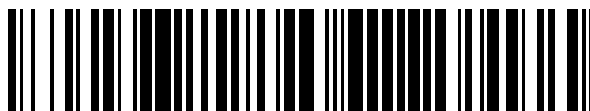


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 627**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2016 PCT/FR2016/051098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16181066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2016 E 16729013 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3295178**

54 Título: **Predicción del riesgo de desarrollar, para pacientes admitidos en servicio de reanimación, una infección diseminada**

30 Prioridad:

12.05.2015 FR 1554227

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (33.3%)
69280 Marcy-l'Étoile, FR;
HOSPICES CIVILS DE LYON (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
NANTES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ALLAOUCHICHE, BERNARD;
ASEHNOUNE, KARIM;
DUPIN, MARILYNE;
FORTIN, TANGUY;
GOUEL-CHERON, AURÉLIE;
LARUE-TRIOLET, AUDREY;
MONNERET, GUILLAUME;
PACHOT, ALEXANDRE;
PONS, SYLVIE;
ROQUILLY, ANTOINE y
VENET, FABIENNE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 750 627 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

Predicción del riesgo de desarrollar, para pacientes admitidos en servicio de reanimación, una infección diseminada

5 La presente invención se refiere al campo de las enfermedades infecciosas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método de predicción del riesgo de desarrollar, para pacientes admitidos en servicio de reanimación, una infección diseminada, o síndrome séptico, mediante la utilización de la gelsolina como biomarcador.

10 El síndrome séptico, respuesta sistémica a una infección, también denominado infección diseminada, representa una de las primeras causas de mortalidad en los servicios de reanimación. En efecto, los pacientes atendidos en los servicios de reanimación son pacientes vulnerables que presentan o susceptibles de presentar una o varias insuficiencias viscerales agudas que comprometen directamente su pronóstico vital. Las causas que pueden conducir a un paciente a reanimación son numerosas: estado de choque, politraumatismos, comas, insuficiencias orgánicas agudas, descompensaciones de enfermedades crónicas, hemorragias, intoxicaciones, infecciones severas, quemaduras extendidas, periodo post-operatorio de cirugías mayores, etc. De manera general, los
15 pacientes que requieren cuidados de reanimación padecen insuficiencias orgánicas, tales como inestabilidad hemodinámica (hipotensión/hipertensión), dificultad respiratoria, insuficiencia renal aguda, trastornos graves del ritmo cardiaco, afecciones neurológicas (traumatismo craneal, accidente vascular cerebral, coma), etc. Su asociación, frecuente, se denomina insuficiencia multivisceral. En efecto, es frecuente que uno de estas
20 insuficiencias conlleve a otra, estando la mayoría de los sistemas orgánicos relacionados los unos con los otros.

La estancia en el servicio de reanimación implica una monitorización continua de las funciones vitales y, llegado el caso, el recurso a métodos de sustitución (transfusión de derivados sanguíneos, llenado vascular, ventilación
25 mecánica, catecolaminas, hemodiálisis, circulación extra-corporal, etc.). El objetivo final de la reanimación es la restauración de la homeostasis.

De este modo, los pacientes admitidos en el servicio de reanimación corren el riesgo de contraer una infección nosocomial, de origen bacteriano, viral, micótico o parasitario.

30 Una infección nosocomial se define como una infección contraída en el hospital, es decir que no está presente cuando el paciente es admitido en el medio hospitalario, en el presente caso en el servicio de reanimación, y que se declara como mínimo 48 horas después de la admisión. La infección nosocomial puede afectar a cualquier parte del cuerpo, pero las más frecuentes en reanimación son las neumonías relacionadas con la ventilación mecánica, las
35 infecciones intra-abdominales tras un traumatismo o una intervención quirúrgica, las infecciones del tracto urinario (o UTI) y las bacteriemias relacionadas con los dispositivos intravasculares (Vincent JL, Lancet, 2003; Eggiman P, Chest, 2001).

La prevalencia de las infecciones nosocomiales es claramente más elevada en los servicios de reanimación que las observadas en otros sectores hospitalarios, resultando de la conjunción deletérea de varios factores de riesgo endógenos: una exposición del paciente a procedimientos invasivos (ventilación artificial, sondaje urinario, cateterismo), la gravedad de los pacientes (así como las comorbilidades asociadas) y las terapéuticas (transfusiones múltiples, sedación). Sin embargo, a pesar del conjunto de medidas de higiene y de vigilancia (riesgos exógenos)
40 instalados y de tener en cuenta de estos factores de riesgo endógenos, la incidencia de las infecciones nosocomiales permanece estable o disminuye modestamente a lo largo de los años.

Una infección nosocomial es susceptible de provocar una infección diseminada, o síndrome séptico, que puede evolucionar de la simple sepsis hacia una sepsis severa o incluso hacia un choque séptico.

50 Estos tres síndromes clínicos, sepsis, sepsis severa y choque séptico se han definido, por orden creciente de gravedad, en 1992 por un grupo de expertos (R.C. Bone *et al.*, 1992,):

- la sepsis es así una respuesta sistémica inflamatoria relacionada con una infección,

55 - una sepsis severa es una sepsis acompañada de disfunción de al menos un órgano,

- el choque séptico es una sepsis severa asociada a una hipotensión persistente y puede describirse por:

* la presencia de un sitio infeccioso identificado,

60 * una respuesta inflamatoria generalizada que se manifiesta por al menos tres de los síntomas siguientes: a) temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C, b) ritmo cardiaco superior a 90 latidos por minuto, c) ritmo respiratorio superior a 20 respiraciones por minuto, d) número de leucocitos superior a 12000/mm³ o inferior a 4000/mm³,

65 * una hipotensión persistente a pesar de los llenados adecuados y de los tratamientos vasopresores.

Identificar a los pacientes con más riesgos de contraer una infección diseminada, a partir de su admisión y en ausencia de cualquier síntoma de infección diseminada, permitiría implementar lo más pronto posible una estrategia para limitar su riesgo de desarrollar tal infección. Por ejemplo, podría administrarse un tratamiento antibiótico de profilaxis (Puisieux F *et al.*, 1993; Jensen JU *et al.*, 2011) o también un tratamiento preventivo (K. Asehnoune *et al.*, 2014) o también una inmunoterapia determinada (Chahin A *et al.*, 2015; Ali YM *et al.*, 2014), o más simplemente, podrían limitarse las vías de entrada para los patógenos (es decir, retirada de los catéteres lo antes posible, etc.). Estas medidas permitirían un mejor tratamiento del paciente, que conduce a:

* una reducción del tiempo de hospitalización en reanimación y en el hospital, lo que permite una disminución de los costes asociados (Lambert ML SC *et al.*, 2011);

* una disminución de las complicaciones sépticas; y

* una disminución del porcentaje de mortalidad.

Existe por lo tanto una necesidad urgente, no resuelta desde hace numerosos años, de encontrar buenas herramientas para ser capaz de predecir, en los pacientes admitidos en servicio de reanimación, que no tengan ningún síntoma clínico de infección diseminada, los cuales tienen más riesgo de desarrollar una infección diseminada, y así permitir su estratificación a partir de su admisión, en función de su riesgo de desarrollar este tipo de infección.

De manera sorprendente, los solicitantes han puesto en evidencia que tal predicción se hacía posible por el análisis de la dosis de gelsolina en una muestra biológica procedente del paciente admitido en el servicio de reanimación. En efecto, los solicitantes han mostrado que los pacientes con alto riesgo de desarrollar tal infección diseminada veían disminuir altamente su cantidad de gelsolina. La invención presenta, por lo tanto, un avance importante en el ámbito de la lucha contra el desarrollo de infecciones diseminadas, que es una de las primeras causas de mortalidad en pacientes con riesgo en el ámbito de una admisión en el servicio de reanimación, pacientes que no presentan en su admisión ningún síntoma de infección diseminada.

Así, la presente invención tiene como primer objeto un procedimiento de predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada en un paciente admitido en el servicio de reanimación que no tiene ningún síntoma clínico de tal infección, que comprende o que consiste en las etapas siguientes:

- determinar una primera dosis de gelsolina G1 en una muestra biológica de dicho paciente procedente de una primera extracción en el tiempo T1, efectuada entre el día de admisión en el servicio de reanimación y 48 horas después,

- determinar una segunda dosis de gelsolina G2 en una muestra biológica de dicho paciente procedente de una segunda extracción en el tiempo T2, efectuada de dos a tres días después de la primera extracción,

- calcular la variación entre la dosis de gelsolina G2 y la dosis de gelsolina G1, dando un valor Δ ,

- comparar el valor Δ obtenido en la etapa anterior, con un valor umbral S previamente determinado a partir de dos poblaciones de pacientes admitidos en el servicio de reanimación, una que no ha desarrollado una infección diseminada y la otra que ha desarrollado tal infección,

* un valor Δ inferior a dicho valor umbral S significa que el paciente admitido en el servicio de reanimación es un paciente con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada, y

* un valor Δ superior a dicho valor umbral S significa que el paciente admitido en el servicio de reanimación no es un paciente con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada.

