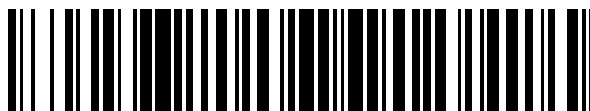


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 771**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2010** **E 10707312 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015** **EP 2379752**

54 Título: **Procedimientos para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente y para establecer un pronóstico de evolución de un síndrome séptico**

30 Prioridad:

19.01.2009 FR 0950306

19.01.2009 FR 0950305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.01.2016

73 Titular/es:

BIOMÉRIEUX S.A. (50.0%)

Chemin de l'Orme

69280 Marcy L'Etoile, FR y

HOSPICES CIVILS DE LYON (50.0%)

72 Inventor/es:

CAZALIS, MARIE-ANGÉLIQUE;

LEPAPE, ALAIN;

MONNERET, GUILLAUME;

MOUGIN, BRUNO y

PACHOT, ALEXANDRE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 556 771 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente y para establecer un pronóstico de evolución de un síndrome séptico

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente. La invención tiene también por objeto un procedimiento para el establecimiento de un pronóstico de un choque séptico en un paciente.

Las infecciones nosocomiales constituyen un verdadero problema de salud pública. En Francia, se estima entre 500000 y 800000 el número de pacientes que contraen cada año una infección nosocomial. La aparición de las infecciones nosocomiales está relacionada con diferentes factores, tales como las técnicas médicas utilizadas, pero también la susceptibilidad del paciente de contraer tal infección nosocomial. Así, los pacientes que tienen un sistema inmunitario deficiente, las personas desnutridas, los recién nacidos, los ancianos, las personas con síndrome séptico, las personas con quemaduras extensas, las personas en estado traumático, pueden estar más predispuestas que otras a contraer una infección nosocomial.

El síndrome séptico, respuesta sistémica a la infección, representa una de las primeras causas de mortalidad en los servicios de reanimación. Puede ser consecuencia de una infección bacteriana, viral, micótica o parasitaria. Estos síndromes sépticos pueden ser clasificados en función de su gravedad. Se distinguen, por orden creciente de gravedad, el SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), la sepsis, la sepsis severa y el choque séptico. De este modo, un grupo de expertos ha propuesto en 2001 unos criterios de definiciones de estos cuatro síndromes clínicos^[1]:

* el SIRS, es una respuesta sistémica inflamatoria desencadenada por una variedad de causas, infecciosas o no. Entre los estados de SIRS desencadenados por causas no infecciosas se pueden citar los estados traumáticos, las quemaduras, la pancreatitis, y los síndromes respiratorios agudos. Una respuesta inflamatoria sistémica se manifiesta por al menos dos de los signos siguientes: a) temperatura superior a 38°C o inferior de 36°C; b) ritmo cardíaco superior a 90 latidos por minuto, c) frecuencia respiratoria superior a 20 respiraciones por minuto; d) número de leucocitos superior a 12000/mm³ o inferior a 4000/mm³,

* la sepsis es un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria relacionada con una infección,

* una sepsis grave es una sepsis asociada a una hipotensión arterial y/o hipoperfusión y/o disfunción de al menos un órgano,

* el choque séptico es una sepsis grave asociada a hipotensión persistente y puede ser calificada por:

* la presencia de un foco infeccioso identificado,

* una hipotensión persistente a pesar del llenado adecuado y tratamiento con vasopresores.

De manera general, los signos de una sepsis, de una sepsis grave y de un choque séptico son muy similares, y la diferencia entre estas tres situaciones reside principalmente en la importancia de la perturbación de todas las funciones vitales. Durante un choque séptico, se observa principalmente una caída en la presión arterial, taquicardia, polipnea, manchas en la piel, hipo- o hipertermia, escalofríos. Estos signos se acompañan también de una disfunción de los órganos "objetivo" con una alteración de la función de órganos separados del foco de infección (riñones, pulmones, sistema nervioso central, sistema digestivo y sistemas de coagulación de la sangre) que se traducen en una oliguria (<0,5 ml/kg/h), insuficiencia renal, hipoxemia, trombocitopenia, agitación, y confusión).

Los pacientes con síndrome séptico son también más o menos sensibles a las infecciones nosocomiales, es decir infecciones asociadas con una estancia en un centro de salud. Esta sensibilidad tiene un impacto significativo sobre la supervivencia y la buena recuperación de estos pacientes.

La evolución de un síndrome séptico desde la etapa de la sepsis hacia una etapa de sepsis grave, y después de choque séptico, no es sistemática ya que alrededor de un 64% de los pacientes sépticos desarrollan sepsis grave, y un 23% de los pacientes con sepsis grave evolucionan hacia choque séptico. Antes de esta etapa final de choque séptico, los tratamientos deben ser prescritos al paciente con el fin de detener y de invertir el proceso fisiopatológico. De esta manera, se debe restaurar un estado hemodinámico satisfactorio y asegurar una ventilación adecuada. También se debe afrontar el tratamiento sintomático de choque y un tratamiento antibiótico adecuado tan rápido como sea posible en función de los datos bacteriológicos.

Parece que, aunque algunos pacientes que desarrollan un síndrome séptico, y en particular un choque séptico, pueden ser reanimados por una toma de carga estándar, tal como un tratamiento de antibiótico de amplio espectro aplicado antes de los resultados de los análisis bacteriológicos que indican la fuente de infección, otros pacientes, que desarrollan un síndrome séptico mucho más grave, necesitan la aplicación de una terapia intensiva, tales como

la proteína C activada. Más allá del alto coste, este tipo de terapia expone a los pacientes a los riesgos de efectos indeseables muy importantes (trastornos de la coagulación, etc.). Por tanto, es muy importante enfocar eficazmente a los pacientes susceptibles de beneficiarse de tal tratamiento.

5 De este modo, el conocimiento de la etiología de la respuesta inflamatoria sistémica y de la determinación de la susceptibilidad del paciente que presenta una respuesta inflamatoria sistémica de contraer una infección nosocomial son esenciales para proponer un tratamiento adecuado al paciente. Otro dato importante para el paciente es poder establecer un pronóstico lo más pronto posible de la evolución del choque séptico.

10 A día de hoy, no existe ningún ensayo que permita determinar la susceptibilidad de un paciente de desarrollar una infección nosocomial, en particular un paciente que presenta una respuesta sistémica inflamatoria relacionada o no con una infección. Los inventores han demostrado, de manera inesperada, que el análisis de la expresión de los genes S100A9 y/o S100A8 es particularmente adecuado para la determinación de tal susceptibilidad y que, además, es apropiado para el establecimiento de un pronóstico de la evolución de un choque séptico.

15 Antes de seguir adelante, se proporcionan las siguientes definiciones para comprender mejor la invención.

Se entiende por síndrome séptico, una respuesta sistémica a la infección. Este síndrome séptico puede estar en una etapa de SIRS, sepsis, sepsis grave o de choque séptico. Preferiblemente, el síndrome séptico es un choque séptico.

20 Se entiende por infección nosocomial, cualquier infección contraída en un centro de salud 48 horas después del ingreso y que no estaba presente en la admisión del paciente en este centro.

25 Se entiende por genes diana, el gen S100A9 y el gen S100A8, en particular el gen S100A9 referenciado en el GenBank con el número de acceso NM_002965.3 y el gen S100A8 y referenciado en el GenBank bajo el número de acceso NM 002964.3.

30 Se entiende por producto de expresión del gen S100A9 y del gen S100A8, el ARN mensajero o un fragmento de ARNm, ADNc o un fragmento de ADNc, una proteína o un fragmento de proteína.

35 Se entiende por muestra biológica, cualquier material obtenido del paciente, susceptible de contener un material biológico que permita detectar la expresión de un gen. Puede ser en particular una muestra de sangre, suero, saliva o tejido o células circulantes del paciente. Se obtiene esta muestra biológica mediante cualquier extracción conocida por el experto en la materia, tal como en particular una toma de sangre.

40 Se entiende por material biológico, cualquier material que permita detectar la expresión de un gen, tal como en particular un ácido nucleico o una proteína, o su secuencia de codificación. El ácido nucleico puede ser en particular un ARN (ácido ribonucleico) como un ARNm (ARN mensajero). Según un modo preferido de realización de la invención, el material biológico es un ácido nucleico, y aún más preferiblemente ARNm.

La extracción del material biológico de la muestra biológica puede ser realizada por todos los protocolos de extracción de ácidos nucleicos o de proteínas bien conocidos por el experto en la materia.

45 A título indicativo, la extracción de los ácidos nucleicos se puede realizar mediante:

• una etapa de la lisis de las células presentes en la muestra biológica, con el fin de liberar los ácidos nucleicos contenidos en las cubiertas proteicas y/o lipídicas de los microorganismos (como los desechos celulares que alteran las reacciones posteriores). Como ejemplos, es posible utilizar los métodos de lisis como se describen en las solicitudes de patentes:

o WO-A-00/05338 sobre la lisis mixta de mezclado magnético y mecánico,

o WO-A-99/53304 sobre la lisis eléctrica, y

o WO-A-99/15321 sobre la lisis mecánica.

El experto en la materia podrá usar otros métodos de lisis bien conocidos, tales como los choques térmicos u osmóticos o las lisis químicas por agentes caotrópicos, tales como las sales de guanidinio (US-A-5, 234,809).

