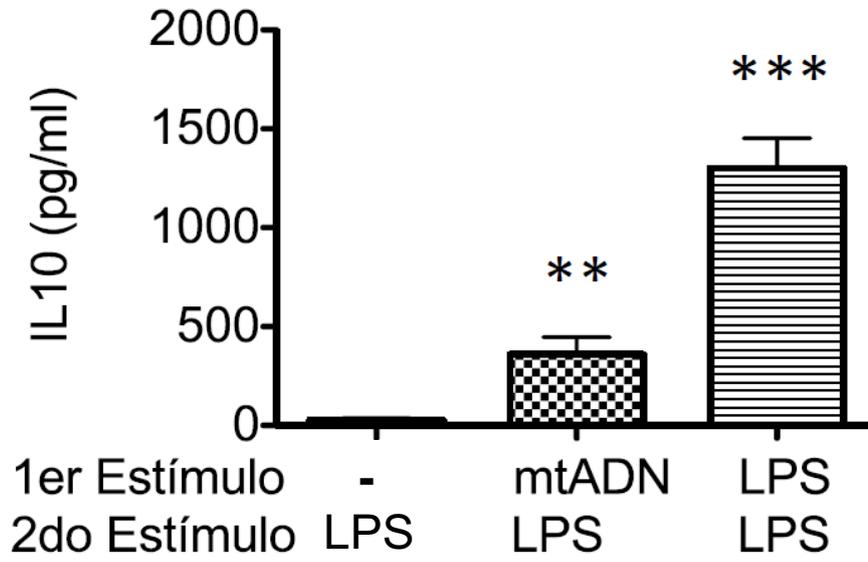


Fig. 4A

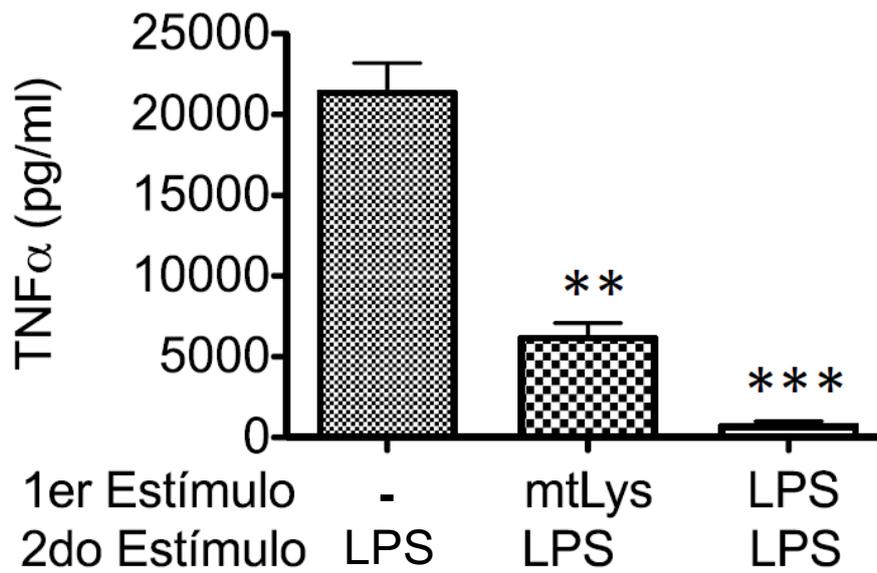


Fig. 4B

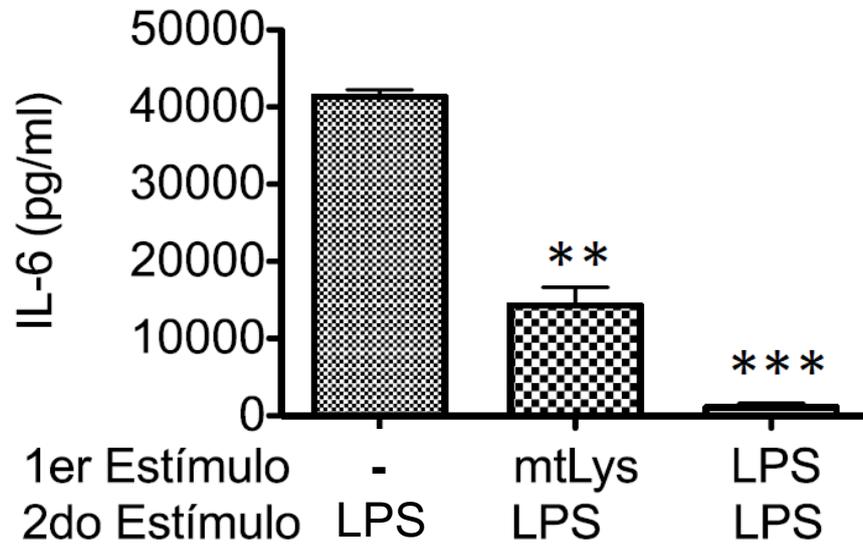