Las solicitantes han demostrado, por lo tanto, contra todo pronóstico, que era posible predecir el riesgo de desarrollar una infección diseminada en un paciente admitido en el servicio de reanimación utilizando la gelsolina como marcador.

Los pacientes admitidos en el servicio de reanimación, según la presente invención, son pacientes que presentan o que son susceptibles de presentar varias insuficiencias viscerales agudas que ponen en juego directamente el pronóstico vital y que implican recurrir a métodos de sustitución. Estos pacientes son, por ejemplo, pacientes politraumatizados, pacientes denominados grandes quemados, pacientes que padecen pancreatitis o también síndrome respiratorio agudo. Estos pacientes son, por lo tanto, particularmente vulnerables a las infecciones nosocomiales que pueden evolucionar hacia una infección diseminada.

Una infección diseminada, según la presente invención, se entiende por una infección no localizada, generalizada dentro del organismo y provocada por unos patógenos tales como bacterias, hongos, virus o parásitos. Se habla también de síndrome séptico.

Por predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada, se entiende la identificación de pacientes sin síntomas de infección diseminada en el momento de la admisión en el servicio de reanimación, es decir, que no presentan ninguna manifestación clínica de tal infección diseminada, las cuales se desarrollarán en los días siguientes a su admisión en el servicio de reanimación, de promedio 5 días después de su admisión. En otras palabras, por predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada, se entiende la determinación de tal riesgo en un paciente admitido en reanimación, el cual no tiene ningún síntoma de infección diseminada en el momento de la admisión en el servicio de reanimación. Los pacientes con más riesgo de desarrollar una infección diseminada y para los cuales conviene implementar lo antes posible una estrategia para limitar el riesgo de desarrollar tal infección se denominan pacientes de alto riesgo. Para estos pacientes de alto riesgo, la utilización de la gelsolina permite predecir la aparición de una infección diseminada. En otras palabras, un paciente de alto riesgo es un paciente cuya probabilidad de desarrollar una infección diseminada es de al menos el 75%.

En el ámbito de la presente invención, la infección se denomina precoz, es decir que aparecerá en los 5 días siguientes a la admisión de los pacientes en el servicio de reanimación.

El marcador utilizado en la presente invención para la predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada es la gelsolina. Es una proteína que tiene un peso molecular entre 82 y 84 kDa (nº Swiss Prot P06396), que es citosólica y que comprende 6 dominios (G1 a G6) capaces de unirse a los monómeros de actina o a los filamentos de actina en presencia de una fuerte concentración de iones calcio. Esta unión puede regularse por el pH, los fosfoinosítidos, el ácido lisofosfatídico y unas concentraciones elevadas de calcio. Los sitios de unión con los monómeros de actina están presentes en el dominio G1 así como en el segmento G4-6, mientras que el sitio de unión de fuerte afinidad con los filamentos de actina se encuentra en el segmento G2-3. La gelsolina tiene entonces una función de reparación en los daños tisulares. Existen 4 isoformas conocidas de la proteína, de las cuales la principal es la isoforma 1 (nº Swiss Prot P06396-1), que es la forma plasmática, segregada de la proteína. La isoforma 2 (nº Swiss Prot P06396-2), citoplásmica difiere de la isoforma 1 por la delección de los 51 primeros aminoácidos. Las isoformas 3 y 4 (nº Swiss Prot P06396-3 y P06396-4), citoplásmicas, difieren de la isoforma 1 por una modificación de la secuencia de los 48 primeros aminoácidos.

En el ámbito de la presente invención, todas las isoformas de la gelsolina pueden utilizarse como marcador para predecir el riesgo, en un paciente admitido en servicio de reanimación, de desarrollar una infección diseminada. Según un modo de realización, la isoforma ensayada es la isoforma 1.

La gelsolina es conocida por estar implicada en numerosas patologías, especialmente en diferentes tipos de cánceres, en algunos contextos inflamatorios e infecciosos, en el caso de enfermedades cardíacas y pulmonares, en la enfermedad de Alzheimer o también en el envejecimiento.

Esta proteína se ha descrito ya como marcador en la bibliografía científica:

- o bien para el diagnóstico de un síndrome séptico, es decir la identificación de pacientes que padecen ya un síndrome séptico y que tienen unos síntomas clínicos de infección (Lee *et al.*, 2008), haciendo una relación con la gravedad y la predicción de mortalidad (Xianhui *et al.*, 2014),

- o bien para el pronóstico de la evolución del síndrome séptico en pacientes sépticos, es decir la estimación de esta evolución negativa en pacientes ya reconocidos como que tienen una infección diseminada (Wang *et al.*, 2008),

- o bien para la predicción de mortalidad en pacientes sépticos, es decir la estimación del riesgo de mortalidad en pacientes ya reconocidos como que tienen una infección diseminada (Wang *et al.*, 2008).

Pero en ningún caso la gelsolina se ha descrito para la predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada en pacientes de riesgo, vulnerables, tales como pacientes admitidos en el servicio de reanimación, para los cuales no está presente ninguna manifestación clínica de infección diseminada.

La predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada en los pacientes admitidos en el servicio de reanimación se realiza por la determinación de una dosis de gelsolina en una muestra biológica de dicho paciente.

De manera general, el término "muestra" se refiere a una parte o a una cantidad, más particularmente a una pequeña parte o una pequeña cantidad, extraída a partir de una o varias entidades con fines de análisis. Esta muestra puede, eventualmente, haber sufrido un tratamiento previo, que implica, por ejemplo, unas etapas de mezcla y de dilución.

La muestra, en el ámbito del procedimiento de la invención, es una muestra biológica que proviene del paciente en el que se desea determinar el riesgo de desarrollar una infección diseminada. En particular, tal muestra biológica se selecciona entre las susceptibles de contener la gelsolina.

La muestra biológica según la presente invención puede ser de diferentes naturalezas. En particular, esta muestra es un fluido biológico, por ejemplo seleccionado entre la sangre, la sangre total (tal como la recogida de la vía venosa, es decir que contiene los glóbulos blancos y rojos, las plaquetas y el plasma), el suero, el plasma, el líquido de lavado bronco-alveolar, el líquido céfalo-raquídeo, también denominado líquido cerebro-espinal, y las orinas. Preferentemente, la muestra biológica procedente del paciente es una muestra de sangre total, plasma, suero o cualquier derivado.

Por "dosis de gelsolina" se entiende una cantidad de gelsolina en dicha muestra biológica. A veces, no es la dosis la que se da como resultado final del procedimiento sino la concentración de gelsolina, la cual se calcula a partir de la dosis dividiendo la dosis por el volumen de la muestra sobre la cual se realiza la medición. Para los fines de la invención, se denominará indistintamente "dosis" la dosis o la concentración de gelsolina.

La determinación de la dosis de gelsolina en una muestra biológica puede hacerse según las técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia para determinar la cantidad, o dosis, de un analito en una muestra biológica. A título de ejemplos, se pueden citar los análisis por inmunoensayos, tales como ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), y RIA (Radio immuno Assay), y los análisis por espectrometría de masa, lo que constituye un modo de realización de la invención.

El análisis por inmunoensayo es un método bien conocido por el experto en la materia y ampliamente utilizado en el campo del análisis de muestras biológicas. Permite detectar analitos en unas muestras en forma especialmente de proteínas (antígenos/anticuerpos), de péptidos y de haptenos, como por ejemplo los esteroides o las vitaminas, que implican unas reacciones inmunológicas entre el analito a detectar, en el presente caso la gelsolina, y una o más parejas de unión a este analito. Estos métodos de inmunoensayo se basan en mediciones que permiten cuantificar las señales emitidas durante el análisis de la muestra biológica. La cantidad de señales detectada es generalmente proporcional a la cantidad, o dosis, de analito a medir (por ejemplo, durante un análisis en sándwich) o inversamente proporcional a la cantidad, o dosis, de analito a medir (por ejemplo, análisis de competición). Por supuesto, el término "inmuno" en "inmunoensayo" por ejemplo, no se considera en la presente solicitud como que indica estrictamente que la pareja de unión es una pareja inmunológica, tal como un anticuerpo. En efecto, el experto en la materia utiliza también ampliamente este término cuando la pareja de unión, también denominada ligando, no es una pareja inmunológica, sino que es, por ejemplo, un receptor del analito que se desea analizar. Así, se conoce hablar del análisis ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" literalmente "análisis por inmunoadsorción ligado a enzimas") para unos análisis que utilizan unas parejas de unión no inmunológicas, denominadas más ampliamente en inglés "Ligand Binding Assay", que se podría traducir por "Evaluación que utiliza la unión a un ligando", mientras que el término "inmuno" está incluido en el acrónimo ELISA. Para más claridad, las solicitantes utilizarán en toda la solicitud el término "inmuno" para cualquier análisis que utiliza una pareja de unión, incluso cuando no es una pareja inmunológica.

