

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 807**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/96** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013 E 13719912 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2828657**

54 Título: **Procedimiento de determinación de susceptibilidad a las infecciones nosocomiales**

30 Prioridad:

**23.03.2012 FR 1252641**

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

**10.06.2016**

73 Titular/es:

**HOSPICES CIVILS DE LYON (50.0%)  
3, Quai des Célestins  
69229 Lyon Cedex 02, FR y  
BIOMÉRIEUX (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEPAPE, ALAIN;  
VENET, FABIENNE;  
VILLARS, ASTRID y  
MONNERET, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 573 807 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

Procedimiento de determinación de susceptibilidad a las infecciones nosocomiales

5 La presente invención se refiere al campo médico en general, y en particular el campo de la reanimación.

Más precisamente, la invención se refiere a un procedimiento de determinación de la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS, en particular en un  
10 paciente en estado séptico, en concreto grave, y preferentemente en un paciente en choque séptico.

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud público importante. Los pacientes hospitalizados tienen a menudo, por naturaleza, defensas inmunitarias disminuidas o alteradas, debido a patologías que afectan directamente sus competencias inmunitarias, o por su estado general. Estos pacientes, y en particular las personas desnutridas o con edades extremas de la vida (personas mayores, recién nacidos) son especialmente sensibles a las infecciones en general, y en particular a la aparición de infecciones nosocomiales.  
15

El predominio de las infecciones nosocomiales es considerablemente más elevado en las unidades de reanimación que el que se observa en otros sectores hospitalarios. La incidencia importante de las infecciones nosocomiales en este sector se explica por la conjunción deletérea de varios factores de riesgo endógenos: una exposición del paciente a procedimientos invasivos (ventilación artificial, drenaje urinario, cateterismo), la gravedad de los pacientes (así como las comorbilidades asociadas) y los tratamientos (transfusiones múltiples, sedación). Sin embargo a pesar del conjunto de las medidas de higiene y de vigilancia (riesgos exógenos) y la consideración de estos factores de riesgo endógenos, la incidencia de las infecciones nosocomiales permanece estable o disminuye modestamente.  
20

Determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales es por tanto esencial para poder proponer una atención personalizada, e intentar de este modo minimizar los riesgos adicionales de fallecimiento.  
25

Según los inventores, el único marcador inmunológico conocido en la actualidad por estar asociado a una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales es el marcador HLA-DR (Human Leukocyte Antigen- DR) cuya expresión en los monocitos (mHLA-DR) disminuye en los pacientes que desarrollan infecciones nosocomiales. Sin embargo, la expresión de este marcador, desarrollada en citometría de flujo necesita un equipo particular (citómetro de flujo), que no está disponible en las plataformas de biología (uso reservado a laboratorios especializados de hematología o de inmunología) y cuya estandarización de uso no está establecida. Por tanto no se puede realizar la medición de mHLA-DR de manera rutinaria.  
30  
35

Los artículos científicos siguientes describen el marcador HLA-DR como asociado a la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente: Cheron A et al., "diminution de l'expression monocytaire de HLA-DR et risque d'infection hospitalière", Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 2010, 29(5): 368-376;  
40

Landelle C et al., "Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock", Intensive Care Medicine 2010, 36(11): 1859-1866.

La susceptibilidad a las infecciones nosocomiales puede determinarse también mediante la medición combinada de CD4, CD25 y CD127 en la superficie de los linfocitos T: Venet F et al., "Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions", Critical care 2011, 15(5):231;  
45

Venet F et al., "Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients", Intensive Care Medicine 2008, 35(4):678-686.  
50

La solicitud de patente europea FR2941240 A1 (publicada el 23.07.2010) describe un procedimiento de determinación de la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente, basado en la expresión de S100A9.  
55

La solicitud internacional WO2010/082004 A1 (publicada el 22.07.2010) describe un procedimiento de determinación de la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente, basado en la expresión de S100A9 y/o de S100A8.

De este modo, existe una verdadera necesidad de disponer de otros marcadores inmunológicos que permitan prever, fácil y rápidamente, la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales. En efecto, poder identificar los sujetos que corren mayores riesgos de contraer infecciones nosocomiales permitiría reservarles tratamientos preventivos más adaptados y específicos.  
60

Es en este contexto donde la presente invención propone proporcionar un nuevo biomarcador predictivo de un riesgo aumentado de infecciones nosocomiales en un paciente, y en concreto en un paciente hospitalizado en reanimación  
65

y/o que haya sufrido una agresión (cirugía, quemadura, traumatismo...) que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), en particular en un paciente en estado séptico, en concreto grave, y preferentemente en un paciente en choque séptico. El estudio del nivel de expresión de este biomarcador permite de este modo determinar, fácil y rápidamente, la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales y tomar las disposiciones preventivas necesarias.

Según un primer aspecto, la presente invención tiene por tanto por objeto un procedimiento de determinación de la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente, que comprende las etapas siguientes:

- medir la expresión de sCD127 en una muestra biológica procedente de dicho paciente o muestra problema,
- concluir una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales después de la comparación de la expresión de las CD127 con respecto a un valor de referencia.

El procedimiento de determinación de la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales según la invención es por tanto un procedimiento implementado *in vitro* o *ex vivo*.

La sCD127 es la forma soluble o plasmática de la CD127, receptor de la IL-7. La CD127 o cadena alfa del receptor de la IL-7 es una glicoproteína de 75 kDa miembro de la superfamilia de los receptores con factores de crecimiento hematopoyéticos. Se expresa a nivel de la membrana en asociación con la CD132 (cadena  $Y_c$  común) para formar el receptor de la IL-7. Este receptor desempeña un papel importante en la diferenciación, el seguimiento y la proliferación linfocitaria. La CD127 está constituida por una parte extracelular de 219 ácidos aminados (aa), por una parte transmembranal de 25 aa y por una parte intracitoplásmica de 195 aa. La existencia de una forma soluble/plasmática, nombrada sCD127, generada por empalme alternativo del ARNm que codifica la CD127 se describió en 1990 por Goodwin RG et al., Cell, 1990, 23, 9941-951, pero su función biológica permanece a día de hoy mal conocida.

Se entiende por "infección nosocomial", cualquier infección, principalmente bacteriana pero igualmente viral y fúngica, que se produce en un establecimiento de salud en el curso o en el transcurso de una atención (diagnóstica, terapéutica, paliativa, preventiva o educativa), de un paciente, y que no estaba ni presente ni en incubación al inicio de la atención. Cuando no se conoce con precisión el estado infeccioso al inicio de la atención, se acepta habitualmente un plazo de al menos 48 horas o un plazo superior al período de incubación para definir una infección nosocomial.