Fig. 4C

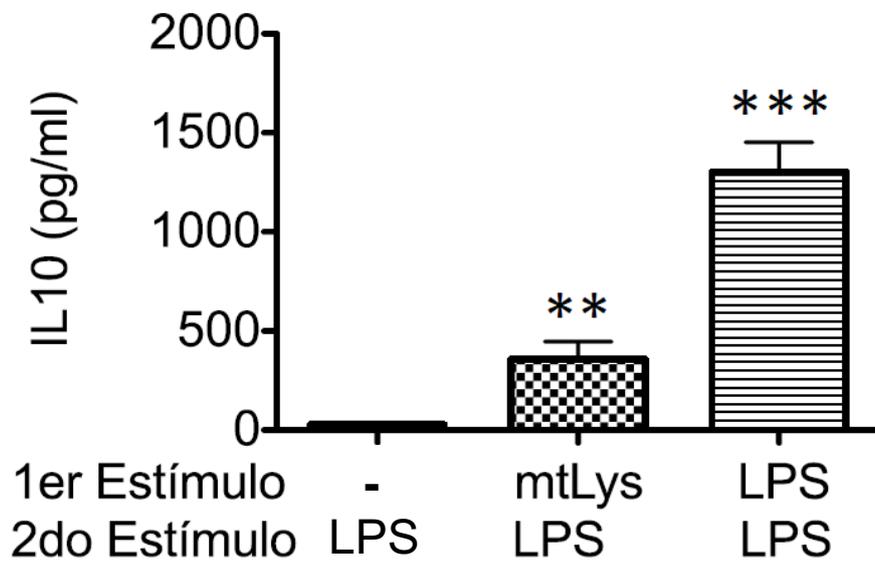


Fig. 5

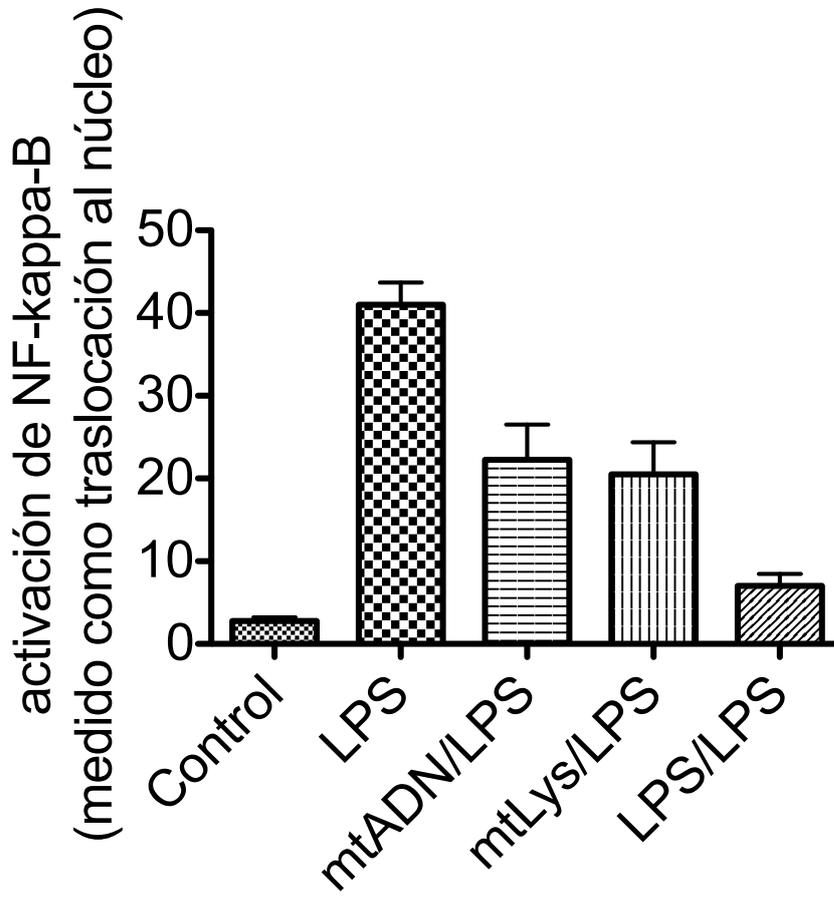


Fig. 6A

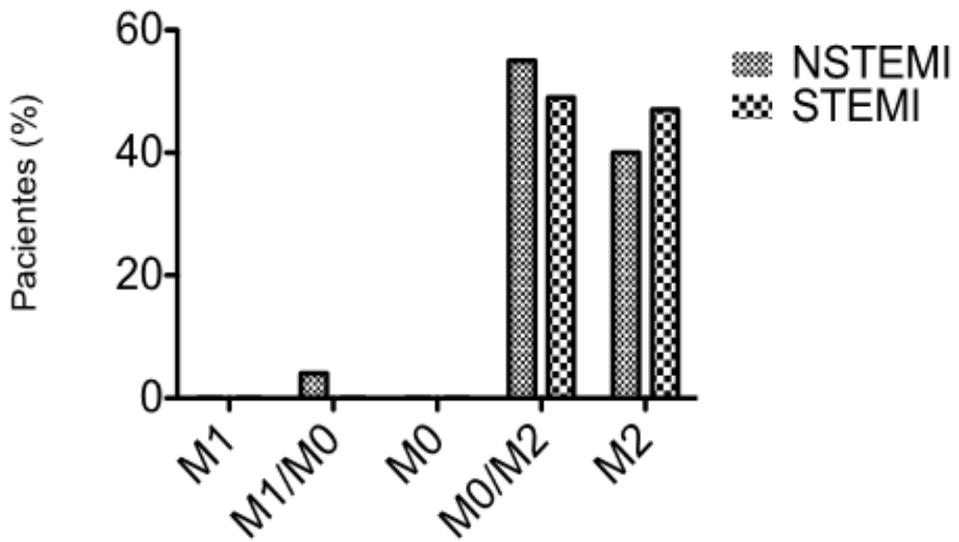