A título de pareja de unión a la gelsolina, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, las nanofitinas, los aptámeros (Ochsner U.A. *et al.*, 2014) o cualquier otra molécula que está conocida por tener una interacción con la gelsolina a buscar, tal como los lipopolisacáridos (Bucki R. *et al.*, 2005).

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, o bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales cuya obtención está ampliamente conocida por el experto en la materia. Tales anticuerpos están disponibles en el comercio, como por ejemplo los anticuerpos policlonales siguientes: Anti-Gelsolin plasma Goat polyclonal antibody, ABCAM, anti-Gelsolin polyclonal antibody SHEEP 1, Thermo Pierce ANBOP0000269032, y los anticuerpos monoclonales siguientes: Monoclonal anti-gelsoline 1, Boster Biological Technology ANBOP0000215379.

A título de ejemplo de fragmentos de anticuerpos, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ así como las cadenas scFv (Single chain variable fragment), dsFv (Double-stranded variable fragment). Estos fragmentos funcionales se pueden obtener especialmente por ingeniería genética.

El inmunoensayo que consiste en determinar la dosis de gelsolina es un ensayo cuantitativo ampliamente conocido por el experto en la materia que utiliza preferentemente dos parejas de unión a la gelsolina. Una de las dos parejas puede acoplarse a un marcador para formar un conjugado o un trazador. La otra pareja de unión puede captarse sobre un soporte sólido. Se habla entonces de pareja de captura para esta última y pareja de detección para la primera.

Como se ha indicado anteriormente, la señal medida emitida durante el inmunoensayo es entonces proporcional a la cantidad, o dosis, de gelsolina en la muestra biológica.

Para correlacionar la señal obtenida a la dosis, o a la concentración en la muestra biológica, conviene utilizar un modelo matemático preestablecido a partir de una gama patrón. Esta gama patrón se obtendrá previamente de manera conocida. En pocas palabras, la obtención de una gama patrón consiste en medir la señal generada por unas cantidades o concentraciones crecientes y conocidas de gelsolina, en trazar la curva que da la señal en función de la dosis, o concentración, y en encontrar un modelo matemático que representa de la manera lo más fiel posible

esta relación. El modelo matemático se utilizará para determinar por extrapolación las dosis, o concentraciones, de gelsolina desconocidas, contenidas en la muestra biológica a ensayar.

5 Por marcador utilizado para formar el conjugado se entiende, especialmente, cualquier molécula que contiene un grupo reactivo con un grupo de la pareja de unión, directamente sin modificación química, o después de la modificación química para incluir tal grupo, molécula que es capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores de detección directa consiste en:

10 * las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo, por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,

* los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,

15 * las moléculas radioactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ,

* las moléculas fluorescentes tales como las Alexa o las ficocianinas, y

* las sales electroquimioluminiscentes, tales como unos derivados órgano-metálicos a base de acridinio o de rutenio.

20 También se pueden utilizar unos sistemas indirectos de detección, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. El ligando corresponde entonces al marcador para constituir, con la pareja de unión, el conjugado.

25 Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por el experto en la materia, que es el caso, por ejemplo, de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido.

30 El anti-ligando puede entonces ser detectable directamente por los marcadores de detección directa descritos anteriormente o ser él mismo detectable por otra pareja ligando/anti-ligando, y así seguidamente.

Estos sistemas indirectos de detección pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá referir a las solicitudes de patente anteriores FR 2781802 o WO 95/08000 de una de las solicitantes.

35 Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permiten la visualización del marcado o la emisión de una señal detectable por cualquier tipo de aparato de medición apropiado, como por ejemplo un espectrofotómetro, un espectrofluorímetro, un densímetro o también una cámara de alta definición.

40 El inmunoensayo puede también comprender otras etapas conocidas por el experto en la materia, tales como etapas de lavado y etapas de incubación.

45 El inmunoensayo puede ser un ensayo en una etapa o en dos etapas, como se conoce ampliamente por el experto en la materia. En pocas palabras, un inmunoensayo en una etapa comprende la puesta en presencia de la muestra a ensayar simultáneamente con las dos parejas de unión, mientras que un inmunoensayo de dos etapas comprende la puesta en presencia de la muestra a ensayar, por un lado, con la primera pareja de unión, y después el complejo analito-primeras parejas de unión así formado se pone en presencia de la segunda pareja de unión.

50 La espectrometría de masa, que puede sustituir a las técnicas anteriormente desarrolladas que son especialmente los análisis ELISA, es un método ampliamente conocido por el experto en la materia. Se realiza en un espectrómetro de masas. Esto es una herramienta potente cada vez más utilizada para el análisis y la detección de diferentes tipos de moléculas en unas muestras biológicas. De manera general, cualquier tipo de molécula que puede ionizarse puede detectarse en función de su masa molecular con la ayuda de un espectrómetro de masas. Según la naturaleza de la molécula a detectar, de origen proteico o metabólico, algunas tecnologías de espectrometría de masa pueden ser más adecuadas. Sin embargo, sea cual sea el método de espectrometría de masa utilizado para la

55 detección, este último comprende una etapa de ionización de la molécula diana en iones denominados moleculares y una etapa de separación de los iones moleculares obtenidos en función de su masa. Un espectrómetro de masa mide la relación de la masa sobre la carga (m/z) de moléculas ionizadas que está correlacionada a la molécula diana a analizar.

60 Todos los espectrómetros de masa comprenden, por lo tanto:

i) una fuente de ionización destinada a ionizar los marcadores presentes en la muestra a analizar, es decir conferir una carga positiva o negativa a estos marcadores;

65 ii) un analizador de masa destinado a separar los marcadores ionizados, o iones moleculares, en función de su proporción de masa sobre carga (m/z);

iii) un detector destinado a medir la señal producida o bien directamente por los iones moleculares, o bien por unos iones producidos a partir de unos iones moleculares, como se detalla a continuación.

5 La etapa de ionización necesaria para la realización de una espectrometría de masa puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. La fuente de ionización permite llevar las moléculas a analizar un estado gaseoso e ionizado. Una fuente de ionización puede utilizarse o bien en modo positivo para estudiar los iones positivos, o bien en modo negativo para estudiar los iones negativos. Existen varios tipos de fuentes y se utilizarán en función del resultado buscado y de las moléculas analizadas. Se puede citar, especialmente:

- la ionización electrónica (FI), la ionización química (CI) y la desorción-ionización química (DCI),
- el bombardeo por átomos rápidos (FAB), átomos metaestables (MAB) o iones (SIMS, LSIMS),
- el acoplamiento de plasma inductivo (ICP),
- la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI),
- la electronebulización o electrospray (ESI),
- la desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI), activada por una superficie (SELDI) o sobre silicio (DIOS), y
- la ionización-desorción por interacción con especies metaestables (DART).

El analizador de masa en el que se realiza la etapa de separación de los marcadores ionizados en función de su relación masa/carga (m/z) es cualquier analizador de masa conocido por el experto en la materia. Se pueden citar los analizadores de baja resolución, de tipo cuadrupolo o cuadrupolo (Q), trampa de iones 3D (IT) o lineal (LIT), también denominadas trampa iónica, y los analizadores de alta resolución, que permiten medir la masa exacta de los analitos y que utilizan especialmente el sector magnético acoplado a un sector eléctrico, el tiempo de vuelo (TOF).

La separación de los iones moleculares en función de su relación m/z se puede realizar una sola vez (espectrometría de masa simple o MS), o bien pueden llevarse a cabo varias separaciones MS sucesivas. Cuando se realizan dos separaciones MS sucesivas, el análisis se denomina MS/MS o MS^2 . Cuando se realizan tres separaciones MS sucesivas, el análisis se denomina MS/MS/MS o MS^3 y más generalmente, cuando se realizan n separaciones MS sucesivas, el análisis se denomina MS^n .

El modo SRM (Selected Reaction Monitoring) de análisis que realiza dos separaciones sucesivas de espectrometría de masa simple es una utilización particular de separación MS^2 .