En el sentido de la invención, se entiende por "respuesta inflamatoria sistémica" o "SIRS", una respuesta que asocia al menos dos de los criterios siguientes: Temperatura  $> 38^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$ , Frecuencia cardíaca  $> 90/\text{minuto}$ , Frecuencia respiratoria  $> 20 / \text{minuto}$  o  $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ , Leucocitos  $> 12.000/\text{mm}^3$  o  $< 4.000/\text{mm}^3$  (Bone et al., Chest, 1992, 1644- 1655).

En el marco de la invención, se entiende por "sCD127" la forma soluble o forma circulante (también nombrada forma plasmática o sérica) del receptor de la IL-7, también nombrada cadena alfa del receptor de la IL-7 o IL7R-ALFA o IL7RA o CDW127, y en particular tal como se describe por Goodwin y al., Cell, 1990, 23, 941-951 y se determina por Crawley et al., Journal of Immunology, 2010, 184, 4679-4687.

En particular, las secuencias de ácidos nucleicos de referencia para sCD127 según la invención son preferentemente las siguientes: Conjunto: ENSG00000168685, HPRD-ID: 00893 Secuencia de nucleótidos: NM\_002185.2. Vega genes: OTTHUMG00000090791.

Por otra parte, las secuencias proteicas de referencia para sCD127 según la invención son preferentemente las siguientes: NP\_002176 XP\_942460; versión: NP\_002176.2 GI:28610151.

La muestra problema en el marco del procedimiento de la invención es una muestra biológica procedente del paciente del que se quiere determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales. En particular, se elige una muestra biológica de este tipo entre los que son susceptibles de contener el marcador sCD127.

La presente invención presenta una aplicación particularmente preferente en los pacientes hospitalizados en reanimación y/o que hayan sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS. Por consiguiente, la muestra biológica implementada en el marco del procedimiento de la invención procede preferentemente de un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión (cirugía, quemadura, traumatismo...) que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), en particular procedente de un paciente en estado séptico, en concreto grave, y en particular procedente de un paciente en choque séptico. De manera particularmente preferente, la muestra biológica implementada en el marco del procedimiento de la invención procede de un paciente en choque séptico.

Según un primer modo de realización preferente, el procedimiento de la invención permite determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales, es decir concluir un riesgo aumentado de desarrollar una infección nosocomial o una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales, cuando se pone de

manifiesto una sobreexpresión de sCD127 en la muestra problema con respecto a un primer valor de referencia.

Por “sobreexpresión”, se entiende un incremento estadísticamente significativo del nivel de expresión.

5 En este modo de realización, el primer valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente de un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS del que se sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial, en concreto de un paciente en estado séptico del que se sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial, y preferentemente de un paciente en choque séptico del que se sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial. En este caso, esta medición de la expresión de sCD127 que constituye el primer valor de referencia se efectúa preferentemente en paralelo, es decir al mismo tiempo que la medición de la expresión de sCD127 que se hace en la muestra procedente del paciente del que se pretende determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales, aunque la toma de la muestra de referencia se haya efectuado anteriormente a la de la muestra problema.

15 Este primer valor de referencia puede corresponder igualmente a un valor medio del nivel de expresión de sCD127 que se mide en un pool de muestras procedente de pacientes hospitalizados en reanimación y/o que hayan sufrido una agresión, como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial, en concreto de pacientes en estado séptico de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial, y preferentemente de pacientes en choque séptico de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial. En este caso, esta medición de la expresión de sCD127 que constituye el primer valor de referencia se efectúa preferentemente previamente a la medición de la expresión de sCD127 que se hace en la muestra procedente del paciente del que se pretende determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales, aunque la toma de las muestras de referencia destinadas para “juntarse en un pool” se haya efectuado anteriormente a la de la muestra problema.

30 En este primer modo de realización preferente, y en concreto para determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales de un paciente en choque séptico, la medición de la expresión de sCD127 en la muestra problema y en caso necesario en la muestra biológica usada para obtener el primer valor de referencia, es decir cuando se obtiene el primer valor de referencia a partir de una muestra biológica, se realiza dentro de los 10 días o a los 10 días (D10) después del choque séptico, preferentemente dentro de los 7 días o a los 7 días (D7) después del choque séptico, de manera aún más preferente dentro de los 4 días o a los 4 días (D4) después del choque séptico, y en particular dentro de los 3 días o a los 3 días (D3) después del choque séptico.

35 Según un segundo modo de realización preferente, el procedimiento de la invención permite determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales, es decir concluir un riesgo aumentado de desarrollar una infección nosocomial o una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales, cuando la expresión de sCD127 que se mide en la muestra problema no disminuye de manera significativa con respecto a un segundo valor de referencia. De manera particularmente preferente, se concluye un riesgo aumentado de desarrollar una infección nosocomial si la expresión de sCD127 que se mide en la muestra problema no disminuye más del 25 %, y en particular no disminuye más del 20 %, con respecto a este segundo valor de referencia.

45 Este segundo valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente del mismo dicho paciente durante una toma anterior, es decir en una muestra biológica que se ha tomado anteriormente con respecto a la muestra problema. Por “anteriormente” o “anterior”, se entiende de manera más precoz en el tiempo o previamente a la toma de la muestra problema.

50 En este segundo modo de realización preferente, y en concreto para determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales de un paciente en choque séptico, la medición de la expresión de sCD127 en la muestra problema se realiza aproximadamente en o a los 10 días (D10) después del choque séptico, de manera preferente aproximadamente en o a los 7 días (D7) después del choque séptico, de manera más preferente aproximadamente en o a los 4 días (D4) después del choque séptico.

55 Se puede efectuar por ejemplo la toma anterior dentro de las o a las 48 h después del choque séptico y al menos 24 h antes de la de la muestra problema, y se efectúa preferentemente la toma anterior dentro de las o a las 48 h después del choque séptico y se efectúa la de la muestra problema dentro de las 48 h posteriores a la toma anterior o a las 48 h después de la toma anterior.

60 De este modo, en todos los casos, antes de la medición de la expresión de sCD127 propiamente dicha en la muestra problema, el procedimiento de la invención puede comprender la obtención previa del valor de referencia, ya sea el primer valor de referencia o bien el segundo valor de referencia, con el que el nivel de expresión que se detectará en la muestra problema podrá compararse con el fin de concluir un riesgo aumentado o no de desarrollar infecciones nosocomiales en el paciente del que procede la muestra problema.