60 • una etapa de purificación, que permite la separación entre los ácidos nucleicos y los otros constituyentes celulares liberados en la etapa de lisis. Esta etapa permite generalmente concentrar los ácidos nucleicos. A título de ejemplo, se pueden utilizar las partículas magnéticas eventualmente recubiertas con oligonucleótidos, por adsorción o covalencia (véanse las patentes US-A-4,672,040 y US-A-5,750,338), y purificar así los ácidos nucleicos que se han unido a estas partículas magnéticas, mediante una etapa de lavado. Esta etapa de purificación de ácidos nucleicos es particularmente interesante si se desea amplificar ulteriormente dichos ácidos nucleicos. Un modo de realización

particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patentes WO-A-97/45202 y WO-A-99/35500. Otro ejemplo interesante de un método de purificación de los ácidos nucleicos es el uso de sílice, ya sea en forma de columna, o en forma de partículas inertes^[2] o magnéticas (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™, Paramagnetic particles). Otros métodos muy extendidos se basan en resinas de intercambio iónico en una columna o en formato de partículas paramagnéticas (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR *et al.*, J. Chromatography, 1998, p. 337-344.). Otro método muy pertinente, pero no exclusivo para la invención, es el de la adsorción en un soporte de óxido metálico (de la compañía Xtrana: matriz Xtra-Bind™). Tal etapa de extracción se puede llevar a cabo en aparatos automáticos. El aparato easyMAG® automático es particularmente apropiado.

Se entiende por reactivo específico, un reactivo que reacciona con el material biológico con el fin de poner en evidencia, de una manera directa o indirecta, la expresión de un gen diana, que puede determinarse mediante el análisis de ARNm que resultan de este gen, o por el análisis de la proteína codificada por este gen.

A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana mediante el análisis de la proteína codificada por este gen, este reactivo específico comprende al menos un anticuerpo específico para la proteína codificada por este gen diana.

A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana por el análisis de ARNm transcrito a partir de este gen, este reactivo específico comprende al menos un cebador de amplificación específico del ADN complementario de este ARNm (se habla entonces de cebador de amplificación específico para un gen diana). El ADN complementario de un ARNm puede obtenerse según un protocolo bien conocido por el experto en la materia. A título indicativo, se extraen los ARN totales (que comprenden los ARN ribosomales, los ARN de transferencia, los ARNm) de la muestra biológica. Se realiza entonces una reacción de transcripción inversa con la ayuda de una enzima de transcriptasa inversa, que permite obtener, a partir de un fragmento de ARN, un fragmento complementario de ADN (ADNc). La realización de esta etapa es bien conocida por el experto en la materia. Cuando se quiere obtener sólo más particularmente los ADN complementarios de los ARN mensajeros, esta etapa enzimática se lleva a cabo en presencia de fragmentos nucleotídicos que comprenden sólo las bases de timina (polyT), que se hibridan por complementariedad sobre la secuencia polyA de los diferentes ARNm a fin de formar un complejo polyT- poliA, que sirve entonces de punto de partida para la reacción de transcripción inversa realizada con la enzima de transcriptasa inversa. Se obtienen entonces varios ADN complementarios de los diversos ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra biológica. A continuación en la descripción, se designa por ADNc un ADN complementario de un ARN mensajero.

Por cebador de amplificación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende desde 5 hasta 100 unidades nucleotídicas, preferiblemente de 15 a 25 unidades nucleotídicas, y que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para el inicio de una polimerización enzimática, por ejemplo en una reacción de amplificación enzimática.

Por reacción de amplificación enzimática, se entiende un proceso que genera múltiples copias de un fragmento nucleotídico diana con la ayuda de cebadores de amplificación específicos por la acción de al menos una enzima. Tales reacciones de amplificación son bien conocidas por el experto en la materia, y se puede mencionar en particular las siguientes técnicas: PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), LCR (Reacción de Cadena de Ligasa), RCR (Reacción de Cadena de Reparación), 3SR (Replicación de Secuencia Auto-Sostenida) con la solicitud de patente WO-A-90/06995, NASBA (amplificación basada en secuencia de ácido nucleico), y TMA (amplificación mediada por transcripción) con la patente US-A-5,399,491.

Se habla entonces de amplicones para designar los polinucleótidos generados por una técnica de amplificación enzimática. Preferiblemente, cuando la amplificación enzimática es una PCR, el reactivo específico comprende al menos 2 cebadores de amplificación específicos a fin de amplificar una región particular del ADN complementario al ARNm que resulta del gen diana. Cuando la amplificación enzimática es una PCR realizada después de una reacción de transcripción inversa, esta se llama RT-PCR.

Por sonda de hibridación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleotídicas, en particular de 6 a 35 unidades nucleotídicas, que poseen una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con un fragmento nucleotídico diana. En la presente invención, el fragmento nucleotídico diana puede ser una secuencia nucleotídica comprendida en un ARN mensajero o una secuencia nucleotídica comprendida en un ADN complementario obtenido por transcripción inversa de dicho ARN mensajero.

Por hibridación, se entiende el proceso durante el cual, en condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos, tales como por ejemplo una sonda de hibridación y un fragmento nucleotídico diana, que tienen secuencias suficientemente complementarias, son susceptibles de formar una hebra doble con enlaces de hidrógeno estables y específicos. Un fragmento nucleotídico "capaz de hibridarse" con un polinucleótido es un fragmento que puede hibridarse con dicho polinucleótido en condiciones de hibridación que se pueden determinar en cada caso de manera conocida. Las condiciones de hibridación se determinan por la rigurosidad, es decir, el rigor de las condiciones de operación. La hibridación es aún más específica cuando se efectúa con mayor rigurosidad. La

rigurosidad se define en particular en función de la composición en bases de un dúplex sonda/diana, así como por el grado de no alineación entre dos ácidos nucleicos. La rigurosidad también puede depender de los parámetros de reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de los agentes desnaturizantes y/o la temperatura de hibridación. La rigurosidad de las condiciones a las cuales una reacción de hibridación se debe de realizar dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia. En general, según la longitud de las sondas de hibridación utilizadas, la temperatura para la reacción de hibridación está comprendida entre aproximadamente 20 y 70°C, especialmente entre 35 y 65°C en una solución salina a una concentración de aproximadamente 0,5 a 1 M. Se lleva a cabo después una etapa de detección de la reacción de hibridación.

Por detección, se entiende o bien una detección directa por un método físico, o bien un método de detección con la ayuda de un marcador. Existen numerosos métodos de detección para la detección de ácidos nucleicos^[4, 5].

Por marcador, se entiende un marcador capaz de generar una señal. Una lista no limitativa de estos trazadores comprende las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, tal como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la betagalactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los cromóforos tales como los compuestos fluorescentes, luminiscentes o colorantes; los grupos de densidad electrónica detectables por microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas tales como la conductividad, por los métodos de voltametría o de amperometría, o por mediciones de impedancia; los grupos detectables por métodos ópticos tales como la difracción, la resonancia de plasmón superficial, la variación de ángulo de contacto o por unos métodos físicos tales como la espectroscopia de fuerza atómica, el efecto túnel, etc.; las moléculas radiactivas tales como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I. Así, el polinucleótido puede ser marcado durante la etapa de amplificación enzimática, por ejemplo utilizando un nucleótido trifosfato marcado para la reacción de amplificación. El nucleótido marcado será un desoxirribonucleótido en los sistemas de amplificación que genera un ADN, tal como PCR, o un ribonucleótido en las técnicas de amplificación que genera un ARN, tal como las técnicas TMA o NASBA. El polinucleótido puede también ser marcado después de la etapa de amplificación, por ejemplo, hibridando una sonda marcada según la técnica de hibridación sándwich descrita en el documento WO-A-91/19812.

En el sentido de la presente invención, la sonda de hibridación puede ser una sonda denominada de captura. En este caso, el fragmento nucleotídico diana puede ser previamente marcado por medio de un marcador. La sonda denominada de captura se inmoviliza o es inmovilizable en un soporte sólido mediante cualquier medio apropiado, es decir, directamente o indirectamente, por ejemplo, por covalencia o adsorción. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha sonda de detección y dicho fragmento nucleotídico diana marcado.

La sonda de hibridación puede también ser una sonda denominada de detección. En este caso, la sonda de hibridación se puede marcar por medio de un marcador. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha sonda de captura y el fragmento nucleotídico diana.

Si se utiliza una sonda denominada de captura o una sonda denominada de detección, la reacción de hibridación se puede llevar a cabo en un soporte sólido, que incluye todos los materiales en los cuales puede inmovilizarse un ácido nucleico. Los materiales de síntesis o los materiales naturales, eventualmente modificados químicamente, se pueden utilizar como soporte sólido, en particular los polisacáridos tales como los materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como el acetato de celulosa y la nitrocelulosa o el dextrano, polímeros, copolímeros, especialmente a base de monómeros del tipo estireno, fibras naturales tales como el algodón, y fibras sintéticas tales como el nylon; materiales minerales tales como la sílice, el cuarzo, los vidrios, las cerámicas; los látex; las partículas magnéticas; los derivados metálicos, los geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microtitulación, de una membrana tal como se describe en la solicitud WO-A-94/12670, de una partícula o de un biochip.