Esta detección SRM en modo MS/MS comprende dos etapas suplementarias con respecto al modo MS que son una fragmentación de los iones moleculares entonces denominados iones precursores para dar unos iones fragmentos (o iones hijos) así como una separación de los iones fragmentos en función de su masa. Es entonces la relación m/z de los iones fragmentos la que se correlaciona a la molécula diana a analizar. El principio del modo SRM es seleccionar específicamente un ión precursor, fragmentarlo, y después seleccionar específicamente uno de sus iones fragmentos. Para tales aplicaciones, se utilizan generalmente unos dispositivos de tipo "triple cuadrupolo" o unos híbridos "triple cuadrupolo a trampa iónica".

En el caso de un dispositivo "triple cuadrupolo" o "cuadrupolo de trampa iónica" ($Q1q2Q3$) utilizado en modo MS^2 , para el análisis o la detección de una proteína diana, el primer cuadrupolo ($Q1$) permite filtrar los iones moleculares, que corresponden a los péptidos proteotípicos característicos de la proteína a analizar y obtenidos durante una etapa anterior de digestión, que se detallará más adelante, en función de su relación masa sobre carga (m/z). Sólo los péptidos que tienen la relación masa/carga del péptido proteotípico buscado, relación denominada $(m/z)_1$, se transmiten en el segundo cuadrupolo ($q2$) y tienen el papel de iones precursores para la fragmentación ulterior. El analizador $q2$ permite fragmentar los péptidos de relación masa/carga $(m/z)_1$ en iones fragmentos de primera generación. La fragmentación se obtiene generalmente por colisión de los péptidos precursores con un gas inerte, como el nitrógeno o el argón en $q2$. Los iones fragmentos de primera generación se transmiten en un tercer cuadrupolo ($Q3$) que filtra los iones fragmentos de primera generación en función de una relación masa sobre carga específica, relación denominada $(m/z)_2$. Sólo los iones fragmentos de primera generación que tienen la relación masa/carga de un fragmento característico del péptido proteotípico buscado $(m/z)_2$ se transmiten emitidos en el detector para detectarse, incluso cuantificarse.

Este modo de funcionamiento presenta una doble selectividad, en relación con la selección del ión precursor, por un lado, y de la detección del ión fragmento de primera generación por otro lado. La espectrometría de masa en modo SRM es por lo tanto ventajosa para la cuantificación.

En el ámbito de la invención, el espectrómetro de masa de tipo “triple cuádrupolo” o “cuádrupolo a trampa iónica” puede acoplarse a una cromatografía seleccionada entre una cromatografía de afinidad y una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Preferentemente, el espectrómetro de masa está acoplado a un sistema cromatográfico líquido de alto rendimiento (HPLC).

Como se ha indicado anteriormente, aguas arriba de la detección por espectrometría de masa, la muestra a analizar se trata preferiblemente previamente para generar unos péptidos a partir de las proteínas presentes en la muestra, por ejemplo, por digestión con una enzima proteolítica (proteasa) o por acción de un reactivo químico. En efecto, la escisión de las proteínas puede hacerse mediante un tratamiento fisicoquímico, mediante un tratamiento biológico o por una combinación de los dos tratamientos. Se prefiere, no obstante, el tratamiento de las proteínas por digestión enzimática con respecto al tratamiento fisicoquímico ya que preserva más la estructura de las proteínas, y es más fácil de controlar.

Por “digestión enzimática” se entiende la simple acción o combinada de una o de varias enzimas en condiciones de reacción apropiadas. Las enzimas que efectúan la proteólisis, denominadas proteasas, cortan las proteínas en sitios específicos. En el ámbito de la invención, la digestión de la muestra se realiza, preferentemente, por acción de una enzima proteasa, por ejemplo la tripsina que escinde la unión peptídica a nivel del grupo carboxílico de los restos arginina (R) y lisina (K).

Entre los péptidos así obtenidos, los péptidos característicos de la proteína a analizar se denominan péptidos proteotípicos. Son los que se vigilarán y cuantificarán después en espectrometría de masa. El análisis cuantitativo de proteínas mediante técnicas de espectrometría de masa a través de sus péptidos proteotípicos ya se ha validado en fluidos complejos (Fortin T *et al.*, 2009).

Los péptidos proteotípicos de interés se seleccionan en función de su especificidad en la matriz (gracias al programa Peptide Atlas disponible en acceso libre en internet) y de su sensibilidad (mejor respuesta en el espectrómetro de masa).

En función de la complejidad de la muestra, la etapa de digestión podrá ir seguida de una etapa de fraccionamiento de los péptidos presentes en la muestra de interés para reducir su complejidad. Por fraccionamiento, se entiende, de manera clásica, una depuración del número de péptidos presentes. Tal fraccionamiento podrá hacerse mediante una técnica conocida por el experto en la materia como, por ejemplo, la purificación por extracción en fase sólida (denominada en inglés Solide Phase Extraction o SPE), el fraccionamiento “off gel” (Michel PE. *Et al.*, 2003) o la técnica de inmovilización de pH por gradiente isoeléctrico (Essader AS *et al.*, 2005).

Una de las ventajas de la utilización de la espectrometría de masa reside en que es particularmente útil para cuantificar moléculas, en el presente caso un marcador proteico como la gelsolina. Para este fin, se utiliza la intensidad de corriente detectada, la cual es proporcional a la cantidad de molécula diana. La intensidad de corriente así medida podrá servir de medición cuantitativa que permite determinar la cantidad de molécula diana presente. En efecto, la intensidad de corriente inducida por el o los iones hijos seleccionados, medida en el detector, es proporcional a la cantidad de iones padres, a su vez proporcional a la cantidad de péptidos proteotípicos, a su vez proporcional a la cantidad de la molécula de interés a analizar. La cantidad de corriente analizada, inducida por los iones hijos, es por lo tanto directamente proporcional a la cantidad de la molécula a analizar. La selección de al menos una medición cuantitativa asociada a al menos un ión hijo, y la correlación de esta medición cuantitativa a la cantidad de molécula presente en la muestra, permite obtener un análisis cuantitativo.

Como para el inmunoensayo, es necesario, sin embargo, un calibrado. Permite correlacionar el área del pico medido, que corresponde a la intensidad de corriente inducida por los iones detectados, con la cantidad de molécula diana a analizar. Para ello, los calibrados, clásicamente utilizados en espectrometría de masa podrán utilizarse en el ámbito de la invención. Las evaluaciones SRM se calibran clásicamente con la ayuda de estándares externos o, preferentemente, con la ayuda de estándares internos tales como se describen por T. Fortin *et al.*, 2009. En el caso en el que la molécula diana es un péptido proteotípico, que permite analizar una proteína de interés, la correlación entre la medición cuantitativa y la cantidad de péptido proteotípico diana, y a continuación de proteína de interés, se obtiene calibrando la señal medida con respecto a una señal patrón para la cual se conoce la cantidad a analizar. La calibración se puede realizar mediante una curva de calibración, por ejemplo obtenida por inyecciones sucesivas de péptidos proteotípico patrón a diferentes concentraciones (calibración externa), o de manera preferida, por calibración interna utilizando un péptido pesado, como estándar interno, conforme al método AQUA (“cuantificación absoluta”). Por péptidos pesados, se entienden unos péptidos sintéticos cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas a los péptidos proteotípicos diana seleccionados (iones moleculares) pero para los cuales algunos de los átomos de carbono ¹²(¹²C) se sustituyen por carbono ¹³(¹³C) y/o los átomos de nitrógeno ¹⁴(¹⁴N) se sustituyen por el nitrógeno ¹⁵(¹⁵N). En efecto, estos péptidos pesados tienen las mismas propiedades fisicoquímicas que los péptidos naturales diana (con la excepción de una masa más elevada), y se eluyen en los mismos tiempos de retención cromatográfica. Estos péptidos constituyen el estándar interno (IS). Se añadirán en cantidad fija a cada muestra aguas arriba de la evaluación en espectrometría de masa, por ejemplo, aguas arriba de la digestión de proteínas de la muestra de interés. Así, los péptidos sintéticos sufren las mismas etapas de tratamiento que las

5 proteínas diana y se copurifican con los péptidos naturales diana a analizar durante el fraccionamiento de los péptidos. Se inyectan simultáneamente en el espectrómetro de masa para el análisis. La comparación de las áreas de pico de péptidos naturales a analizar (analitos) con las áreas de picos de los péptidos pesados (Standard Interne) permite realizar una cuantificación relativa de la proteína del péptido natural diana y aumentarlo así a la cantidad relativa de la proteína a analizar.

10 La determinación de la dosis de gelsolina en una muestra biológica puede ser realizarse al menos 2 veces, en dos tiempos diferentes T1 y T2. Las muestras biológicas extraídas a T1 y T2 son de la misma naturaleza. Preferentemente, las muestras biológicas extraídas a T1 y T2 son unas muestras de sangre tales como la sangre total, plasma, suero o cualquier derivado de la sangre.