Fig. 6B

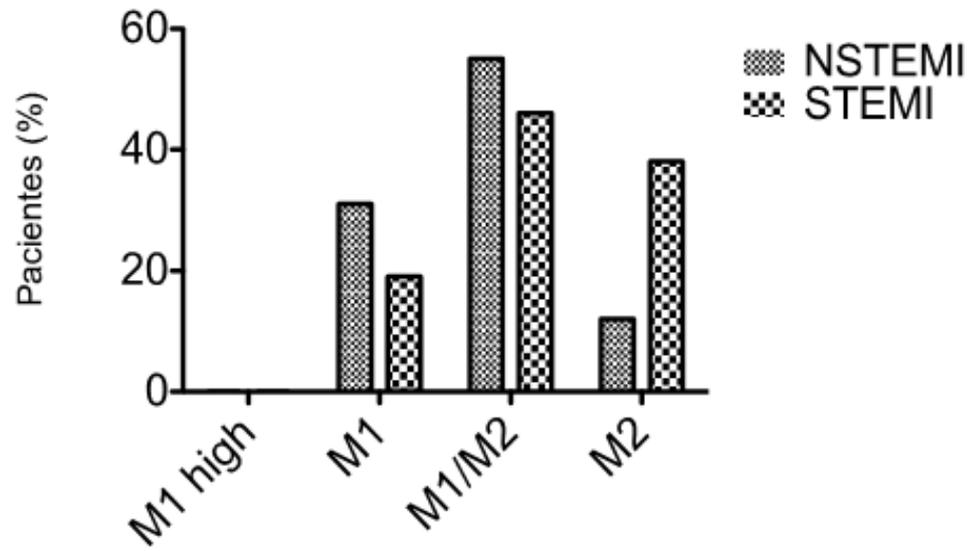


Fig. 6C

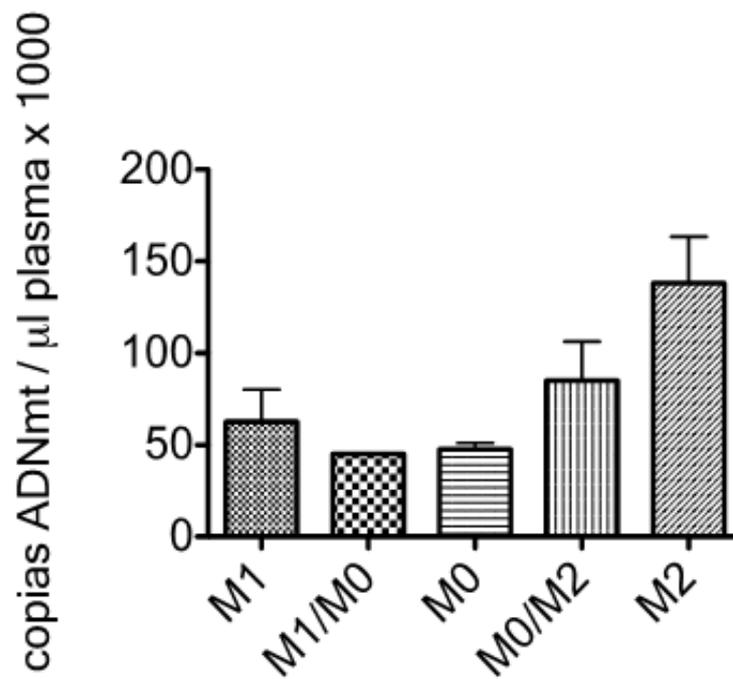


Fig. 6D