En la presente invención, la determinación de la expresión del gen S100A9 y del gen S100A8 se puede analizar por la expresión de ARNm que se transcriben en un momento dado. En este caso, el material biológico es un ácido nucleico, y el reactivo específico puede ser indiferentemente un cebador de amplificación o una sonda de hibridación tales como se han definido anteriormente.

Se puede determinar la expresión de un gen diana de la siguiente manera:

1) después de extraer los ARN totales a partir de una muestra biológica, se realiza una etapa de transcripción inversa tal como se ha descrito anteriormente, a fin de obtener los diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra biológica (o ADNc)

2) se amplifican los ADNc específicamente. En este caso, el reactivo específico utilizado comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana, tal como se ha definido anteriormente. Esta etapa se puede realizar en particular por una reacción de amplificación del tipo PCR o por cualquier otra técnica de amplificación apropiada.

3) se determina la expresión del gen diana mediante la cuantificación de los ADNc. Los ADNc se pueden cuantificar en particular por el uso de un intervalo de cuantificación obtenido por una reacción de amplificación llevada a cabo hasta la saturación. A fin de tener en cuenta la variabilidad de la eficiencia enzimática que se puede observar durante las diferentes etapas (transcripción inversa, PCR, etc.), se puede normalizar la expresión del gen diana de los diferentes grupos de pacientes, mediante la determinación simultánea de la expresión de un gen denominado constitutivo, cuya expresión es similar en los diferentes grupos de pacientes. Realizando una relación entre la expresión del gen diana y la expresión del gen constitutivo, se corrige así cualquier variabilidad entre los diferentes experimentos. El experto en la materia puede referirse en particular a las siguientes publicaciones [6, 7].

También se puede determinar la expresión de un gen diana de la siguiente manera:

1) después de haber extraído los ARN totales a partir de una muestra biológica, se lleva a cabo una etapa de transcripción inversa, como la descrita anteriormente, con el fin de obtener los diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra biológica (o ADNc),

2) Se inmovilizan los ADNc sobre una membrana,

3) se determina la expresión del gen diana hibridando los ADNc con las sondas de hibridación específicas del gen diana previamente marcadas. Tales técnicas de hibridación son bien conocidas por el experto en la materia, y se puede citar en particular la técnica de transferencia Northern. Esta reacción de hibridación se puede llevar a cabo después de una etapa de amplificación específica de los ADN complementarios de los ARN mensajeros de un gen diana, en particular cuando el gen está débilmente expresado.

La expresión de un gen diana se puede analizar también por la expresión de proteínas codificadas por el gen diana. En este caso, el material biológico es una proteína y se pueden utilizar varias técnicas de detección con o sin ligando. La espectrometría de masas se puede utilizar como técnica para la detección sin un ligando. El reactivo específico puede ser un anticuerpo específico para la proteína codificada por el gen diana para un sistema de detección con el ligando.

Los anticuerpos recombinantes, específicos de la proteína traducida por el gen diana, se pueden obtener según métodos convencionales conocidos por el experto en la materia, a partir de organismos procariotas, tales como las bacterias, o a partir de organismos eucariotas, tales como levaduras, células de mamíferos, de plantas, de insectos o de animales, o por los sistemas de producción extracelular. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar según las técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, tal como la técnica de hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación.

En un principio, se inmuniza un animal, generalmente un ratón (o células en cultivo en el ámbito de inmunizaciones *in vitro*) con un antígeno diana de interés, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan después con células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a los hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de un clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento con respecto al antígeno de interés se puede probar por ejemplo por ELISA, por inmunotransferencia o en una o dos dimensiones, por inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados se purifican después, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por ejemplo por proteólisis. Así, se pueden obtener por digestión enzimática, dando lugar a fragmentos del tipo Fab (tratamiento con papaína^[8]) o del tipo F(ab)² (tratamiento con pepsina^[9]). También se puede preparar por métodos recombinantes^[10]. Otro fragmento de anticuerpo que es conveniente para los propósitos de la invención comprende un fragmento Fv, que es un dímero constituido de la asociación no covalente del dominio ligero variable (VL) y el dominio pesado variable (VH) del fragmento Fab, por lo tanto de una asociación de dos cadenas polipeptídicas. Con el fin de mejorar la estabilidad del fragmento Fv debido a la disociación de dos cadenas polipeptídicas, este fragmento Fv se puede modificar por ingeniería genética mediante la inserción de un enlace péptido adecuado entre el dominio VL y el dominio VH^[11]. Se habla entonces de fragmento scFv ("variable fragmento de cadena sencilla") ya que está constituido de una única cadena polipeptídica. El uso de un enlace péptido compuesto preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos permite unir el extremo terminal C de un dominio al extremo terminal N del otro dominio, constituyendo de esta manera una molécula monomérica dotada con propiedades de enlace similares a las del anticuerpo en su forma completa. Las dos orientaciones de los dominios VL y VH son convenientes (VL-ligadura-VH y VH-ligadura-VL), ya que presentan idénticas propiedades funcionales. Por supuesto, cualquier fragmento conocido por el experto en la materia y que presente las características inmunológicas definidas anteriormente es conveniente para los fines de la invención.

Cuando el material biológico es una proteína que resulta de la expresión de un gen, se puede determinar la expresión de este último mediante la detección y/o la cuantificación de dicha proteína por transferencia Western o

ELISA, o cualquier otro método conocido por el experto en la materia, tal como un método de quimioluminiscencia a partir del material biológico.

La técnica ELISA ("Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a la Enzima") es un inmunoensayo enzimático en un soporte sólido. Este ensayo está dentro del ámbito más general de los EIA ("inmunoensayos enzimáticos") en el cual la determinación se acopla a una reacción catalizada por una enzima. La técnica utiliza uno o dos anticuerpos. El anticuerpo de detección de la formación de complejos inmunitarios (antígeno/anticuerpo) se acopla a la enzima y puede generar la emisión de una señal por un sustrato cromogénico o fluorogénico.

El ensayo de transferencia Western es un ensayo para detectar una proteína específica en una muestra por medio de un anticuerpo específico de esta proteína, que comprende las siguientes etapas, como se describe a continuación.

La primera etapa es la electroforesis sobre gel, que permite separar las proteínas de la muestra según su tamaño.

Las proteínas en el gel se transfieren entonces a una membrana (nitrocelulosa, PVDF, etc.) por presión o mediante la aplicación de una corriente eléctrica, las proteínas se fijan en la membrana gracias a interacciones hidrofóbicas e iónicas.

Después de la saturación de los sitios de interacción no específica, un primer anticuerpo específico para la proteína a estudiar (anticuerpo primario) se incuba con la membrana.

La membrana se aclara después para quitar los anticuerpos primarios no unidos, después se incuba con unos anticuerpos denominados secundarios, que se unirán a los anticuerpos primarios. Este anticuerpo secundario se enlaza habitualmente a una enzima que permite la identificación visual de la proteína estudiada en la membrana. La adición de un sustrato marcado con la enzima genera una reacción de color que es visible en la membrana.

El análisis de la expresión del gen S100A9 y/o del gen S100A8, permite determinar la susceptibilidad del paciente de contraer una infección nosocomial, en particular de un paciente que presenta una respuesta sistémica inflamatoria, y establecer un pronóstico de la evolución de un síndrome séptico. Se puede analizar, por ejemplo, la expresión de al menos un gen diana en un paciente del que no se conoce la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial, y comparando con los valores de la expresión medios conocidos del gen diana de pacientes sensibles y los valores de expresión medios conocidos del gen diana de pacientes no sensibles, determinar si el paciente es susceptible de contraer una infección nosocomial. Del mismo modo, es posible por ejemplo analizar la expresión de al menos un gen diana y comparándola con las medias de expresión conocidas del gen diana, establecer un pronóstico de la evolución del síndrome séptico, incluyendo un pronóstico de supervivencia o de muerte.

Se describe un procedimiento para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente, según el cual:

a) se dispone de una muestra biológica de un paciente y se extrae el material biológico de la muestra biológica,

b) se dispone de al menos un reactivo específico de un producto de expresión de al menos un gen diana seleccionado entre los genes diana S100A9 y S100A8,

c) se determina la expresión de al menos uno de los genes diana S100A9 y S100A8, siendo una sobreexpresión con respecto a un valor límite determinado, una indicación de susceptibilidad de contraer una infección nosocomial.

La invención tiene en particular por objeto un procedimiento para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente según el cual:

a) se dispone de una muestra biológica de un paciente y se extrae un material biológico de la muestra biológica,

b) se dispone de al menos un reactivo específico de un producto de expresión de al menos un gen diana que es el gen diana S100A9,

c) se determina la expresión del gen diana S100A9, siendo una sobreexpresión con respecto a un valor límite determinado, una indicación de una susceptibilidad de contraer una infección nosocomial.

En la etapa c), se puede determinar además la expresión del gen diana S100A8, siendo una sobreexpresión del gen diana S100A8 con respecto a un límite determinado, una indicación de susceptibilidad de contraer una infección nosocomial.

El experto en la materia posee diversas formas posibles para determinar un valor límite. Como ejemplo, se puede citar la determinación del índice de Youden.