15 La primera determinación de la dosis de gelsolina, dosis denominada G1, se efectúa en un tiempo T1 en una muestra biológica extraída entre el día de admisión en el servicio de reanimación y 48 horas después. Según un modo de realización, la primera determinación de la dosis de gelsolina (G1) se efectúa en las 48 primeras horas tras la admisión. Según otro modo de realización, la primera determinación de la dosis de gelsolina (G1) se efectúa el día de admisión en el servicio de reanimación.

20 La segunda determinación de la dosis de gelsolina, dosis denominada G2, se efectúa en un tiempo T2 en una muestra biológica extraída de dos a tres días después de la primera extracción, es decir de tres a cinco días después del día de admisión. Según un modo de realización, la segunda determinación de la dosis de gelsolina (G2) se efectúa entre 72 y 120 horas tras la admisión.

25 Según la presente invención, el método utilizado para determinar la primera dosis de gelsolina G1 y la segunda dosis de gelsolina G2 es el mismo y es tal como se ha descrito anteriormente.

Después de la determinación de la segunda dosis G2, el procedimiento de predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada según la invención comprende una etapa de cálculo de la variación entre la dosis de gelsolina G2 y la dosis de gelsolina G1, dando un valor Δ .

30 El cálculo del valor Δ se puede efectuar mediante cualquier cálculo conocido por el experto en la materia que permita poner en evidencia una diferencia entre G2 y G1.

Según un modo particular de realización, el valor Δ se calcula según la fórmula siguiente (I):

35
$$G2 - G1 \text{ (I)}$$

En este caso, el valor Δ tiene la misma magnitud que la dosis G2 o G1 determinada.

40 Según otro modo particular de realización, el valor Δ corresponde al porcentaje de variación relativa y se calcula según la fórmula siguiente (II):

$$\frac{G2-G1}{G1} \times 100 \text{ (II)}$$

45 En este caso, el valor Δ es un porcentaje.

Según otro modo particular de realización, el valor Δ corresponde a la diferencia de dosis por unidad de tiempo y se calcula según la formula siguiente (III):

50
$$\frac{G2-G1}{T2-T1} \text{ (III)}$$

En este caso, el valor Δ tiene como magnitud una unidad de dosis por unidad de tiempo.

55 El procedimiento de predicción del riesgo de desarrollar, para un paciente admitido en el servicio de reanimación, una infección diseminada, comprende una etapa de comparación del valor Δ obtenido en la etapa anterior, con un valor de referencia S previamente determinado a partir de dos poblaciones de pacientes admitidos en el servicio de reanimación, una que no ha desarrollado una infección diseminada y la otra que ha desarrollado tal infección.

60 Este valor S es siempre un valor negativo ya que las solicitantes han mostrado contra todo pronóstico, que la dosis de gelsolina disminuía en gran medida entre T2 y T1 para los pacientes con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada.

La determinación del valor de referencia S según la invención se hace sobre un muestreo de pacientes significativo, es decir sobre un número de muestras mínimo para obtener unos resultados estadísticamente pertinentes y, por lo tanto, representativos de la población estudiada.

5 Tal determinación de un valor de referencia S es ampliamente conocida por el experto en la materia. Consiste especialmente en utilizar un método de análisis idéntico al utilizado en el procedimiento de la invención, en muestras biológicas de las dos poblaciones estudiadas, y en determinar el valor del ensayo (dosis) que permite realizar una discriminación entre estas dos poblaciones.

10 Se conoce la determinación del valor de ensayo (dosis) S que permite hacer una discriminación entre estas dos poblaciones y se calcula gracias a la curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve). Esta curva es un gráfico obtenido llevando en las abscisas la fracción de falsos positivos, es decir la especificidad como se define a continuación, y en las ordenadas la fracción de verdaderos positivos, es decir la sensibilidad como se define a continuación, para diferentes valores de umbral fijados. Representa todas las parejas sensibilidad/especificidad cuando el umbral de decisión varía sobre la totalidad de los valores observados del ensayo. Una manera global de cuantificar la eficacia del diagnóstico de un ensayo es expresar su rendimiento por el área debajo de la curva R.O.C. Por convención, este área es siempre $\geq 0,5$. Los valores del área debajo de la curva R.O.C. varían entre 0,5 (ninguna diferencia de distribución de los valores de análisis entre los dos subgrupos; la curva R.O.C. corresponde a la bisectriz) y 1 (perfecta separación de los valores de análisis de los dos sub-grupos; la curva R.O.C. pasa por el punto (0, 1)). El área debajo de la curva R.O.C. es una expresión cuantitativa de la posición de la curva R.O.C. con respecto al punto (0, 1) (Hanley, J.A. y McNeil, B.J, 1982; Zweig, M. H. y Campbell G., 1993).

25 La sensibilidad representa el porcentaje de verdaderos positivos entre la totalidad de los positivos reconocidos como tales. Expresa la capacidad del ensayo para detectar las muestras biológicas realmente positivas, que corresponden a la patología. En un lenguaje "probabilista", corresponde a la probabilidad de observar un resultado positivo sabiendo que la muestra es positiva.

30 La especificidad representa el porcentaje de verdaderos negativos entre la totalidad de los negativos, reconocidos como tales. Expresa la capacidad del ensayo para no diagnosticar positivas unas muestras realmente negativas, que corresponden a un individuo sano. En un lenguaje "probabilista", corresponde a la probabilidad de observar un resultado negativo sabiendo que la muestra es negativa.

Para obtener el valor de referencia S, se deben cumplir las condiciones siguientes:

35 - las muestras extraídas de las dos poblaciones de pacientes proceden preferentemente de pacientes admitidos en el servicio de reanimación que tienen las mismas características o una mayoría de características comunes, especialmente del mismo sexo y/o de una edad similar o idéntica y/o de mismo origen étnico, con las del sujeto o paciente en el que se desea determinar el riesgo de desarrollar una infección diseminada;

40 - las muestras utilizadas para obtener el valor de referencia S deben ser de la misma naturaleza que las muestras extraídas en el paciente del cual se desea predecir el riesgo de desarrollar una infección;

45 - los pacientes no poseen síntomas de infección diseminada en el momento de la extracción de muestra biológica y su evolución hacia una infección diseminada, o no, se ha documentado posteriormente.

50 El procedimiento de la presente invención permite concluir sobre el nivel de riesgo (elevado o no) de desarrollar una infección diseminada en el paciente del cual procede la muestra biológica, significando un valor Δ inferior a dicho valor umbral S que el paciente admitido en el servicio de reanimación es un paciente de alto riesgo de desarrollar una infección diseminada, y significando un valor Δ superior a dicho valor umbral S que el paciente admitido en el servicio de reanimación no es un paciente con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada.

Un paciente con alto riesgo es tal como se ha definido anteriormente.

55 Según el resultado del procedimiento de la invención y la estratificación del paciente, si se considera como un paciente con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada, el especialista podrá decidir una o varias de las acciones siguientes: administración de un tratamiento antibiótico en profilaxis o también una inmunoterapia determinada, o más simplemente, podrían limitarse las vías de entrada para los patógenos (es decir, retirada de los catéteres lo antes posible, etc.).

60 La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras 1 a 10, en las que:

65 - la figura 1 representa un gráfico que da el espectro MS en modo espectrometría de masa mejorada EMS (Enhanced mass spectrometry) de tres péptidos sintéticos proteotípicos de la proteína Gelsolina para la selección de los iones moleculares (iones padres), siendo la abscisa la relación m/z en Dalton y la ordenada la intensidad en golpe por segundo (cps) y en el que aparecen los tres péptidos proteotípicos utilizados.