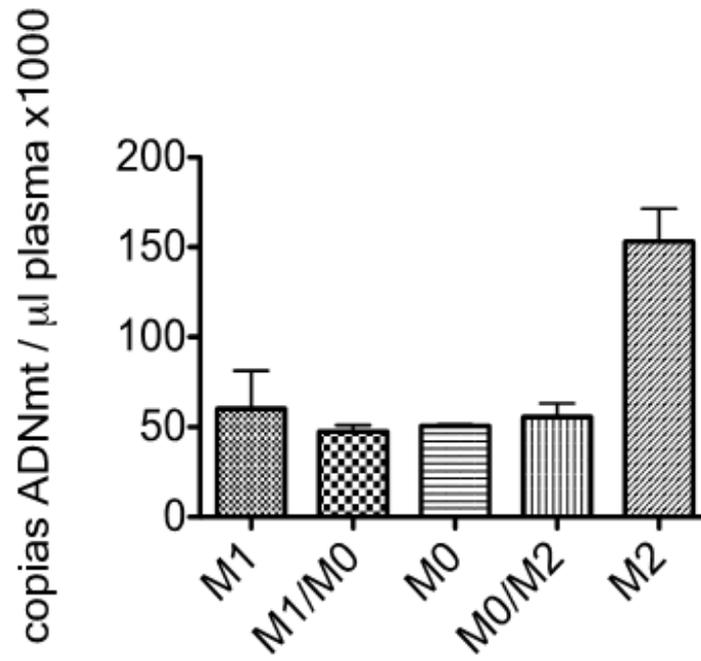
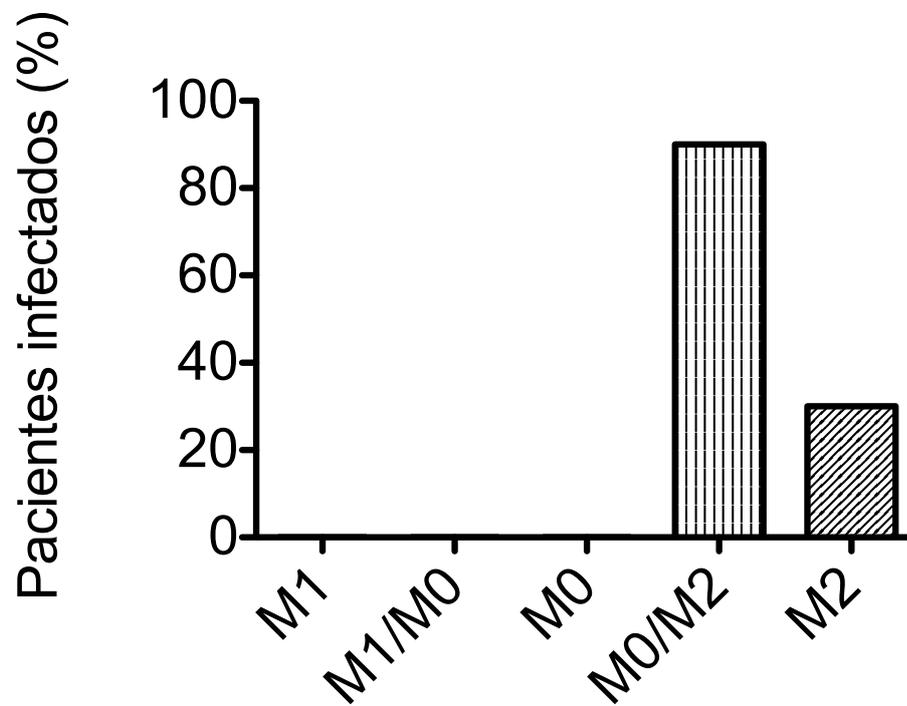


Fig. 7



ES 2 523 707 A2

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital
Universitario La Paz
Llamas Matías, Miguel Ángel

<120> Método para la determinación del riesgo de desarrollar una
enfermedad infecciosa