El índice de Youden corresponde a una medida del grado general de no errores. Este varía entre 0, para un ensayo que no permite discriminación de dos poblaciones, y 1, para un ensayo que permite discriminación perfecta de dos poblaciones. La máxima del índice de Youden corresponde al valor límite para el cual el número de resultados falsos (negativo falso o positivo falso) es el más bajo. Cuanto más cercano sea el índice de Youden a 1, mejores serán los rendimientos de diagnósticos^[12].

En particular, la muestra biológica se extrae de un paciente que presenta una respuesta sistémica inflamatoria asociada o no a una infección. La muestra biológica puede ser una muestra de sangre y el material biológico extraído puede ser, entre otros, un ácido nucleico. Preferentemente, se extraen los ARN totales de la muestra biológica y la determinación de la expresión del gen diana se efectúa por análisis de la expresión de los ARNm.

En un modo de realización preferido del procedimiento de la invención, el reactivo específico comprende al menos un cebador de amplificación o al menos una sonda de hibridación específica del producto de expresión del gen diana S100A9 y/o del gen diana S100A8; o al menos un anticuerpo específico del producto de expresión del gen diana S100A9 y/o del gen diana S100A8.

El procedimiento es en particular apropiado para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente con síndrome séptico, es decir que presenta una respuesta sistémica inflamatoria a una infección, tal como SIRS, sepsis, sepsis severa y choque séptico.

El reactivo específico de un producto de expresión del gen S100A9 y/o del gen S100A8 se utiliza por lo tanto para determinar la susceptibilidad de un paciente de contraer una infección nosocomial, en particular un paciente que presenta una respuesta sistémica inflamatoria asociada o no a una infección. El reactivo puede comprender al menos una sonda de hibridación específica del gen diana S100A9, al menos una sonda de hibridación específica al gen diana S100A8, al menos un cebador de amplificación específico al gen diana S100A9 al menos un cebador de amplificación específico del gen diana S100A8, al menos un anticuerpo específico de la molécula S100A9 o al menos un anticuerpo específico a la molécula S100A8.

El análisis de la expresión del gen S100A9 y/o S100A8 permite también establecer un pronóstico de la evolución de un síndrome séptico (pronóstico que incluye supervivencia y muerte).

Esta es la razón por la cual un procedimiento para establecer un pronóstico de la evolución de un síndrome séptico en un paciente, según este procedimiento:

- a) se dispone de una muestra biológica de un paciente y se extrae el material biológico de la muestra biológica,
 - b) se dispone de al menos un reactivo específico de un producto de expresión de al menos un gen diana seleccionado entre los genes diana S100A9 y S100A8,
 - c) se determina la expresión de al menos uno de los genes diana S100A9 y S100A8, siendo una sub-expresión con respecto a un valor límite determinado, una indicación de un buen pronóstico de la evolución del síndrome séptico y siendo una sobreexpresión con respecto a un valor límite especificado, una indicación de un mal pronóstico de la evolución del síndrome séptico.
- En la etapa c), se puede determinar la expresión del gen diana S100A9 y del gen diana S100A8, una sub-expresión del gen diana S100A9 con respecto a un valor límite determinado y una sub-expresión del gen diana S100A8 con respecto a un valor límite determinado es una indicación de un buen pronóstico de la evolución del síndrome séptico; una sobreexpresión del gen diana S100A9 con respecto a un valor límite determinado y una sobreexpresión del gen diana S100A8 con respecto a un valor límite determinado con respecto a un valor límite determinado es una indicación de un mal pronóstico de la evolución del síndrome séptico.

Está al alcance del experto en la materia determinar un valor límite. Se puede citar, por ejemplo, la determinación del índice de Youden. El índice de Youden corresponde a una medida de grado general de no errores. Éste varía entre 0, para un ensayo que no permite la discriminación de dos poblaciones, y 1, para un ensayo que permite la discriminación perfecta de dos poblaciones. La máxima del índice de Youden corresponde al valor límite para el cual el número de resultados falsos (falso negativo o falso positivo) es el más bajo. Cuanto más próximo esté el índice de Youden de 1, mejores serán los rendimientos de diagnóstico^[12].

La muestra biológica puede ser una muestra de sangre y el material biológico extraído puede ser, entre otros, un ácido nucleico. Preferentemente, se extraen los ARN totales de la muestra biológica y la determinación de la expresión del gen diana se efectúa por análisis de la expresión de los ARNm. En un modo de realización preferido del procedimiento de la invención, el reactivo específico comprende al menos un cebador de amplificación o al menos una sonda de hibridación específica del producto de expresión del gen diana S100A9 y/o del gen diana S100A8; o al menos un anticuerpo específico del producto de expresión del gen diana S100A9 y/o del gen diana S100A8.

El reactivo específico para un producto de expresión del gen S100A9 y/o del gen S100A8 se usa por lo tanto para establecer un pronóstico de la evolución de un síndrome séptico en un paciente (que incluye un pronóstico de supervivencia o de muerte). El reactivo puede comprender al menos una sonda de hibridación específica del gen diana S100A9, al menos una sonda de hibridación específica del gen diana S100A8, al menos un cebador de amplificación específico del gen diana S100A9, al menos un cebador de amplificación específico del gen diana S100A8, al menos un anticuerpo específico de la molécula S100A9, o al menos un anticuerpo específico de la molécula S100A8.

Figuras

La Figura 1 representa la correlación de la expresión génica de S100A8 y S100A9 (N=86). Muestra la fuerte correlación que existe entre las expresiones génicas de las moléculas S100A9 y S100A8 con un coeficiente de Spearman $> 0,90$ ($r=0,9134$). Las expresiones génicas de las moléculas S100A9 y S100A8 poseen una capacidad similar para discriminar los pacientes susceptibles de contraer una infección nosocomial y para establecer un pronóstico de evolución del síndrome séptico.

La Figura 2 ilustra la diferencia significativa de la expresión del gen S100A8 ($p=0,0461$) entre los pacientes supervivientes y no supervivientes para unas muestras realizadas entre D7 y D10 después del comienzo del choque séptico. Leyenda: VS = voluntarios sanos; S = pacientes que sobreviven; NS = pacientes que no sobreviven.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Estudio de la expresión del gen S100A9

Muestras

Se utilizó un grupo de 44 voluntarios sanos (S) y un grupo de 148 pacientes afectados de un síndrome séptico (SEP), muestreados en D1, D2 o D3 después del choque séptico (siendo H0 la inyección del tratamiento vasopresor), con el fin de comparar la expresión del gen S100A9 en la sangre periférica. Se distinguía entonces un grupo de 44 pacientes sanos (S) y un grupo de 148 pacientes que desarrollan choque séptico (SEP).

Extracción de los ARN y síntesis de los ADNc

Para cada paciente, la muestra biológica fue una muestra sanguínea, obtenida regularmente durante los primeros 10 días después del principio del síndrome séptico desarrollado por los pacientes SEP. Se efectuó asimismo una extracción según un mismo protocolo en pacientes sanos (S). Estas muestras se recogieron directamente en tubos ARN Sanguíneos PAXgene™ (PreAnalytix, Franklin Lakes, USA).

Después de la etapa de extracción de sangre y con el objetivo de obtener una lisis completa de las células, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4h y después se conservaron a -20°C hasta la extracción del material biológico. Más precisamente, en este protocolo, los ARN totales se extrajeron con la ayuda de kits PAXgene Blood RNA® (PreAnalytiX) respetando las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los tubos se centrifugaron (10 min, 3000g) a fin de obtener un residuo de ácidos nucleicos. Este residuo se lavó y se recogió en un tampón que contiene proteinasa K necesaria para la digestión de las proteínas (10 min a 55°C). Se efectuó una nueva centrifugación (5 min, 19000g) para eliminar los restos celulares, y se añadió etanol con el fin de optimizar las condiciones para la fijación de los ácidos nucleicos. Los ARN totales se fijaron específicamente en las columnas ARN PAXgene spin column y, antes de la elución de estos, se realizó una digestión del ADN contaminante con la ayuda del RNase free DNase set™ (Qiagen Ltd, Crawley, RU).

Para cada extracción, la calidad de los ARN totales se verificó por electroforesis capilar usando el kit RNA 6000 Nano Chip™ (Agilent Technologies). El instrumento usado es el bioanalyser 2100. Una reacción de transcripción inversa (RT) se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL . El ARN total (0,5 μg) se mezcló con 1 μL de polyT en 50 μM y 1 μL de "annealing buffer" y después se incubó durante 5 min a 65°C . Después del enfriamiento en hielo, la solución se mezcló con 10 μL de 2x First Strand Reaction Mix y 2 μL de SuperScript III/RNase™ RT out enzyme Mix RT (15 U/ μL), procediendo todos estos productos del SuperScript First Strand Synthesis Super Mix™ RT-PCR system (Invitrogen). La transcripción inversa se llevó a cabo durante 50 min a 50°C y después se detuvo mediante una incubación de 5 min a 85°C . Para finalizar, cada solución de ADNc se diluyó a 1/10 en agua DEPC.