- 5 - la figura 2 representa un gráfico que da el espectro MS en modo ión producto mejorado EPI (Enhanced product ion) para la selección de los iones fragmentos obtenidos a partir del ión padre seleccionado para el péptido HVVPNEVVQR, siendo la abscisa la relación m/z en Dalton y la ordenada la intensidad en golpe por segundo (cps).
- 10 - la figura 3 representa un gráfico que da el espectro MS en modo ión producto mejorado EPI (Enhanced product ion) para la selección de los iones fragmentos obtenidos a partir del ión padre seleccionado para el péptido AGALNSNDAFVLK, siendo la abscisa la relación m/z en Dalton y la ordenada la intensidad en golpe por segundo (cps).
- 15 - la figura 4 representa un gráfico que da el espectro MS en modo ión producto mejorado EPI (Enhanced product ion) para la selección de los iones fragmentos obtenidos a partir del ión padre seleccionado para el péptido QTQVSVLPEGGETPLFK, siendo la abscisa la relación m/z en Dalton y la ordenada la intensidad en golpe por segundo (cps).
- 20 - la figura 5 es una representación gráfica que da, en las ordenadas, la diferencia G2-G1 en unidad de dosis, en función de un grupo de 49 pacientes admitidos en el servicio de reanimación, pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que han desarrollado después una infección diseminada (ID) y pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que no han desarrollado después tal infección (NID);
- 25 - la figura 6 es una curva ROC (Receiving Operating Characteristics) de la diferencia G2-G1 que permite seleccionar el valor umbral a partir de los resultados de la figura 5, para alcanzar una sensibilidad mínima del 75%;
- 30 - la figura 7 es una representación gráfica que da, en las ordenadas, el porcentaje de variación $\frac{G2-G1}{G1} \times 100$ en función del estado del grupo de 49 pacientes admitidos en el servicio de reanimación, pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que han desarrollado después una infección diseminada (ID) y pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que no han desarrollado después tal infección (NID);
- 35 - la figura 8 es una curva ROC (Receiving Operating Characteristics) del porcentaje de variación $\frac{G2-G1}{G1} \times 100$, que permite seleccionar el valor del umbral a partir de los resultados de la figura 7, para alcanzar una sensibilidad mínima del 75%.
- 40 - la figura 9 es una representación gráfica que da, en las ordenadas, la diferencia de dosis de gelsolina entre T2 y T1 corregida por el intervalo de tiempo entre las dos extracciones, según la ecuación siguiente $\frac{G2-G1}{T2-T1}$ en unidad de dosis/por unidad de tiempo, en función del estado del grupo de 49 pacientes admitidos en el servicio de reanimación, pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que han desarrollado después una infección diseminada (ID) y pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que no han desarrollado después tal infección (NID);
- 45 - la figura 10 es una curva ROC (Receiving Operating Characteristics) de la diferencia de dosis por unidad de tiempo calculada según la ecuación siguiente $\frac{G2-G1}{T2-T1}$, que permite seleccionar el valor del umbral a partir de los resultados de la figura 9, para alcanzar una sensibilidad mínima del 75%.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención y preparación de las muestras sanguíneas

Este estudio de observación retrospectiva se ha llevado a cabo del 2009 al 2012 en pacientes politraumatizados severos admitidos en del servicio de reanimación del hospital Edouard-Herriot de Lyon. Los criterios de inclusión eran los siguientes:

- pacientes de 18 años de edad o más
- ISS (Injury Severity Score) superior o igual a 25
- duración de estancia en reanimación estimada de al menos 3 días
- bajo ventilación mecánica

Los criterios clínicos de exclusión eran una neumonía de aspiración, una perforación intestinal durante el traumatismo, una terapia inmunosupresiva, y el fallecimiento durante las 48 primeras horas.

Se incluyeron en el estudio 49 pacientes politraumatizados. Todos estos pacientes cumplían los criterios siguientes:

- la primera extracción sanguínea se ha realizado en las 48 primeras horas tras el traumatismo (T1);
- la segunda extracción sanguínea se ha realizado de 2 a 3 días después de la primera (de 96 a 120 horas después del traumatismo – T2);
- la fecha de aparición de la primera infección, para los pacientes en cuestión, era posterior a la fecha de la segunda extracción.

Entre estos pacientes, 18 han desarrollado una infección diseminada (síndrome séptico), de promedio 5 días después de su admisión en el servicio de reanimación.

Se han realizado dos extracciones de sangre sobre tubo EDTA para cada paciente incluido en el estudio según las recomendaciones del proveedor. Los tubos se han agitado después suavemente mediante giro durante 15 minutos antes de centrifugarse durante 15 minutos a 2750 g y a 15°C. Los sobrenadantes se han extraído delicadamente y después se han congelado a -80°C hasta el análisis de la gelsolina.

Ejemplo 2: Detección de la gelsolina mediante la técnica LC-MS

Las etapas sucesivas del procedimiento de análisis SRM son:

- 1) la digestión enzimática
- 2) el fraccionamiento SPE (solid-phase extraction) de los péptidos,
- 3) la cromatografía líquida (LC) acoplada a la MS.

Sin embargo, antes de utilizar este método, las diferentes parejas iones padres/iones de fragmentación, o transición SRM, se han identificado de la siguiente manera:

A partir de la secuencia completa de la isoforma 1 de la gelsolina segregada (SEQ ID nº 1) obtenida en Uniprot (nº Seissprot P06396-1). La lista de las transiciones SRM teóricas de los 3 péptidos proteotípicos seleccionados de las secuencias SEQ ID nº 2 a 4 para el análisis del marcador gelsolina se ha generado utilizando el programa Skyline (Brendan MacLean *et al.*, 2010). Este programa permite realizar una digestión trípica ficticia de la proteína a partir de su secuencia peptídica a fin de generar una lista teórica de péptidos. A partir de esta lista de péptidos, se han predicho las transiciones SRM de todos los iones padres di- o tri-cargados de los péptidos tríplicos teóricos en un intervalo de masa que va de 400 a 1000 Da y todos los iones fragmentos posibles de tipo y o b.

SEQ ID nº 1: isoforma 1 de la gelsolina

MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPNM
 VVEHPEFLKAGKEPGLQIWRVEKFDLVPVPTNLYGDFFTGDAYVILKTVQLRN
 GNLQYDLHYWLGNECSQDESGAAIFTVQLDDYLNGRAVQHREVQGFESATF
 LGYFKSGLKYKGGVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRRVVRATEVPVSWE
 SFNNGDCFILDGNNIHQWCGSNSNRYERLQVSKGIRDNERSGRARVHVS
 EEGTEPEAMLQVLGPPALPAGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGTMSVSL
 VADENPFAQGALKSEDCFILDHGKDGKIFVWKGKQANTEERKAALKTASDFIT
 KMDYPKQTQVSVLPEGGETPLFKQFFKNWRDPDQTDGLGLSYLSSHIANVERV
 PFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDGTTGQKIWRIEGSKVPVDPATYGGFYGG
 DSYIILYNRHHGGRQGQIYNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPVQSR
 VVQGKEPAHLMSLFGGKPMIYKGGTSREGGQTAPASTRLFQVRANSAGATRA
 VEVLPKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLWVGTGASEAEKTGAQELLRVLRAQPV
 QVAEGSEPDGFWEALGGKAAAYRTSPRLKDKKMDAHPRLFACSNKIGRFVIEE
 VPGELMQEDLATDDVMLLDTWDQVFWVWGKDSQEEKTEALTSAKRYIETDP
 ANRRRTPIVVKQGFEPSPVGVWFLGWDDDYWSVDPLDRAMALAA

Los péptidos proteotípicos para la gelsolina a partir de la secuencia SEQ ID N°1 son HVVPNEVVVQR (SEQ ID N°2), AGALNSNDAFVLK (SEQ ID N°3), QTQVSVLPEGGETPLFK (SEQ ID N°4).

5 Los 3 péptidos proteotípicos seleccionados se sintetizaron después químicamente y se infundieron directamente en el espectrómetro de masa a fin de seleccionar las transiciones más intensas y optimizar, para cada una de ellas, los parámetros del espectrómetro:

- la energía de colisión (CE)

10 - la tensión de orificio (DP, declustering potential)

- el potencial reforzado (EP enhanced potential) y

15 - la tensión a la salida de la célula de colisión (CXP, collision cell exit potential).

Los espectros de masa en modo espectrometría de masa mejorada EMS (Enhanced mass spectrometry) para la selección de los iones padres se representan en la figura 1 y aquellos en modo ión producto mejorado EPI (Enhanced product ion) para la selección de los iones fragmentos seleccionados a partir de los iones padres HVVPNEVVVQR, AGALNSNDAFVLK y QTQVSVLPEGGETPLFK se representan respectivamente en las figuras 2 a 4.

El resultado de esta selección se resume en la tabla 1.

Tabla 1

25

Secuencias (SEQ ID n°)	pl	TR	Fracción de elución	Q1 (péptido ligero natural)	Q3 (péptido ligero natural)	Q1 (péptido pesado estándar interno)	Q3 (péptido pesado estándar interno)	DP	EP	CE	CXP
HVVPNEVVVQR (SEQ ID n°2)	5.9	10,1	F5-8	425,9	402,2	429,2	412,2	30	11	21	11
					501,3		511,3	30	11	19	12
					676,3		676,3	30	11	17	16
AGALNSNDAFVLK (SEQ ID n°3)	5.88	15,5	F5	660,4	577,4	664,4	585,4	64	12	40	14
					806,5		814,5	64	12	32	19
					893,5		901,5	64	12	32	21
QTQVSVLPEGGETPLFK (SEQ ID n°4)	4.53	21,3	F5	915,5	457,2	919,5	457,2	31	3,5	40	12
					504,3		512,3	31	3,5	57	12,5
					756,4		756,4	31	3,5	37	18

1) Digestión enzimática:

30 Las muestras de plasma (volumen de 100 µl sobrecargados con 20 µl de péptidos pesados sintéticos), obtenidas en el ejemplo 1, se desnaturalizan y reducen en una solución de urea 6M tamponada por bicarbonato de amonio (pH 8, 5 mM) y que contienen 15 mM de ditiotreitol, durante 40 minutos a 60°C, después se alquilan por la yodoacetamida 35 mM, a temperatura ambiente, durante 40 minutos, en la oscuridad. Las muestras se diluyen después 8 veces con un tampón bicarbonato de amonio 50 mM pH 8 antes de digerirse 4 horas a 37°C con 200 µg de tripsina (Sigma). Se efectúa un segundo ciclo de reducción-alquilación antes de una segunda etapa de digestión trípica realizada a 37°C, durante una noche.