<130> ES1660.20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2313
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
cacaagcgcc gcgccatgga cgcagccatc ttggaccggg aacaaggcgg cacttcgtcc 60
cgcccactcc gcgtttagac caattgcaag gcagcgaacc tgaccgtgac gagccaatca 120
gatcctgagg aaagttgacc gcgatagagt ccttcgtcgc ccaatcgtcg tctgtgtccc 180
gcctcttcag tgacgcgagg cagaaccagc caatccctgc acggatagcg cccggaagag 240
gctagaagct ggattcagcg tgtccgcgac ctcaccttta ggtcctgtga ggtcggtgga 300
atcctgggggt cctccaaatc taccaggcca tctccccagt ttcccagttc ttcttgcgtg 360
cgggcgagag tggttgggcc ctcgggaacc cactcagagc gaggctaaat ttacggaggg 420
actttctgtt agcagcatga gggcctgtgg ttagacctat agaggtatth cctttgatth 480
aagccagaaa gtcctgagag cggatcgggg agcatttgcg gatcggtcac tttttcctcc 540
tttctgagtc tcttatcccc taccacaggg acggcccagg tggcaggatg tcctgggtctg 600
gccttctcca tggcctcaac acgtccctaa cttgtggtaa gtgggggact tgggcttcag 660
ggacgaggct agagggggag ggttattcgc tcttgactt gtgtgcctcc gtcggagccc 720
cgagggaaac gggggtgtaa aaacacggtg gggttttggc agagctaggg ctgctagagc 780
aagaggtggg aagcagctgc atggagggt actgcgtgct aagcggcggt tgggtcagtt 840
ttattattta tttatttaag atctccctct gtcgcccagg ctgaagtgca gcggtgtgat 900
cacagctcac tgagctctcg acctcctggg ctcaagtgat cctccgcct cagcctccca 960
agtagctggg accacaggcc tgcagaacca caaccagcta actttttgat tctttgtaga 1020
gagggaggct tcctgtgtc gccagctctg gccttaactc ctgagctcaa gtgaccctcc 1080
acagcctcca aaagtgctag gattacatgc atgagccact gagcctacta ttattttaaa 1140
cagcattaa aataatgctt cctggccagc cgtggtggct cagcctgta atcccagcac 1200
tttgagaggc cgaggtcagg agttcgagac cagcctgacc aacatggtga aaccccgtct 1260
ctacttaaaa atacgaagat tagccgagcg tggtggtggg tgcctgtagt cccagctgct 1320
caggaggctg agacaggaga attgcttgaa cccaggaggc agaggttgca gtgggccaag 1380
attgaggtac tgcactccag cctgggcgac agagtgagac tttgtctcaa aaaaaaaaaa 1440

ES 2 523 707 A2

gaaaaaaaaa aaaaaggtaa tgcttccttg aagaataaag agttactttt gtctgtagat 1500
 aacattagat gtgaacaaat gcatctttgt aaagtgcttt aaacaatgcc taaaacacca 1560
 aaattgagtt gctactactc taagatctgt tctctgggat aataaccctt ttcggcctc 1620
 tccaggcca gctctggttc cccggctctg ggctacctgc tccatggcta ccctgaacca 1680
 gatgcaccgc ctggggcccc ccaagcggcc gcctcggag ctgggcccc cggaggccg 1740
 gccgcagctg aaggggtggt tcctgtgcac gtttaccgc aagccgaaga agcccaactc 1800
 agccaatcgc aagtgtctgc gagtgcggct cagcactggc cgcgaggccg tctgttcat 1860
 ccctggggag ggccacacc tgcaggagca ccagattgtc cttgtggagg gcggccgcac 1920
 ccaggacctg ccaggcgtca agctcaccgt tgtgctggc aagtacgact gtggccactg 1980
 gcagaagaag tgacggctgg gggcacagtg ggctgggccc ccctgcagaa catgaacctt 2040
 ccgctcctgg ctgccacagg gtcctccgat gctggccttt ggcctctag aggcagccac 2100
 tcatggattc aagtctggc tccgcctctt ccatcaggac cactattaag ccataggagt 2160
 cctgggggtg caaaggtgc ccctctgtca acacccttg ctctgtgtt tagaggggtg 2220
 gcctgaagga cttttctgc tgggacaaga cactgtactg ccctctgctg ggaaggggtt 2280
 ttaataaaca gaccctggcg cttgtgatgt aaa 2313

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sentido para detección de 12S rRNA

<400> 2
 ccacgggaaa cagcagtgat t 21

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador antisentido para detección de 12S rRNA

<400> 3
 ctattgactt gggttaatcg tgtga 25

<210> 4
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sonda para la detección de 12S rRNA

<400> 4
 tgccagccac cgcg 14