Preparación de intervalos de referencia para cuantificación

A partir de un banco de ADNc obtenido de sujetos sanos, la amplificación de la región de 153-179 del gen diana S100A9 (GenBank No. NM_002965.3) se realizó por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), llevada a cabo hasta saturación, usando el siguiente par de cebadores:

Cebador sentido: 5' -TCAAAGAGCTGGTGCGAAAA- 3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador antisentido: 5' -AACTCCTCGAAGCTCAGCTG- 3' (SEQ ID NO: 2)

Análisis de la expresión de los ARNm por PCR en tiempo real

Los ARNm del gen diana S100A9 que se retranscriben en ADNc, como se ha descrito anteriormente, se cuantificaron por PCR cuantitativo en tiempo real usando el LightCenter™ (Roche). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la ayuda del kit Fast-Start™ DNA Master SYBR Green I real-time PCR (Roche Molecular Biochemicals). Cada PCR se realizó en un volumen final de 20 µl que contiene 3,6 µl de agua, 2,4 µl de MgCl₂, 2 µL de SYBR Green mix (Fast start DNA master SYBR green + Taq DNA polymerase) y 1 µl de cada cebador (10 µM) y 10 µl de solución de ADNc. Los cebadores utilizados son los descritos anteriormente.

Después de una etapa de desnaturalización de 10 min en 95°C, la amplificación se lleva a cabo durante 40 ciclos de un protocolo PCR de "touch-down" (10 s a 95°C, 10 s de hibridación a 68-58°C, seguido de una extensión de 16 s a 72°C). Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por el SYBR Green.

Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos PCR han sido sistemáticamente objeto de un análisis de curva de fusión (LightCycler™ - Roche). Para ello, los productos PCR se trataron por una temperatura creciente de 58 a 98°C con un incremento de 0,1°C/s. Por cada producto PCR, se obtuvo un solo pico durante el análisis de la curva, caracterizado por una temperatura de fusión específica.

La combinación de los cebadores necesarios para la cuantificación del gen constitutivo CPB se suministró por Search-LC (Heidelberg, Alemania,- referencia 488116).

La cantidad de ARNm diana relativa a la cantidad de ARNm del gen constitutivo ciclofilina B se analizó mediante la técnica de cuantificación relativa con LightCycler Relative Quantification Software™ (Roche Molecular Biochemicals). El "Second Derivative Maximum method" del programa LightCycler™ (Roche) se usó para determinar automáticamente el "Crossing Point" (Cp) para cada muestra. El valor de Cp se definió como el número de ciclos para el cual la fluorescencia fue significativamente diferente desde el ruido de fondo.

Se realizaron cinco diluciones en serie en 1/10 por cuadruplicado con cada estándar a fin de generar una curva de calibración que expresa el Cp en función del algoritmo del número de copias. Las diluciones estándares se optimizaron de modo que la curva de calibración cubre el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen constitutivo. Las curvas estándares relativas que describen la eficacia de PCR para el gen diana y el gen constitutivo se generaron y se usaron para realizar la cuantificación con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals).

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Pacientes	N	Media	Cuartil inferior	Cuartil superior
S	44	1,46	1,065	1,87
SEP	148	16,62	11,87	25,835

El valor p del ensayo Mann-Whitney entre los sujetos sanos y los pacientes que padecen choque séptico es < 0,0001.

La expresión del marcador S100A9 durante los primeros 3 días del choque séptico se sobreexpresó significativamente con relación a los donantes sanos.

Ejemplo 2. Estudio de la expresión del gen S100A8

Muestras

Se utilizó un grupo de 32 voluntarios sanos (S) y un grupo de 86 pacientes afectados de un síndrome séptico (SEP), y muestreados entre D7 y D10 después del choque séptico (siendo H0 la inyección del tratamiento vasopresor), con el fin de comparar la expresión del gen S100A8 en la sangre periférica. Se distinguió entonces un grupo de 32 pacientes sanos (S) y un grupo de 86 pacientes que desarrollan choque séptico (SEP).

Extracción de los ARN y síntesis de los ADNc

Para cada paciente, la muestra biológica es una muestra de sangre, regularmente obtenida durante los primeros 10 días después del inicio del síndrome séptico desarrollado por los pacientes SEP. Se efectuó asimismo una

extracción según un mismo protocolo en pacientes sanos (S). Estas extracciones se recogieron directamente en tubos de PAXgene™ Blood RNA (PreAnalytiX, Franklin Lakes, EE.UU.).

Después de la etapa de extracción sanguínea y a fin de obtener una lisis completa de las células, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4h y después se conservaron a -20°C hasta la extracción del material biológico. Más precisamente, en este protocolo, los ARN totales se extrajeron con la ayuda de kits PAXgene Blood RNA® (PreAnalytiX) respetando las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los tubos se centrifugaron (10 min, 3000 g) a fin de obtener un residuo de ácidos nucleicos. Este residuo se lavó y recogió en un tampón que contenía la proteinasa K necesaria para digestión de las proteínas (10 min a 55°C). Se llevó a cabo una nueva centrifugación (5 min, 19000 g) para eliminar los restos celulares, y se añadió etanol con el fin de optimizar las condiciones de fijación de los ácidos nucleicos. Los ARN totales se fijaron específicamente en las columnas PAXgene RNA spin column y, antes de la elución de estos, se llevó a cabo una digestión del ADN contaminante con la ayuda del RNase free DNase set™ (Qiagen Ltd, Crawley, RU).

Para cada extracción, la calidad de los ARN totales se verificó por electroforesis capilar usando el kit RNA 6000 Nano Chip™ (Agilent Technologies). El instrumento usado es el bioanalyzer 2100. Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa (RT) en un volumen final de 20 µl. El ARN total (0,5 µg) se mezcló con 1 µl de polyT a 50 µM y 1 µl de "annealing buffer" y después se incubó durante 5 min a 65 °C. Después del enfriamiento en hielo, la solución se mezcló con 10 µl 2x First Strand Reaction Mix y 2 µl de SuperScript III/RNase™ out enzyme Mix RT (15 U/µl), procediendo todos estos productos del SuperScript First Strand Synthesis Super Mix™ RT-PCR system (Invitrogen). Se llevó a cabo la transcripción inversa durante 50 min a 50°C y después se detuvo mediante una incubación durante 5 min a 85°C. Para finalizar, cada solución de ADNc se diluyó a 1/10 en agua DEPC.

Preparación de intervalos de referencia de cuantificación

A partir de un grupo de ADNc que proviene de sujetos sanos, se realizó la amplificación de región 129-280 del gen diana S100A8 (GenkBank nº NM_002964.3) por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), conducido hasta saturación, usando el siguiente par de cebadores:

Cebador sentido: 5'-ATTTCCATGCCGTCTACAGG-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador antisentido: 5'-CACCAGAATGAGGAAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 4)

Análisis de expresión de los ARNms por PCR en tiempo real

Los ARNm del gen diana S100A8 que se retranscriben en ADNc, como se ha descrito anteriormente, se cuantificaron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el LightCycler™ (Roche). Las reacciones PCR se llevaron a cabo con la ayuda del kit Fast-Start™ DNA Master SYBR Green I real-time PCR (Roche Molecular Biochemicals). Cada PCR se realizó en un volumen final de 20 µl que contiene 3,6 µl de agua, 2,4 µl de MgCl₂, 2 µl de SYBR Green mix (Fast start DNA master SYBR green + Taq DNA polymerase) y 1 µl de cada cebador (10 µM) y 10 µl de solución de ADNc. Los cebadores utilizados son los descritos anteriormente.

Después de una etapa de desnaturalización de 10 min a 95°C, se efectuó la amplificación con la ayuda de 40 ciclos de un protocolo PCR "touch-down" (10 s a 95°C, 10 s de hibridación a 68-58°C, seguido de una extensión de 16 s a 72°C). Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por el SYBR Green.

Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos PCR fueron objeto sistemáticamente de un análisis de la curva de fusión (LightCycler™ - Roche). Por ello, los productos PCR se trataron a una temperatura creciente de 58 a 98 °C con un incremento de 0,1°C/s. Para cada producto PCR, se obtuvo un solo pico durante el análisis de la curva, caracterizado por una temperatura de fusión específica.

La combinación de cebadores necesarios para la cuantificación del gen constitutivo CPB se suministró por Search-LC (Heidelberg, Alemania, referencia 488116).

La cantidad de ARNm diana con relación a la cantidad de ARNm del gen constitutivo ciclofilina B se analizó por la técnica de cuantificación relativa con el LightCycler Relative Quantification Software™ (Roche Molecular Biochemicals). El "Second Derivative Maximum Method" del programa LightCycler™ (Roche) se usó para determinar automáticamente el "Crossing Point" (Cp) para cada muestra. El valor de Cp se definió como el número de ciclos para el cual la fluorescencia fue significativamente diferente del ruido de fondo.

Se realizaron cinco diluciones en serie en 1/10 en cuadruplicado con cada estándar a fin de generar una curva de calibración que expresa el Cp en función del logaritmo del número de copias. Las diluciones de estándar se optimizaron a fin de que la curva de calibración cubra el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen constitutivo. Las curvas estándares relativas que describen la efectividad de PCR para el gen diana y el gen

constitutivo se generaron y se usaron para realizar una cuantificación con LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals).

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2				
Pacientes	N	Media	Cuartil inferior	Cuartil superior
S	32	12,9	8,5	20,4
SEP	86	183,5	96,6	438,5

El valor p del ensayo Mann-Whitney entre los sujetos sanos y los pacientes que padecen choque séptico es < 0,0001.