65 Por tanto se compararán estos valores de referencia, ya sea el primer valor de referencia o bien el segundo valor de referencia, obtenidos previamente o al mismo tiempo, con el valor de la expresión de sCD127 que se mide en la

muestra problema.

La muestra en la que se implementa el procedimiento de la invención, también nombrada aquí muestra problema, puede ser de origen animal o humano, y preferentemente humano.

5 Por consiguiente, la muestra problema puede ser de diferentes naturalezas. En particular, esta muestra es un fluido biológico, elegido por ejemplo entre la sangre, la sangre total (tal como se colecta en la vía venosa, es decir que contiene las células blancas y rojas, las plaquetas y el plasma), el suero, el plasma y el líquido de lavado broncoalveolar.

10 Preferentemente, la muestra problema procedente de dicho paciente es una muestra de plasma o de suero.

15 Las muestras a partir de las que se pueden determinar los valores de referencia, ya sea el primer valor de referencia o el segundo valor de referencia, también nombradas "muestras de referencia", pueden ser de diferentes naturalezas y en concreto de naturaleza biológica tal como se ha mencionado anteriormente tratándose de la muestra problema (fluidos biológicos). Ventajosamente, estas muestras biológicas son de la misma naturaleza que la de la muestra biológica problema o al menos de una naturaleza compatible para constituir una referencia en cuanto a la detección y/o la cuantificación de la expresión de sCD127.

20 Para obtener el primer valor de referencia en particular, estas muestras proceden preferentemente de personas que tienen las mismas características o una mayoría de características comunes, en concreto del mismo sexo y/o de una edad similar o idéntica y/o de mismo origen étnico, con las del sujeto o paciente del que se quiere determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales. En este caso la muestra de referencia puede estar constituida igualmente por cualquier muestra, biológica o no biológica, que se ha calibrado previamente para contener un valor medio de sCD127 que corresponde al nivel que se ha medido en un pool de muestras biológicas procedentes de  
25 pacientes, hospitalizados en reanimación y/o que hayan sufrido una agresión, como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial, en concreto de pacientes en estado séptico de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial, y preferentemente de pacientes en choque séptico de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial. En este caso, y según una variante particularmente preferente, la muestra de referencia procede de uno o de pacientes en choque séptico del(de los) que se sabe que no ha(n) desarrollado una infección nosocomial.

30 Para obtener el segundo valor de referencia en particular, la muestra de referencia es una muestra biológica procedente del mismo dicho paciente, es decir del paciente del que se quiere determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales y del que procede la muestra problema, pero obtenida a partir de una toma anterior, es decir de una muestra biológica que se ha tomado previamente en el tiempo con respecto a la muestra problema.

40 En el sentido de la presente invención, se entiende por el término "medir la expresión" una medición *in vitro* o *ex vivo*. Por otra parte, este término se entiende que designa la detección y la cuantificación de sCD127 a nivel proteico. A tal efecto, se puede usar cualquier método de detección y/o de cuantificación bien conocido por el experto en la materia para la implementación de la invención, ya sea en relación con la determinación de la presencia y/o la medición de la expresión de la proteína sCD127. A modo de ejemplo de método de medición de la expresión de la proteína sCD127, se puede citar en concreto el que se ha descrito por Crawley et al, Journal of  
45 immunology, 2010,184, 4679-4687.

50 En particular, la medición del nivel de expresión de sCD127 se realiza con la ayuda de herramientas o de reactivos que son específicos de sCD127 y que permiten, directa o indirectamente, determinar su presencia y/o cuantificar su nivel de expresión.

Entre las herramientas o reactivos capaz(ces) de detectar y/o cuantificar sCD127, se pueden citar en concreto anticuerpos específicos, policlonales o monoclonales, preferentemente monoclonales, o fragmentos o derivados de los mismos, por ejemplo anticuerpos "single chain" Sv.

55 Entre estas herramientas o reactivos, se preferirán en concreto los que son específicos de la forma soluble del receptor de la IL-7, es decir que no reconocen CD127 que es la forma celular/de membrana no soluble en este receptor. Se pueden usar sin embargo herramientas o reactivos que reconozcan a la vez la forma soluble o sCD127 y la forma celular del receptor de la IL-7 o CD127, siempre que sea posible distinguir estas dos formas mediante otro medio, como por ejemplo la naturaleza de la muestra analizada (por ejemplo, plasma o suero *versus* muestra biológica que contiene células o sangre total).

60 Cuando se realiza la detección y/o la cuantificación de sCD127 a nivel proteico, se pueden usar las técnicas estándar tales como el Western-Blot, ELISA, RIA, IRMA, FIA, CLIA, ECL, citometría de flujo o inmunocitología.

65 De manera particularmente ventajosa, se mide la expresión de sCD127 a nivel proteico, y preferentemente con la ayuda de una técnica ELISA.

Según la invención, y en particular en este modo de realización particular, se mide preferentemente el nivel de expresión de sCD127 con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, monoclonales o policlonales, y en concreto de anticuerpos monoclonales anti-sCD127. A modo de ejemplo, se pueden citar en concreto los anticuerpos monoclonales anti-CD127 humano R34.34 comercializados por la compañía Beckman Coulter® o los anticuerpos policlonales anti-CD127 comercializados por la compañía R&D Systems®.

Todas las indicaciones y preferencias mencionadas anteriormente que se tratan de la medición de la expresión de sCD127 se aplican de manera indiferente ya sea para la medición de esta expresión en la muestra problema y en la muestra de referencia.

Según un segundo aspecto, la presente invención tiene igualmente por objeto el uso de la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 para determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales.

De manera preferente, este uso es particularmente ventajoso para determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales de un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS, en particular de un paciente en estado séptico, en concreto grave, y preferentemente de un paciente en choque séptico. Preferentemente, el uso según la invención permite determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales de un paciente en choque séptico.

Por otra parte, en el marco del uso según la invención, la expresión de sCD127 se mide preferentemente a nivel proteico, y en particular con la ayuda de una técnica ELISA.

En particular, la expresión de SCD127 puede medirse con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, monoclonales o policlonales, y preferentemente de anticuerpos monoclonales anti-sCD127. Se pueden usar igualmente los anticuerpos citados anteriormente para este segundo aspecto de la invención.

Más ampliamente, todos los modos de realización preferentes que se han mencionado anteriormente relacionados con el procedimiento y sus combinaciones constituyen igualmente unos modos de realización preferentes tratándose del uso.

Según un tercer aspecto, la presente invención tiene también por objeto un kit para la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 en una muestra biológica, que comprende:

- unas herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica, y
- una muestra control positiva que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un pool de muestras de pacientes de los que se sabe que han desarrollado una infección nosocomial, y/o una muestra control negativa que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un pool de muestras de pacientes de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial.