2) Fraccionamiento SPE:

40 Las muestras digeridas se sonifican en ultrasonidos durante 15 minutos y centrifugadas durante 30 minutos a 15000 g. Están después cargadas sobre los cartuchos mixtos (hidrófobos e intercambiadores de iones) Oasis MCX (mixed cation Exchange) y Oasis MAX (mixed anion exchange) 60 mg (Waters). Las muestras cargadas sobre los cartuchos MCX se acidifican previamente con una solución a pH 3 compuesta de agua/ácido fórmico al 2%. Las muestras cargadas sobre los cartuchos MAX se basifican previamente con una solución a pH 12 compuesta de agua/hidróxido de amonio al 10%. Los cartuchos se equilibran previamente en metanol.

45 El procedimiento de fraccionamiento se describe en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2

ETAPAS	Función	MCX	MAX
Acondicionamiento	Activación del adsorbente	H ₂ O /2% AF pH =3	H ₂ O /10% NH ₃ pH = 12
Depósito de la muestra	Fijación de los péptidos de interés Eliminación de las sales	Volumen = 5,5 ml	Volumen = 5,5 ml
Lavados	Eliminación de los contaminantes	H ₂ O /2% AF pH =3	H ₂ O /10% NH ₃ pH = 12
Elución 1 = Fracción MCX-F5 o MAX F8	Elución de los péptidos de interés Concentración de la muestra	Metanol 50%/50% tampón pH 5 (V/V)	Metanol 50%/50% tampón pH 8 (V/V)
Elución 2 = Fracción MCX-F5-8 o MAX F8-4	Elución de los péptidos de interés Concentración de la muestra	Metanol 50%/50% tampón pH 8 (V/V)	Metanol 50%/50% tampón pH 4 (V/V)
Elución 3 = Fracción MCX-F5-8-12 o MAX F8-4-3	Elución de los péptidos de interés Concentración de la muestra	Metanol 90% /10% tampón pH 12 (V/V)	Metanol 80%/20% tampón pH 3 (V/V)

5 Los péptidos a analizar se eluyen con 1 ml de una mezcla metanol/tampón bicarbonato de amonio (v/v). El pH del tampón bicarbonato se selecciona en función del punto isoeléctrico del péptido proteotípico de interés. Los elutos se evaporan parcialmente bajo un flujo de nitrógeno con la ayuda de un sistema TruboVap® (Biotage), después el volumen se añade para obtener un volumen de 250 µl con la ayuda de una solución de agua que contenía un 0,5% de ácido fórmico.

10 3) Cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masa (MS):

Se inyecta un alícuota de 100 µl en la LC acoplada a un sistema MS según las características siguientes.

15 El análisis LC-MS se efectúa sobre un sistema cromatográfico de alta presión (HPLC) de tipo Nexera LC (Shimadzu) con una bomba binaria y un inyector acoplado a un espectrómetro de masa, AB Sciex 5500 Qtrap (MS híbrido triple cuadrúpolo – trampa iónica) que funciona en modo SERM (Q1q2Q3). La separación LC se efectúa sobre una columna C18 en fase inversa 2.1x150 mm, 3,6 µm (Aeris Peptide, Phenomenex) a un caudal de elución de 250 µl/min. Eluyente A = 0,1% de ácido fórmico en agua, eluyente B = 0,1% de ácido fórmico en metanol. Se realiza un gradiente isocrático al 5% de disolvente B durante 2 minutos y después un gradiente lineal de 5%B a 60%B en 37 minutos, después un gradiente isocrático al 5% disolvente B en 2 minutos. El análisis MS se realiza en modo ESI (ionización por electrospray) de ionización positiva a una tensión de 5500 V aplicada a la aguja que permite la ionización en la fuente. Los caudales del gas de nebulización (aire) y del gas cortina (nitrógeno) son de 40 y 50 psi, respectivamente. La fuente iónica Turbo VTM se ajusta a 550°C, el flujo de nitrógeno auxiliar a 40 psi.

25 El control del instrumento y la adquisición de los datos se realizan con el programa Analyst 1.5.2.

30 Se ha construido un método de adquisición Shedule-SRM para cada fracción utilizando los parámetros específicos de cada transición (DP, EP, CE, CXP y tiempo de retención). Se utilizó una ventana de 4 minutos alrededor del tiempo de retención de cada péptido observado durante unos ensayos con las muestras de suero y plasma sobrecargados de péptidos sintéticos, así como un “target scan time” de 1,15 segundos para todas las adquisiciones de datos.

35 El procesamiento de los datos brutos SRM se ha realizado con la ayuda del programa Multiquant 2.1 (AB Sciex) y el algoritmo de integración Signal Finder. El programa permite la extracción de un cromatograma que corresponde a cada péptido.

40 Para el calibrado, se han sintetizado unos péptidos pesados sintéticos de secuencias idénticas a los péptidos diana seleccionados (iones hijos), con lisina o arginina marcadas (C13 y N15): +8 Dalton para la lisina, +10 Dalton para la arginina, a fin de poder utilizarse como estándar interno. Las muestras se sobrecargaron con estos péptidos pesados marcados.

45 Para todas las transiciones seleccionadas (tabla 2) que corresponden a los péptidos de SEQ ID n°:2, SEQ ID n°:3, SEQ ID n°:4, la proporción de las áreas del pico cromatográfico de la transición natural dividida por el área de la transición pesada se ha determinado para permitir una dosis relativa por transición para cada muestra. Las dosis relativas de cada transición de una misma muestra se compilaron después entre sí para obtener una dosis única, representativa de la concentración de la proteína en la muestra biológica estudiada. Por compiladas, se entiende combinadas entre sí varias dosis independientes, pero correlacionadas de la misma proteína para obtener una dosis única por proteína. Esta compilación se ha realizado haciendo la media de las proporciones.

Ejemplo 3: Análisis estadístico de los datos

Los pacientes se han dividido en 2 grupos:

* los pacientes cuyo estado clínico ha mostrado que no han desarrollado una infección diseminada ("NID"): N=31

* los pacientes cuyo estado clínico ha mostrado que han desarrollado una infección diseminada ("ID"): N=18

Un análisis de regresión logística univariada y multivariada se ha realizado para identificar las variables asociadas al riesgo de infección determinando las proporciones Odd (ORs) y los intervalos de confianza asociados (95% CIs).

La curva ROC (Receiver Operating Characteristic) y las áreas debajo de la curva (AUC: Area Under Curve) se calcularon para los valores $\Delta G2-G1$, $\frac{G2-G1}{G1} \times 100$ y $\frac{G2-G1}{T2-T1}$. El análisis estadístico de los datos se ha realizado utilizando el lenguaje R-3.0.0.

Resultados

Asociación entre la dosis de gelsolina plasmática en pacientes admitidos en el servicio de reanimación y la aparición de una infección diseminada

La asociación de la variable gelsolina y otras variables clínicas con el estado del paciente (en el presente caso "ha desarrollado una infección diseminada") se ha ensayado mediante una regresión logística. La fuerza de la asociación se ha estimado con el cálculo de las proporciones Odd (ORs), que es la proporción de la probabilidad de desarrollar una infección diseminada sobre la probabilidad de no desarrollar una infección diseminada.

Las variables clínicas estudiadas son: sexo, resultado de gravedad del traumatismo (ISS: Injury Severity Score), índice de gravedad simplificado (IGS II), traumatismo neurológico, traumatismo neumológico, transfusión de glóbulos rojos, transfusión de plasma fresco congelado.

La variable de gelsolina se ha medido según el método descrito anteriormente, determinando la diferencia de la cantidad de gelsolina G2-G1 entre T2 y T1.

Para cada variable cualitativa: traumatismo neurológico, traumatismo neumológico, transfusión de glóbulos rojos y transfusión de plasma fresco congelados. La proporción Odd se interpreta de la manera siguiente:

- OR = 1: ninguna asociación

- OR < 1: el riesgo de desarrollar una infección diseminada es más frecuente para los pacientes que no tienen esta característica

- OR > 1: el riesgo de desarrollar una infección diseminada es más frecuente para los pacientes que tienen esta característica.