La expresión del marcador S100A8 en los días D7 a D10 después del choque séptico se sobreexpresó significativamente con relación a los donantes sanos.

Ejemplo 3. Estudio del valor de pronóstico de supervivencia de S100A8 en pacientes con choque séptico.

Muestras

El estudio se realizó sobre un conjunto de 86 pacientes que han desarrollado un choque séptico, y admitidos en una unidad de reanimación quirúrgica o médica del centro hospitalario Lyon-Sud. Se extrajeron muestras de estos pacientes a D7, D8, D9 o D10 después del choque séptico (siendo H0 el inicio del tratamiento vasopresor).

Extracción de los ARN y síntesis de los ADNc

Para cada paciente, la muestra biológica es una extracción sanguínea, que se extrajo diariamente durante los primeros 10 días después del inicio del síndrome séptico (pacientes SEP). Estas muestras se recogieron directamente en tubos PAXgene™ Blood ARN (PreAnalytiX, Franklin Lakes, EE.UU.). Después de la etapa de extracción sanguínea y con el fin de obtener una lisis completa de las células, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas y después se conservaron a -20°C hasta la extracción del material biológico. Más precisamente, en este protocolo, los ARN totales se extrajeron con la ayuda de kits PAXgene Blood RNA® (PreAnalytiX) respetando las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los tubos se centrifugaron (10 min a 3000 g) para obtener un residuo de ácidos nucleicos. Este residuo se lavó y se recogió en un tampón que contenía proteinasa K necesaria para la digestión de las proteínas (10 min a 55°C). Se efectuó una nueva centrifugación (5 min a 19000 g) para eliminar los restos celulares, y se añadió etanol con el fin de optimizar las condiciones de fijación de los ácidos nucleicos. Los ARN totales se fijaron específicamente en columnas PAXgene RNA spin Column™ y, antes de la elución de estos, se efectuó una digestión del ADN contaminante con la ayuda del RNase free DNase set™ (Qiagen Ltd, Crawley, RU).

Para cada extracción, la calidad de los ARN totales se verificó por electroforesis capilar utilizando el kit RNA 6000 Nano Chip™ (Agilent technologies). El instrumento utilizado es el bioanalyser 2100™. Una reacción de transcripción inversa (TR) se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. El ARN total (0,5 µg) se mezcló con 1 µl de oligo (dT) 50 µM y 1 µl de "annealing buffer" y después se incubó durante 5 min a 65°C. Después del enfriamiento en hielo, la solución se mezcló con 10 µl de 2x First Strand Reaction Mix y 2 µl de SuperScript III/RNase out enzyme Mix RT (15 U/µl), procediendo todos estos productos del SuperScript First Strand Synthesis Super Mir™ RT-PCR system (Invitrogen). Se llevó a cabo la transcripción inversa durante 50 min a 50 °C y después se detuvo por incubación durante 5 min a 85°C. Para terminar, cada solución de ADNc se diluyó al 1/10 en agua DEPC.

Preparación de intervalos de referencia de cuantificación

A partir de un grupo de ADNc que proviene de sujetos sanos, se realizó la amplificación de la región 129-280 del gen diana S100A8 (GenBank nº NM_002964.3) por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), conducido hasta saturación, usando el siguiente par de cebadores:

Cebador sentido: 5'-ATTTCATGCCGTCTACAGG-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador antisentido: 5'-CACCAGAATGAGGAAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 4)

Análisis de la expresión de los ARNm por PCR cuantitativo en tiempo real

Los ARNm del gen diana S100A8 retranscritos en ADNc, como se han descrito anteriormente, se cuantificaron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el LightCycler™ 2.0 (Roche). Las reacciones PCR se efectuaron con la ayuda del kit Fast-Start™ DNA Master SYBR Green I real-time PCR (Roche Molecular Biochemicals). Cada PCR se efectuó en un volumen final de 20 µl que contenía 3,6 µl de agua, 2,4 µl de MgCl₂, 2 µl de SYBR Green Mix (Fast start DNA master SYBR green + Taq DNA polymerase) y 1 µl de cada cebador (10 µM) y 10 µl de solución de ADNc. Los cebadores utilizados son los descritos anteriormente.

Después de una etapa de desnaturalización de 10 min a 95°C, se llevó a cabo la amplificación con la ayuda de 40 ciclos de un protocolo PCR "touch-down" (10 s a 95°C, 10 s de hibridación a 68-58°C (0,5°C/ciclo), seguido de una extensión de 16 s a 72°C). Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por el SYBR Green.

Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos PCR fueron objeto sistemáticamente de un análisis de la curva de fusión (LightCycler™ 2.0 - Roche). Por ello, los productos PCR se trataron por una temperatura creciente de 58 a 98 °C con un incremento de 0,1°C/s. Para cada producto PCR, se obtuvo un solo pico durante el análisis de la curva, caracterizado por una temperatura de fusión específica.

La combinación de cebadores necesarios para la cuantificación del gen constitutivo CPB se suministró por Search-LC (Heidelberg, Alemania; referencia 488116).

La cantidad de ARNm diana con relación a la cantidad de ARNm del gen constitutivo ciclofilina B se analizó mediante la técnica de cuantificación relativa con el LightCycler Relative Quantification Software™ (Roche Molecular Biochemicals). El "Second Derivative Maximum Method" del programa LightCycler™ (Roche) se usó para determinar automáticamente el "Crossing Point" (Cp) para cada muestra. El valor de Cp se definió como el número de ciclos por el cual la fluorescencia fue significativamente diferente del ruido de fondo.

Se realizaron cinco diluciones en serie al 1/10 en cuadruplicado con cada estándar a fin de generar una curva de calibración que expresa el Cp en función del logaritmo del número copias. Las diluciones de estándar se optimizaron a fin de que la curva de calibración cubra el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen constitutivo. Se generaron y se usaron las curvas estándares relativas que describen la efectividad de PCR para el gen diana y el gen constitutivo para realizar una cuantificación con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals).

Análisis de los resultados

Para determinar si la expresión del gen S100A8 está correlacionada con la supervivencia del paciente, se realizó un ensayo de Mann Whitney.

La Figura 2 ilustra la diferencia significativa de la expresión del gen S100A8 (p= 0,0461) entre los pacientes supervivientes y no supervivientes sobre una muestras realizadas entre D7 y D10 después del inicio del choque séptico.

Ejemplo 4. Estudio de expresión del gen S100A9 para determinar la susceptibilidad de los pacientes de contraer una infección nosocomial

Muestras

Se llevo a cabo el estudio sobre un conjunto de 93 pacientes que han desarrollado un choque séptico, y admitidos en una unidad de reanimación quirúrgica o médica del centro hospitalario Lyon-Sud. Se extrajeron muestras de estos pacientes a D7, D8, D9 o D10 después del choque séptico (siendo H0 el inicio del tratamiento vasopresor). Entre estos pacientes que han desarrollado un choque séptico, 27 pacientes contrajeron de manera secundaria al choque una infección nosocomial y 66 no contrajeron una infección nosocomial en los 53 días de observación de este conjunto.

Extracción de los ARNs y síntesis de los ADNcs

Para cada paciente, la muestra biológica es una muestra sanguínea, que se obtuvo regularmente durante los primeros 10 días después del inicio del síndrome séptico (pacientes SEP). Se efectuó asimismo una extracción a sujetos sanos (S) según un mismo protocolo. Estas muestras se recogieron directamente en tubos PAXgene™ Blood RNA (PreAnalytiX, Franklin Lakes, USA).

Después de la etapa de extracción sanguínea y con el fin de obtener una lisis completa de las células, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas y después se conservaron a -20°C hasta la extracción del material biológico. Más precisamente, en este protocolo, los ARN totales se extrajeron por medio de kits PAXgene Blood

RNA® (PreAnalytiX) respetando las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los tubos se centrifugaron (10 min en 3000 g) para obtener un residuo de ácidos nucleicos. Este residuo se lavó y se recogió en un tampón que contenía proteinasa K necesarias para la digestión de las proteínas (10 min a 55°C). Se efectuó una nueva centrifugación (5 min en 19000 g) para eliminar los restos celulares, y se añadió etanol con el fin de optimizar las condiciones para la fijación de los ácidos nucleicos. Los ARN totales se fijaron específicamente en columnas PAXgene RNA spin column™ y, antes de la elución de estos, se efectuó una digestión del ADN contaminante con la ayuda del RNase free DNase set™ (Qiagen Ltd, Crawley, RU).

Para cada extracción, la calidad de los ARN totales se verificó por electroforesis capilar usando el kit RNA 6000 Nano Chip™ (Agilent technologies). El instrumento utilizado es el bioanalyser 2100™. Se realizó una reacción de transcripción inversa (RT) en un volumen final de 20 µl. El ARN total (0,5 µg) se mezcló con 1 µl de polyT a 50 µM y 1 µl de oligo (dT) 50 µM y 1 µl de "annealing buffer" y después se incubó durante 5 min a 65°C. Después del enfriamiento en hielo, la solución se mezcló con 10 µl de 2x First Strand Reaction Mix y 2 µl de SuperScript III/RNase out enzyme Mix RT (15 U/µl), procediendo todos estos productos de SuperScript First Strand Synthesis Super Mix™ RT-PCR system (Invitrogen). Se efectuó la transcripción inversa durante 50 min a 50°C y después se detuvo por incubación durante 5 min a 85°C. Para terminar, cada solución de ADNc se diluyó a 1/10 en agua DEPC.