De este modo, el kit según la invención comprende unas herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica, y al menos una muestra control.

El kit según la invención permite en particular determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente, y en concreto en un paciente en choque séptico.

Preferentemente, las herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en una muestra biológica que están presentes en el kit de la invención permiten detectar y/o cuantificar la expresión de sCD127, ya sea a nivel proteico o bien a nivel de la actividad de sCD127, y preferentemente a nivel proteico.

Según un modo de realización particularmente preferente, el kit de la invención contiene anticuerpos anti-sCD127, monoclonales o policlonales, y en particular anticuerpos monoclonales.

Otra muestra control positiva puede ser igualmente una muestra procedente de un paciente del que se sabe que ha desarrollado una infección nosocomial. Asimismo, otra muestra control negativa puede ser igualmente una muestra procedente de un paciente del que se sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial. Ya sea para un control positivo o negativo este tipo de muestra control procede preferentemente de uno o de varios paciente(s) hospitalizado(s) en reanimación y/o que haya(n) sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en concreto, de uno o de varios paciente(s) en estado séptico, y preferentemente de uno o de varios paciente(s) en choque séptico. Por ejemplo, el kit puede contener una muestra control negativa procedente de uno o varios paciente(s) hospitalizado(s) en reanimación y/o que haya(n) sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), del(de los) se sabe que no ha(n) desarrollado una infección nosocomial, en particular procedente de uno o de varios paciente(s) en choque séptico del(de los) que se sabe que no ha(n) desarrollado una infección nosocomial.

De manera preferente, el kit comprende a la vez una muestra control positiva y una muestra control negativa, y en particular elegidas cada una entre las muestras calibradas tales como se han definido anteriormente.

La invención abarca igualmente el uso de un kit según la invención para realizar el procedimiento de la invención, y en particular para determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales, preferentemente en un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), en particular en un paciente en estado séptico, en concreto grave, y preferentemente un paciente en choque séptico. Preferentemente, el uso del kit según la invención permite determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente en choque séptico.

Todos los modos de realización preferentes que se han mencionado anteriormente relativos al procedimiento y sus combinaciones constituyen igualmente unos modos de realización preferentes que se tratan del kit según la invención y su uso.

Diversas otras características se ponen de manifiesto en la descripción realizada a continuación con referencia a las figuras adjuntas que muestran, a modo de ejemplos no limitativos, unas formas de realización del objeto de la invención y en las que:

- la **figura 1** representa la concentración de IL-7 plasmática en 35 pacientes en choque séptico a los días 1-2 (1-2) y 3-4 (3-4) y 30 sujetos sanos "HV" (A) y la comparación de estos resultados según los grupos de pacientes "NS" o "S" (figura 1B) y los grupos de pacientes "NI" o "No NI" (figura 1C).  
\*\*  $p < 0,005$  vs. "HV" - U-test Mann Whitney;
- la **figura 2** representa la expresión de CD127 en las células T CD4<sup>+</sup> (figura 2A) y en las células T CD8<sup>+</sup> (figura 2B) en 35 pacientes en choque séptico a los días 1-2 y 3-5 y 30 sujetos sanos "HV".  
\*  $p < 0,05$  vs "HV" - U-test Mann Whitney; §  $p < 0,05$  - evolución en el tiempo en un mismo grupo de pacientes - *Wilcoxon paired t-test*.
- la **figura 3** representa la concentración de sCD127 plasmática en 35 pacientes en choque séptico en los días 1-2 y 3-4 y 30 sujetos sanos (figura 3A) y la comparación de estos resultados según los grupos de pacientes "NS" o "S" (figura 3B) y los grupos de pacientes "NI" o "No NI" (figura 3C).  
#  $p < 0,05$  ##  $p < 0,005$  vs "No NI" - U-test Mann Whitney; §  $p < 0,05$  §§  $p < 0,005$  - evolución en el tiempo en un mismo grupo de pacientes - *Wilcoxon paired t-test*.
- la **figura 4** representa la expresión del marcador HLA-DR en 35 pacientes en choque séptico en los días 1-2 y 3-4 y 30 sujetos sanos según los grupos de pacientes "NI" o "No NI".

## MÉTODOS

### **Medición de la concentración en IL-7 plasmática**

Se ha medido la concentración de IL-7 plasmática gracias a un kit que usa la técnica LUMINEX™ comercializado por la compañía Bio-Rad (Bio- Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assays: BioPlex Pro Reagent kit, Bio-Rad #171-304070 y SinglePlex IL-7) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **Medición de la expresión celular del receptor de la IL-7 (CD127)**

Brevemente, se incuban 50 µl de sangre total en presencia de 5 µl de Ac anti- CD4 acoplado a Ficoeritrina-TexasRed (ECD) (BeckmanCoulter #6604727) o de 5 µl de Ac anti-CD8 acoplado a ECD (BeckmanCoulter #737659) así como 10 µl de Ac anti-CD127 acoplado a la ficoeritrina (PE) (BeckmanCoulter #IM1980U) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. A continuación se lisan los glóbulos rojos gracias a una lisis hipotónica y se fijan las células gracias a una lisis automática realizada en un autómata TQ- Prep (BeckmanCoulter). Por último se mide la expresión de la membrana de la CD127 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo.

### **Dosificación de la forma soluble del receptor de la IL-7 (sCD127) por ELISA**

#### "Coating"

Se ha preparado un tampón de "coating" para contener 0,8 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 g NaN<sub>3</sub> en 500 ml de agua (pH 9,6).

Se han depositado 100 µl de anticuerpos (Ac) de captura (anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD127 humano R34.34, Beckman Coulter®) diluidos en tampón de "coating" por pozo en una placa ([Ac] = 8 µg/mL). A continuación se ha cubierto la placa para incubarse a 4°C durante una noche.

A continuación se ha aspirado el contenido de los pozos y se han lavado los pozos 3 veces con al menos 300 µL de tampón de lavado PBS-Tween<sub>20</sub> 0,05 %. Se ha retirado minuciosamente todo el líquido en cada lavado. Después del último lavado, se ha dado la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar todos los restos de

tampón.

“Blocking”

- 5 Se ha bloqueado la fijación no específica con la ayuda de 150 µl de tampón de bloqueo por pozos (10 % suero de bovino fetal (FBS)/PBS-Tween<sub>20</sub> 0,05 %), luego se ha incubado la placa durante 1 h a 37°C.

De nuevo, se ha aspirado el contenido de los pozos y se han lavado los pozos 3 veces con al menos 300 µL de tampón de lavado PBS-Tween<sub>20</sub> 0,05 %. Se ha retirado minuciosamente todo el líquido en cada lavado. Después del último lavado, se ha dado la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar todos los restos de tampón.

Muestras y controles

- 15 Se ha realizado un rango de calibración con recombinante humano IL-7Rα / CD127 Fc chimera (R&D Systems - Catalog Number: 306-IR) diluido en tampón de dilución PBS 5 % FCS, tal como se describe en la **tabla 1** a continuación y conforme a C. Janot-Sardet et al. *Journal of Immunological Methods*, 2010, 28, 115-123.

**Tabla 1**

	rh IL-7Rα / CD127 Fc chimera							
[c] (ng/mL)	500	250	125	62,5	31,25	15,7	7,85	0
Diluyente (µL)	0	100	100	100	100	100	100	100
Solución a 500 ng/mL (µL)	100	100	Diluciones sucesivas					0

20 Se han añadido 100 µl de muestra o de control (solución de CD127 Fc chimera reconstituida extemporáneamente y alicotada a unas concentraciones de 60 ng/ml y 10ng/ml) en cada pozo, luego se ha incubado la placa durante 1 h a 37°C.

25 De nuevo, se ha aspirado el contenido de los pozos y los pozos se han lavado 3 veces con al menos 300 µL de tampón de lavado PBS-Tween<sub>20</sub> 0,05 %. Todo el líquido se ha retirado minuciosamente en cada lavado. Después del último lavado, se ha dado la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar todos los restos de tampón.

30 Anticuerpos de detección

Se han añadido 100 µl de anticuerpos de detección (anticuerpos de cabra policlonal anti- CD127 biotinilados reconstituidos con 1 mL de TBS-BSA 1 %, R&D Systems®) diluidos en PBS/5 %FBS en cada pozo ([Ac] = 200 ng/mL), luego se ha incubado la placa durante 1 h a 37°C.

35 De nuevo, se ha aspirado el contenido de los pozos y se han lavado los pozos 3 veces con al menos 300 µL de tampón de lavado PBS-Tween<sub>20</sub> 0,05 %. Se ha retirado minuciosamente todo el líquido en cada lavado. Después del último lavado, se ha dado la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar todos los restos de tampón.

40 Revelación

Se han añadido 100 µL de Estreptavidina-HRP en cada pozo ([Estreptavidina-HRP] = 8 µL/mL). A continuación se ha cubierto la placa para incubarse durante 30 min a temperatura ambiente.

45 De nuevo, se ha aspirado el contenido de los pozos y se han lavado los pozos 3 veces con al menos 300 µL de tampón de lavado PBS-Tween<sub>20</sub> 0,05 %. Se ha retirado minuciosamente todo el líquido en cada lavado. Después del último lavado, se ha dado la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar todos los restos de tampón. En esta etapa de lavado, se han empapado los pozos con el tampón de lavado de 1 a 2 min antes de la aspiración.

50 Se han mezclado los dos frascos de la solución de sustrato colorimétrico TM B (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, bioMérieux #XX7LF1UC) volumen a volumen. Se han depositado 100 µL de esta solución de sustrato en cada pozo. A continuación se ha cubierto la placa para incubarse durante 30 min a temperatura ambiente.

55 Por último, se ha efectuado la lectura de la placa mediante medición de la absorbencia a 450 nm.

**Medición de la expresión monocitaria de HLA-DR**

60 Se ha realizado la medición mediante la técnica de citometría de flujo, con la ayuda de un marcado directo en sangre

total tomada con EDTA.

Se han incubado los dos anticuerpos siguientes con 50 µL de sangre total (30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad):

- 5 µL de anticuerpos anti-CD14, acoplados a fluoresceína (Beckman Coulter Immunotech, - Ref.: IM0645), que permiten identificar los monocitos entre los leucocitos)
- 10 µL de anticuerpos anti-HLA-DR, acoplados a ficoeritrina (Becton Dickinson - Ref.: 347401), que permiten cuantificar la expresión de HLA-DR en la superficie de las células.

A continuación se han eliminado los glóbulos rojos: lisis mediante adición de 1 ml de solución de lisis (comercializada por la compañía Becton Dickinson con la referencia 349202) diluida (1/10) (15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad).

A continuación se han analizado las células en un citómetro de flujo (FC500 - Beckman Coulter).

Los resultados se expresan en % de células positivas, definiéndose el umbral de positividad gracias a un control isotípico (Mouse IgG2a PE Becton Dickinson - Ref.: 349053).

## RESULTADOS

Se han tomado muestras de plasma en 35 pacientes en choque séptico a los días 1-2 (D1-2) y 3-4 (D3-4) después de choque séptico, luego se han almacenado (cohorte retrospectiva). Se han medido diferentes parámetros o marcadores tales como las concentraciones de IL-7 y de sCD127 plasmáticas, y la expresión de CD127 en las células T CD4<sup>+</sup>, y la expresión de HLA-DR en los monocitos. A los 28 días después de admisión en reanimación por choque séptico, 13 pacientes no han sobrevivido ("NS") es decir el 37 % mientras que 22 pacientes han sobrevivido ("S") sobre los 35 pacientes. Por otra parte, 6 pacientes han contraído una infección nosocomial ("NI") es decir el 17 %, mientras que 29 pacientes han permanecido libres de cualquier episodio nosocomial ("No NI").

Se han efectuado igualmente las mismas mediciones en 30 sujetos sanos voluntarios (HV).

Se han comparado los resultados obtenidos con la ayuda de un test U Mann Whitney dentro de estas diferentes poblaciones de sujetos o pacientes y se agrupan en las figuras 1 a 4 adjuntos.

Estos resultados muestran que la concentración de IL-7 plasmática ha disminuido de manera significativa (a D1-2), pero esto no es significativo a D3-4 en los pacientes que desarrollan una infección secundaria con respecto a los pacientes que no han tenido ningún episodio nosocomial (figura 1C), mientras que permanece inalterada entre los pacientes supervivientes "S" o no-supervivientes "NS".

Además, la expresión celular del receptor de la IL-7 (CD127) se conserva después de choque séptico (figura 2A y 2B), y sin ninguna diferencia entre los pacientes supervivientes "S" o no-supervivientes "NS" o los pacientes que han desarrollado una infección nosocomial "NI" o no "No NI" (resultados no representados).

El incremento ligero de la concentración plasmática de la forma soluble del receptor de la IL-7 o sCD127 observado al inicio del choque séptico no es significativo estadísticamente y vuelve a valores "normales" con el tiempo (figura 3A).