Preparación de intervalos de referencia de cuantificación

A partir de un grupo de ADNc obtenido de sujetos sanos, se realizó la amplificación de la región 153-179 del gen diana S100A9 (GenkBank nº NM_002965.3) por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), conducido hasta saturación, usando el siguiente par de cebadores:

Cebador sentido: 5'-TCAAAGAGCTGGTGCGAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador antisentido: 5'-AACTCCTCGAAGCTCAGCTG-3' (SEQ ID NO: 2)

Análisis de la expresión de los ARNm por PCR en tiempo real

Los ARNm del gen diana S100A9 retranscritos en ADNc, como se ha descrito anteriormente, se cuantificaron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el LightCycler™ (Roche). Las reacciones PCR se efectuaron con la ayuda el kit Fast-Start™ DNA Master SYBR Green I real-time PCR (Roche Molecular Biochemicals). Cada PCR se efectuó en un volumen final de 20 µl que contenía 3,6 µl de agua, 2,4 µl de MgCl₂, 2 µl de SYBR Green mix (Fast start DNA master SYBR green + Taq DNA polymerase) y 1 µl de cada cebador (10 µM) y 10 µl de solución de ADNc. Los cebadores utilizados son los descritos anteriormente.

Después de una etapa de desnaturalización de 10 min a 95°C, la amplificación se efectuó con la ayuda de 40 ciclos de un protocolo PCR "touch-down" (10 s a 95°C, 10 s de hibridación a 68-58°C, seguido de una extensión de 16 s a 72°C). Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por el SYBR Green.

Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos PCR fueron objeto sistemáticamente de un análisis de la curva de fusión (LightCycler™ - Roche). Por ello, los productos PCR se trataron a una temperatura creciente de 58 a 98 °C con un incremento de 0,1°C/s. Para cada producto PCR, se obtuvo un solo pico durante el análisis de la curva, caracterizado por una temperatura de fusión específica.

La combinación de cebadores necesarios para la cuantificación del gen constitutivo CPB se suministró por Search-LC (Heidelberg, Alemania; referencia 488116).

La cantidad de ARNm diana con relación a la cantidad de ARNm del gen constitutivo ciclofilina B se analizó mediante la técnica de cuantificación relativa con el LightCycler Relative Quantification Software™ (Roche Molecular Biochemicals). El "Second Derivative Maximum Method" del programa LightCycler™ (Roche) se usó para determinar automáticamente el "Crossing Point" (Cp) para cada muestra. El valor de Cp se definió como el número de ciclos para el cual la fluorescencia fue significativamente diferente del ruido de fondo.

Se realizaron cinco diluciones en serie al 1/10 en cuadruplicado con cada estándar con el fin de generar una curva de calibración que expresa el Cp en función del logaritmo del número de copias. Las diluciones estándares se optimizaron a fin de que la curva de calibración cubra el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen constitutivo. Las curvas estándares relativas que describen la eficacia de PCR para el gen diana y el gen constitutivo se generaron y se usaron para realizar la cuantificación con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals).

Resultados de análisis univariados y multivariados

Para determinar las variables que tienen una influencia sobre la aparición de una infección nosocomial, se realizó un análisis univariado y después un análisis multivariado. El análisis univariado se realiza efectuando una regresión

- 5 logística del estado alcanzado o no alcanzado por una infección nosocomial en función de variables diferentes y para el marcador S100A9 en ARNm en los días D7 a D10 después del comienzo del choque séptico. Después, se realiza una regresión logística multivariada en las variables que presentan un nivel significativo (p) < 0,15 con el análisis univariado. El método de selección "retrospectivo" (al inicio, todas las variables se toman en cuenta en el modelo, después se retiran una por una) se usa con un umbral de importancia en 0,05. Los resultados se presentan en la Tabla 3 siguiente. La relación de probabilidades (O.R.) y su intervalo de confianza al 95% se muestran para cada resultado.

Tabla 3

		Análisis univariado (N=93)			Análisis multivariado (N= 93)		
		OR	CI al 95%	P	OR	CI al 95%	P
Sexo	Masculino	1	-	-			
	Femenino	1,6	0,641-3,997	0,3143			
Edad (años)	> 65	1	-	-	-	-	-
	≤ 65	2,04	0,814-5,115	0,1285	-	-	0,1186
SAPS II en la admisión	> 51	1	-	-			
	≤ 51	1,107	0,450-2,723	0,8246			
SOFA en la admisión	<10	1	-	-	-	-	-
	≥10	3,036	1,132-8,144	0,0274	-	-	0,1384
Co-morbilidades	0	1	-	-			
	≥1	1,021	0,414-2,514	0,9645			
Tipo de infección	Nosocomial	1	-	-			
	Comunitaria	1,144	0,467-2,803	0,7682			
Sitio de infección	Pulmonar	1	-	-			
	Abdominal	1,735	0,644-4,672	0,3268			
	Otros	1,172	0,299-4,597	0,8540			
S100A9 (ARNm)	< 6,1	1	-	-	1	-	-
	≥ 6,1	6,27	1,718-22,891	0,0055	6,242	1,662-23,447	0,0067

10 OR: Relación de probabilidades

CI: Intervalo de confianza

P: Umbral de importancia

- 15 Como destaca de la Tabla 3, el análisis multivariado revela que la expresión del marcador S100A9 $\geq 6,1$ en los días 7 a 10 después del inicio del choque séptico incrementa significativamente la probabilidad de aparición de una infección nosocomial (relación de probabilidades en 6,2).

- 20 Ejemplo 5. Estudio de correlación de expresión del gen S100A9 y de expresión del gen S100A8

Muestras

- 25 El estudio se realizó sobre un conjunto de 86 pacientes, que han desarrollado un choque séptico, y admitidos en una unidad de reanimación quirúrgica o médica del centro hospitalario Lyon-Sud. Se extrajeron muestras de estos pacientes en D7, D8, D9 o D10 después del choque séptico (siendo H0 el inicio del tratamiento vasopresor).

Extracción de los ARN y síntesis de los ADNc

Para cada paciente, la muestra biológica es una extracción sanguínea, que se tomó diariamente durante los primeros 10 días después del inicio del síndrome séptico (pacientes SEP). Estas muestras se recogieron directamente en tubos PAXgene™ Blood RNA (PreAnalytiX, Franklin Lakes, USA).

Después de la etapa de extracción sanguínea y con el fin de obtener una lisis completa de las células, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas y después se conservaron a -20°C hasta la extracción del material biológico. Más precisamente, en este protocolo, los ARNs totales se extrajeron por medio de kits PAXgene Blood RNA® (PreAnalytiX) respetando las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los tubos se centrifugaron (10 min en 3000 g) para obtener un residuo de ácidos nucleicos. Este residuo se lavó y se recogió en un tampón que contenía proteinasa K necesaria para la digestión de las proteínas (10 min a 55°C). Se efectuó una nueva centrifugación (5 min a 19000 g) para eliminar los restos celulares, y se añadió etanol con el fin de optimizar las condiciones de fijación de los ácidos nucleicos. Los ARN totales se fijaron específicamente en columnas PAXgene RNA spin column™ y, antes de la elución de éstos, se efectuó una digestión del ADN contaminante con la ayuda del RNase free DNase set™ (Qiagen Ltd, Crawley, RU).

Para cada extracción, la calidad de los ARN totales se verificó por electroforesis capilar utilizando el kit RNA 6000 Nano Chip™ (Agilent technologies). El instrumento utilizado es el bioanalyser 2100™. Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa (RT) en un volumen final de 20 µl. El ARN total (0,5 µg) se mezcló con 1 µl de oligo (dT) 50 µM y 1 µl de tampón de recodido y después se incubó durante 5 min a 65°C. Después del enfriamiento en hielo, la solución se mezcló con 10 µl de 2x First Strand Reaction Mix y 2 µl de SuperScript III/RNase out enzyme Mix RT (15 U/µl), procediendo todos estos productos del SuperScript First Strand Synthesis Super Mix™ RT-PCR system (Invitrogen). Se efectuó la transcripción inversa durante 50 min a 50°C y después se detuvo por incubación durante 5 min a 85°C. Para finalizar, cada solución de ADNc se diluyó al 1/10 en agua DEPC.

Preparación de intervalos de referencia de cuantificación

A partir de un grupo de ADNc obtenido de sujetos sanos, se realizó la amplificación de la región 153-179 del gen diana S100A9 (GenBank nº NM_002965.3) por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), conducida hasta saturación, usando el siguiente par de cebadores:

Cebador sentido: 5'-TCAAAGAGCTGGTGCAGAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador antisentido: 5'-AACTCCTCGAAGCTCAGCTG-3' (SEQ ID NO: 2)

A partir de un grupo de ADNc que proviene de sujetos sanos, se realizó la amplificación de la región 129-280 del gen diana S100A8 (GenBank nº NM_002964.3) por PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa), conducida hasta saturación, usando el siguiente par de cebadores:

Cebador sentido: 5'-ATTTCATGCCGTCTACAGG-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador antisentido: 5'-CACCAGAATGAGGAACTCCT-3' (SEQ ID NO: 4)

Análisis de la expresión de los ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real

Los ARNm de los genes diana S100A9 y S100A8 retranscritos en ADNc, como se han descrito anteriormente, se cuantificaron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el LightCycler™ 2.0 (Roche). Las reacciones PCR se efectuaron usando el kit Fast-Start™ DNA Master SYBR Green I real-time PCR (Roche Molecular Biochemicals). Cada PCR se efectuó en un volumen final de 20 µl que contenía 3,6 µl de agua, 2,4 µl de MgCl₂, 2 µl de mezcla SYBR Green (Fast start DNA master SYBR Green + Taq DNA polymerase) y 1 µl de cada cebador (10 µM) y 10 µl de solución ADNc. Los cebadores utilizados son los descritos anteriormente. Después de una etapa de desnaturalización de 10 min a 95°C, la amplificación se efectuó con la ayuda de 40 ciclos de un protocolo PCR "touch-down" (10 s a 95°C, 10 s de hibridación a 68-58°C (0,5°C/ciclo), siguiendo de una extensión de 16 s a 72°C). Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por el SYBR Green.

Para confirmar la especificidad de amplificación, los productos PCR fueron objeto sistemáticamente de un análisis de la curva de fusión (LightCycler™ 2.0 - Roche). Por ello, los productos PCR se trataron a una temperatura creciente de 58 a 98 °C con un incremento de 0,1°C/s. Para cada producto PCR, se obtuvo un solo pico durante el análisis de la curva, caracterizado por una temperatura de fusión específica.

La combinación de cebadores necesarios para la cuantificación del gen constitutivo CPB se suministró por Search-LC (Heidelberg, Alemania; referencia 488116).

La cantidad de ARNm diana con relación a la cantidad de ARNm del gen constitutivo ciclofilina B se analizó mediante la técnica de cuantificación relativa con el LightCycler Relative Quantification Software™ (Roche Molecular Biochemicals). El "Second Derivative Maximum Method" del software LightCycler™ (Roche) se utilizó

para determinar automáticamente el "Crossing Point" (Cp) para cada muestra. El valor de Cp se definió como el número de ciclos para el cual la fluorescencia fue significativamente diferente del ruido de fondo.

Se realizaron cinco diluciones en serie en 1/10 en cuadruplicado con cada estándar con el fin de generar una curva de calibración que expresa el Cp en función del logaritmo del número de copias. Las diluciones estándares se optimizaron a fin de que las curvas de calibración cubran el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen constitutivo. Las curvas estándares relativas que describen la eficacia de PCR para el gen diana y el gen constitutivo se generaron y usaron para realizar la cuantificación con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals).

Análisis de los resultados

A fin de determinar si la expresión del gen S100A9 está correlacionada con la expresión del gen S100A8, se realizó un análisis de correlación. Los resultados dados en la Figura 1 muestran que existe una fuerte correlación entre las expresiones del gen de estas dos moléculas, con un coeficiente Spearman > 0,90. Las expresiones génicas de las moléculas S100A9 y S100A8 por lo tanto poseen una capacidad similar para discriminar los pacientes susceptibles de contraer una infección nosocomial y para establecer un pronóstico de la evolución del síndrome séptico.

Referencias bibliográficas

- [1] M.M. Levy, M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohén, S.M. Opal, J.L. Vincent y G. Ramsay, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, Crit. Care Med. 31 (2003), p. 1250-1256 .
- [2] Boom R. *et al.*, J. Clin. Microbiol., 1990, No. 28(3), p. 495-503.
- [4] Kricka *et al.*, Clinical Chemistry, 1999, No. 45(4), p. 453-458.
- [5] Keller G.H. *et al.*, DNA Probes, 2º Ed., Stockton Press, 1993, secciones 5 y 6, p. 173-249.
- [6] Bustin SA Journal of molecular endocrinology, 2002, 29: 23-39.
- [7] Giulietti A Methods, 2001, 25: 386-401.
- [8] Porter RR, 1959, Biochem. J. 73: 119-126.
- [9] Nisonoff A. *et al.*, 1960, Science, 132: 1770-1771.
- [10] Skerra A., 1993, Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262.
- [11] Huston P. *et al.*, 1988, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883.
- [12] Fluss R., Faraggi D., Reiser B. (2005), "Estimation of the Youden index and its associated cutoff point". Biometrical Journal, 47: 458-72.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux
HOSPICES CIVILS DE LYON

<120> Métodos para determinar la susceptibilidad de contraer una infección nosocomial en un paciente y para establecer el pronóstico de la evolución del síndrome séptico

<130> S100

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> Cebador 1
 5 <400> 1
 tcaaagagct ggtgcgaaaa 20
 10 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Cebador 2
 <400> 2
 aactcctcga agctcagctg 20
 25 <210> 3
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> S100A8
 <400> 3
 40 atttccatgc cgtctacagg 20
 <210> 4
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> S100A8
 <400> 4
 55 caccagaatg aggaactcct 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la susceptibilidad de un paciente de contraer una infección nosocomial en el que:
 - 5 a) se dispone de una muestra biológica de un paciente y se extrae el material biológico de la muestra biológica
 - b) se dispone de al menos un reactivo específico de un producto de expresión de al menos un gen diana que es el gen S100A9
 - 10 c) se determina la expresión del gen diana S100A9, siendo una sobreexpresión con relación a un valor límite determinado, una indicación de una susceptibilidad de contraer una infección nosocomial.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa c), se determina además la expresión del gen diana S100A8, siendo una sobreexpresión del gen diana S100A8 con respecto a un valor límite determinado, una
15 indicación de una susceptibilidad de contraer una infección nosocomial.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra biológica se extrajo en un paciente que presenta una respuesta sistémica inflamatoria asociada o no a una infección.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra biológica es una muestra sanguínea.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el material biológico es un ácido nucleico o una proteína.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el reactivo específico del producto de expresión del gen S100A9 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana S100A9.
25
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el reactivo específico del producto de expresión del gen S100A8 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana S100A8.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el reactivo específico del producto de expresión del gen S100A9 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana S100A9.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el reactivo específico del producto de expresión del gen S100A8 comprende al menos una sonda de hibridación específica para el gen diana S100A8.
35
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el reactivo específico del producto de expresión del gen S100A9 comprende al menos un anticuerpo específico para la molécula S100A9.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el reactivo específico del producto de expresión del gen S100A8 comprende al menos un anticuerpo específico para la molécula S100A8.
40

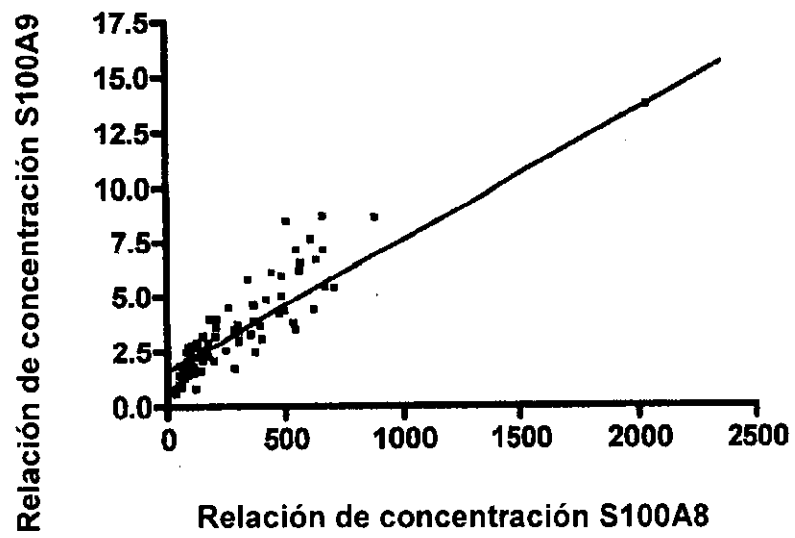


FIGURA 1

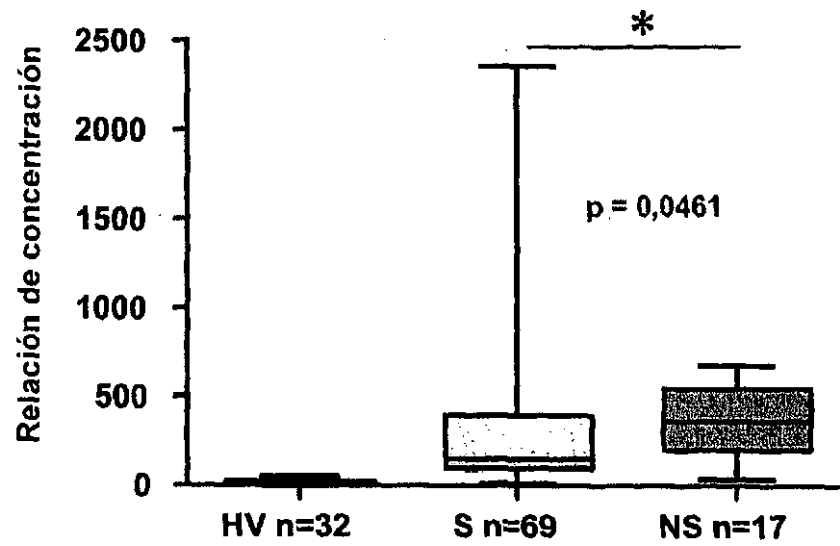


FIGURA 2