En cambio, mientras que la concentración plasmática de sCD127 permanece inalterada entre los pacientes supervivientes "S" o no-supervivientes "NS" (figura 3B), se observa un incremento marcado de la concentración plasmática de sCD127 en los pacientes "NI" que han presentado una infección nosocomial con respecto a los pacientes "No NI" que no han contraído una infección nosocomial (figura 3C).

Por otra parte, se observa igualmente que la concentración plasmática de la sCD127 no evoluciona en el tiempo (entre D1-2 y D3-4) en los pacientes "NI" que han presentado una infección nosocomial, a diferencia de los pacientes "No NI" que no han contraído una infección nosocomial (figura 3C).

A modo de comparación, el estudio de la expresión del marcador de la técnica anterior HLA-DR en la misma cohorte de pacientes no ha permitido poner de manifiesto la disminución de la expresión de este marcador entre los pacientes "NI" que han presentado una infección nosocomial y los pacientes "No NI" que no han contraído una infección nosocomial (figura 4), a diferencia de lo que se establece claramente en la técnica anterior.

Esta diferencia, probablemente relacionada con el tamaño de la cohorte actualmente estudiada que es menor con respecto al de las cohortes analizadas en los estudios de la técnica anterior, permite poner de manifiesto la pertinencia del marcador sCD127 con respecto a HLA-DR. En efecto, a pesar del tamaño de la cohorte que se ha estudiado aquí, los resultados muestran que el estudio de la expresión de sCD127 según la invención es informativo en cuanto a la susceptibilidad de los pacientes a las infecciones nosocomiales.

5 En consecuencia, el conjunto de estos resultados demuestran que la medición de la expresión de SCD127 es un marcador inmunológico útil para determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales, y en particular de los pacientes hospitalizados en reanimación y/o que hayan sufrido una agresión (cirugía, quemadura, traumatismo...) que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), y en particular de los pacientes en estado séptico, en concreto grave, y preferentemente de los pacientes en choque séptico.

La invención no se limita a los ejemplos descritos y representados porque se pueden aportar a ellos diversas modificaciones sin salirse de su marco.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de determinación de la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente, que comprende las etapas siguientes:
  - 5 - medir la expresión de sCD127 en una muestra biológica procedente de dicho paciente o muestra problema,
  - concluir una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales después de la comparación de la expresión de CD127 con respecto a un valor de referencia.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra biológica procede de un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, como cirugía, quemadura, traumatismo..., que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS, en particular procedente de un paciente en estado séptico, en concreto grave.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la muestra biológica procede de un paciente en choque séptico.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se concluye una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales cuando se pone de manifiesto una sobreexpresión de sCD127 en la muestra problema con respecto a un primer valor de referencia y por que el primer valor de referencia
  - 20 corresponde al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente de un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura o traumatismo, que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS del que se sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial, en concreto de un paciente en estado séptico del que se sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial, o bien corresponde a un valor medio del nivel de expresión de sCD127 que se mide en un pool de
    - 25 muestras procedente de pacientes de este tipo.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que el primer valor de referencia corresponde al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente de un paciente en choque séptico del que se
  - 30 sabe que no ha desarrollado una infección nosocomial, o bien corresponde a un valor medio del nivel de expresión de sCD127 que se mide en un pool de muestras procedente de pacientes de este tipo.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que la medición de la expresión de sCD127 en la muestra problema y en caso necesario en la muestra biológica usada para obtener el
  - 35 primer valor de referencia dentro de los 10 días o a los 10 días (D10) después del choque séptico, preferentemente dentro de los 7 días o a los 7 días (D7) después del choque séptico, de manera aún más preferente dentro de los 4 días o a los 4 días (D4) después del choque séptico, y en particular dentro de los 3 días o a los 3 días (D3) después del choque séptico.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se concluye una susceptibilidad aumentada a las infecciones nosocomiales cuando la expresión de sCD127 que se mide en la
  - 40 muestra problema no disminuye de manera significativa con respecto a un segundo valor de referencia, preferentemente cuando la expresión de sCD127 que se mide en la muestra problema no disminuye más del 25 %, y preferentemente no disminuye más del 20 %, con respecto a este segundo valor de referencia y por que el segundo
    - 45 valor de referencia corresponde al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente del mismo dicho paciente durante una toma anterior, es decir en una muestra biológica que se ha tomado anteriormente con respecto a la muestra problema.
8. Procedimiento según la reivindicación 3 o 7, caracterizado por que la medición de la expresión de sCD127 en la
  - 50 muestra problema se realiza aproximadamente en o a los 10 días (D10) después del choque séptico, de manera preferente aproximadamente en o a los 7 días (D7) después del choque séptico, de manera más preferente aproximadamente en o a los 4 días (D4) después del choque séptico.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que es conforme a la reivindicación 7 y por que la toma
  - 55 anterior se efectúa dentro de las o a las 48 h después del choque séptico y al menos 24 h antes de la de la muestra problema.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que la toma anterior se efectúa dentro de las o a las
  - 60 48 h después del choque séptico y la de la muestra problema se efectúa dentro de las 48 h posteriores a la toma anterior o a las 48 h después de la toma anterior.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la muestra
  - problema procedente de dicho paciente es una muestra de plasma o de suero.
- 65 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la expresión de sCD127 se mide a nivel proteico, preferentemente con la ayuda de una técnica ELISA.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la expresión de sCD127 se mide con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, y en concreto de anticuerpos monoclonales anti-sCD127.
- 5 14. Uso de la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 para determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales.
- 10 15. Uso según la reivindicación 14, caracterizado por que dicho paciente es un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, como cirugía, quemadura, traumatismo, que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), en particular de un paciente en estado séptico, en concreto grave.
- 15 16. Uso según la reivindicación 15, caracterizado por que dicho paciente es un paciente en choque séptico.
17. Uso según la reivindicación 15 o 16, caracterizado por que la expresión de sCD127 se mide a nivel proteico, preferentemente con la ayuda de una técnica ELISA.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizado por que la expresión de sCD127 se mide con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, preferentemente de anticuerpos monoclonales anti-sCD127.
- 20 19. Kit para la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 en una muestra biológica, que comprende:
- unas herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica, y
  - una muestra control positiva que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un pool de muestras de pacientes de los que se sabe que han desarrollado una infección nosocomial, y/o una muestra control negativa que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un pool de muestras de pacientes de los que se sabe que no han desarrollado una infección nosocomial.
- 25
- 30 20. Kit según la reivindicación 19, caracterizado por que dichas herramientas o reactivos específicos permiten detectar y/o cuantificar la expresión de sCD127, y preferentemente a nivel proteico.
- 35 21. Uso de un kit tal como se define en la reivindicación 19 o 20 para determinar la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales, siendo dicho paciente un paciente hospitalizado en reanimación y/o que haya sufrido una agresión, como cirugía, quemadura, traumatismo, que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).
22. Uso de un kit según la reivindicación 21 para determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales en un paciente en choque séptico.

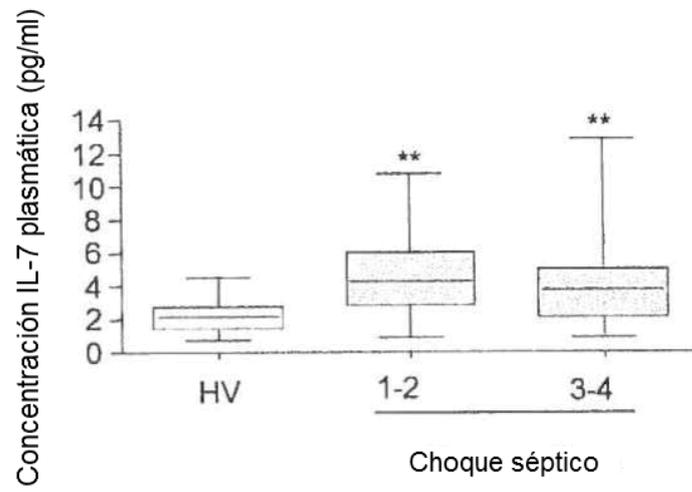


FIG. 1A

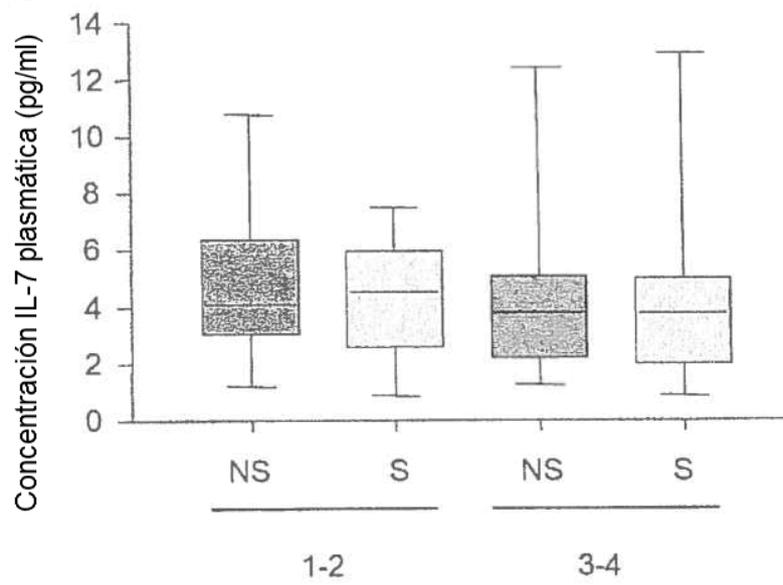


FIG. 1B

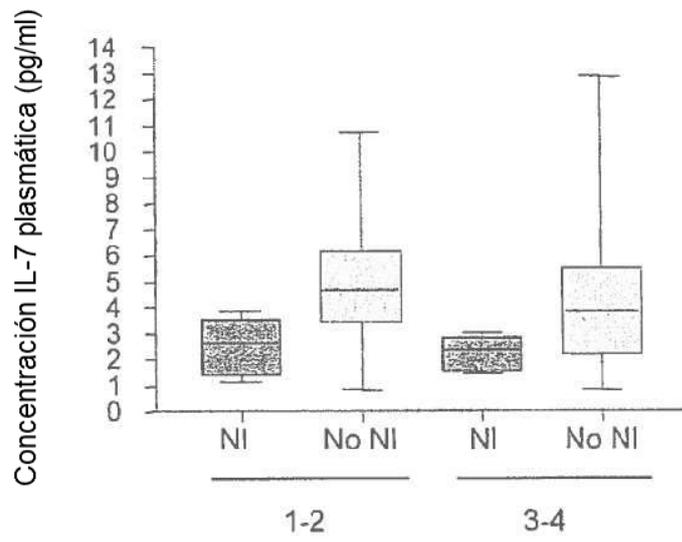


FIG. 1C

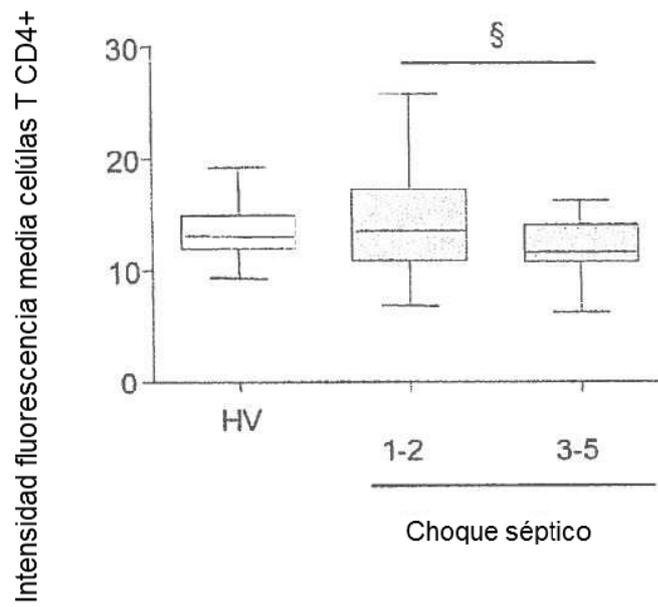


FIG. 2A

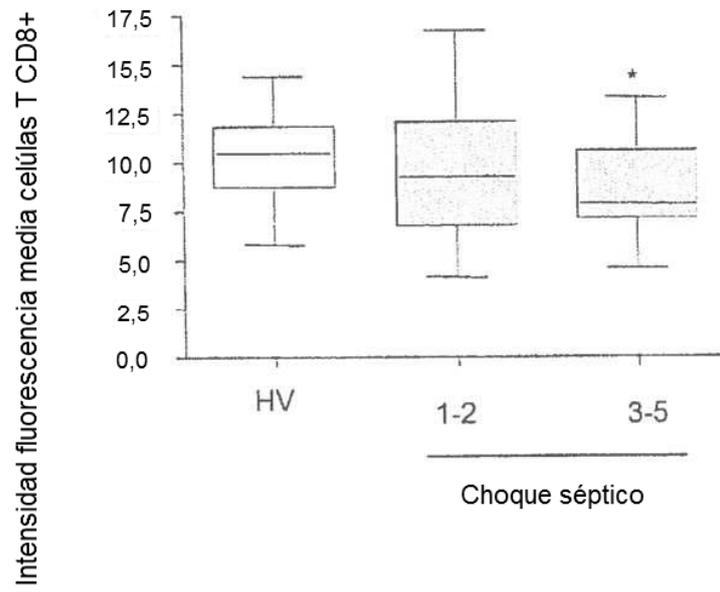


FIG. 2B

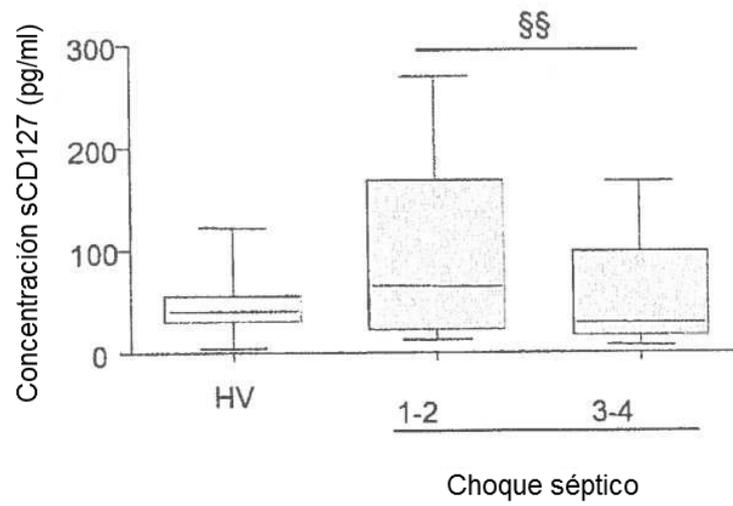


FIG. 3A

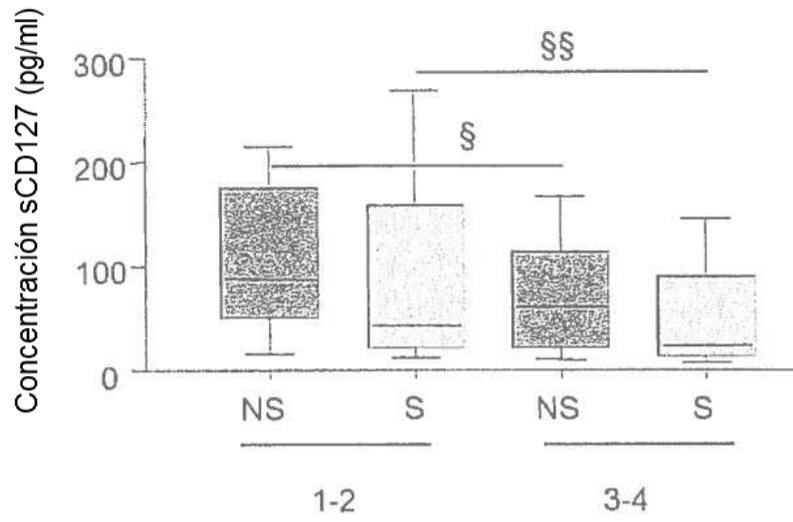


FIG. 3B

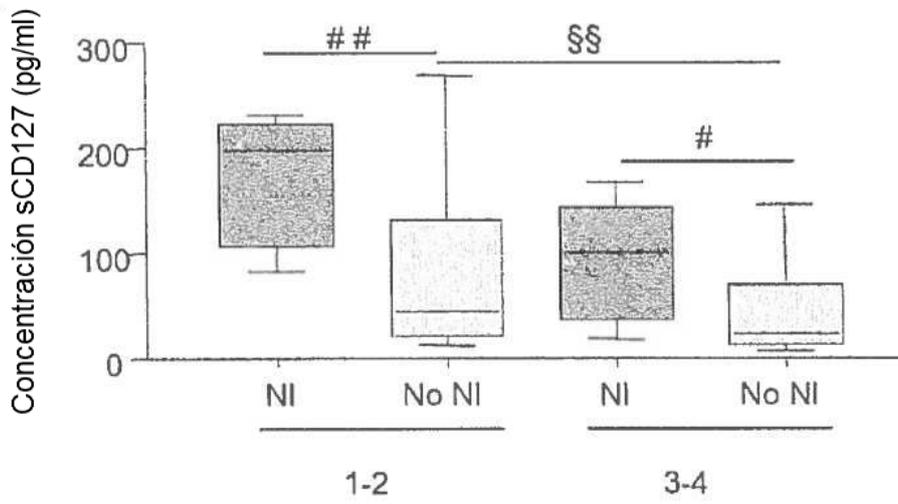


FIG. 3C

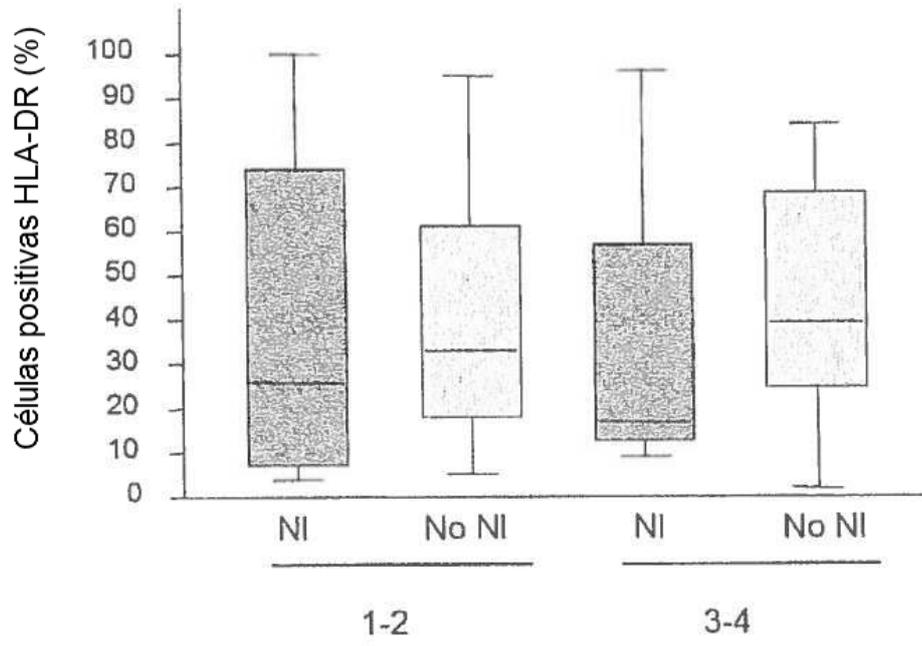


FIG. 4