Para cada variable sexo, la proporción Odd se interpreta de la manera siguiente:

- OR = 1: sin asociación

- OR < 1: el riesgo de desarrollar una infección diseminada es más frecuente para las mujeres

- OR > 1: el riesgo de desarrollar una infección diseminada es más frecuente para los hombres.

Para cada variable cuantitativa: diferencia de la cantidad de gelsolina G2 - G1, ISS y IGS II, la proporción Odd se interpreta de la manera siguiente:

- OR = 1: sin asociación

- OR < 1: un aumento del 1º al 3º cuartil está asociado a una disminución del riesgo de desarrollar una infección diseminada

- OR > 1: un aumento del 1º al 3º cuartil está asociado a un aumento del riesgo de desarrollar una infección diseminada.

El conjunto de estas variables se ha vigilado en pacientes admitidos en el servicio de reanimación y que han desarrollado una infección diseminada en los días tras su admisión.

5 Se han realizado unas regresiones logísticas uni-variadas para cada una de estas covariables. Después, las variables con un valor p inferior a 0,1 en el análisis uni-variado se han conservado en el análisis multi-variado, lo que ha conducido a determinar las proporciones Odd ajustadas.

Los resultados se dan en la tabla 3 siguiente.

10 Tabla 3

Variables	Análisis univariado				Análisis multivariado			
	OR	95% CI		Valor P	OR	95% CI		Valor P
Sexo (masculino)	2,21	0,59	8,32	0,2408				
ISS (34 - 50)	0,99	0,93	1,05	0,9869				
IGS II (33 - 58)	2,56	2,46	2,67	0,0797	3,60	0,13	99,73	0,0633
Neurotraumatismo (sí)	3,17	0,94	10,70	0,0635	3,74	1,00	1,11	0,0893
Trauma neumológico (sí)	0,38	0,10	1,38	0,1417				
Transfusión de glóbulos rojos (sí)	1,82	0,18	18,95	0,6158				
Transfusión de plasma fresco congelado (sí)	1,43	0,37	5,55	0,6036				
Gelsolina G2-G1 (-0,288 - (-0,002))	0,11	0,001	12,33	0,0013	0,10	0,02	0,46	0,0021

15 Los resultados de la tabla 3 muestran que la diferencia de dosis de gelsolina plasmática medida con dos o tres días de intervalo (T2-T1) se asociaba significativamente con el estado del paciente ("ha desarrollado una infección diseminada") y por lo tanto con el riesgo de desarrollar una infección diseminada. En efecto, los análisis de regresión logística univariados han determinado una proporción Odd de 0,11 para la diferencia de gelsolina entre T2 y T1 y de 0,1 el análisis multivariado, con respectivamente un valor p de 0,0013 y 0,002, como lo muestra la tabla 3. Además, las otras variables no son significativas en el análisis multivariado.

20 Un paciente con una diferencia de gelsolina G2-G1 de -0,288 tiene 10 veces más riesgo de desarrollar una infección diseminada que un paciente con una diferencia de gelsolina G2-G1 de -0,002.

Predicción de la aparición de una infección diseminada por la medición de la dosis de gelsolina plasmática

25 Más allá de la asociación entre la dosis de gelsolina plasmática y el riesgo de desarrollar una infección diseminada, nuestro estudio ha mostrado que la diferencia de dosis de gelsolina plasmática medida en dos extracciones sucesivas, realizadas con dos o tres días de intervalo, permitía predecir la aparición de una infección diseminada en los días siguientes (<D8).

30 Valor $\Delta = G2-G1$

35 Los resultados de la diferencia G2-G1 para los 49 pacientes se dan en la figura 5 que dan, en las ordenadas, la diferencia G2-G1 en unidad de dosis, en función de un grupo de 49 pacientes admitidos en el servicio de reanimación, pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que han desarrollado después una infección diseminada (ID) y pacientes cuyo seguimiento clínico ha mostrado que no han desarrollado después tal infección (NID).

40 Los resultados de la figura 5 muestran que la dosis de gelsolina entre las dos extracciones disminuye siempre (G2-G1 < 0) para los pacientes que desarrollarán una infección diseminada en los días siguientes y que esta disminución es claramente más marcada en esta población, con respecto a los pacientes que no desarrollarán una infección diseminada.

45 La determinación de un valor umbral para permitir la predicción entre los pacientes con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada y los pacientes que no son de alto riesgo, a partir del valor Δ obtenido con la ayuda de la ecuación G2-G1, se ha efectuado mediante la curva ROC, tal como se da en la figura 6. Así, tomando un valor umbral fijado a -0,144839402777984 (valor negativo), es posible predecir en los pacientes que tengan un valor Δ inferior a este valor umbral la aparición de una infección en los días siguientes, con una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 71%.

50 Valor $\Delta = \frac{G2-G1}{G1} \times 100$

Se ha expresado también el resultado en variabilidad relativa por el cálculo del porcentaje de variación, según la ecuación (II), de la siguiente manera

$$\frac{G2-G1}{G1} \times 100.$$

5 Los resultados se dan en la figura 7, en la que se indica el valor medio en los pacientes que serán objeto de una infección diseminada, este valor mediano es del -22% (la dosis de gelsolina disminuye el 22% (de promedio) entre T1 y T2 en estos pacientes, frente al 5,05% en los pacientes que no tendrán una infección).

10 La determinación de un valor umbral con esta cohorte cuando el valor Δ para la ecuación $\frac{G2-G1}{G1} \times 100$ se ha efectuado mediante la curva ROC, como se indica en la figura 8. Así, tomando un valor umbral igual a -0,121558271983808, es posible predecir en los pacientes que tienen un valor Δ inferior a este valor umbral la aparición de una infección diseminada en los días posteriores con una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 67,7%.

Se puede concluir que, con este juego de datos, este método no es el más apropiado pero que esto no limita en nada la utilización de tal método con una cohorte de pacientes más amplio.

15 Valor $\Delta = \frac{G2-G1}{T2-T1}$

20 Por otro lado, a fin de tener en cuenta el intervalo de tiempo entre las dos extracciones, que no siempre es homogéneo de un paciente a otro, nos hemos interesado en la variación de la cantidad de gelsolina por día calculando la proporción de la diferencia de gelsolina sobre el intervalo de tiempo entre las 2 extracciones. Este cálculo consistió en calcular la proporción de la diferencia de gelsolina en el intervalo de tiempo entre las dos extracciones según la ecuación (III); de la siguiente manera:

$$\frac{G2 - G1}{T2 - T1}$$

25 Los resultados se representan en la figura 9. Con este cálculo, se ha mostrado que la diferencia media de la dosis de gelsolina por día es de -0,02 en los pacientes que no desarrollarán infección diseminada, mientras que es de -0,12 en los pacientes que desarrollarán una infección diseminada.

30 La determinación de un valor umbral cuando el valor Δ para la ecuación $\frac{G2-G1}{T2-T1}$ se ha efectuado mediante la curva ROC, como se indica en la figura 10. Así, tomando un valor umbral fijado igual a -0,072419701388992 permitía predecir la aparición de una infección diseminada en los días posteriores con una sensibilidad del 77,8% y una especificidad del 71%.

35 Se puede concluir que, con este juego de datos, este método no es el más apropiado, pero que esto no limita en nada la utilización de tal método con una cohorte de pacientes más amplia.

40 Según los datos con los 49 pacientes, es el primer método (valor $\Delta = G2-G1$) el que permite obtener el mejor compromiso. Sin embargo, los otros métodos de cálculo del valor Δ siguen siendo adecuados para otros datos con una cohorte más grande.

45 De manera sorprendente, el estudio ha mostrado que la medición de la cantidad de gelsolina plasmática en dos extracciones sucesivas, realizadas en las primeras 48 horas tras la admisión para la primera, y después de dos a tres días después para la segunda, permitía predecir, en ausencia de síntomas clínicos que se traduzcan en una infección diseminada, la aparición de una infección diseminada en pacientes admitidos en el servicio de reanimación.

Referencias bibliográficas

50 - Ali YM *et al.*, 2014, Low-dose recombinant properdin provides substantial protection against Streptococcus pneumoniae and Neisseria meningitidis infection, Proc Natl Acad Sci U.S.A, 111(14):5301-6

55 - Asehnoune K *et al.*, 2014, Hydrocortisone and fludrocortisone for prevention of hospital-acquired pneumonia in patients with severe traumatic brain injury (Corti-TC): a double-blind, multicenter phase 3, randomized placebo-controlled trial, Lancet Respir Med, 2:706-16

- Bone R.C. *et al.*, 1992, the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, Chest, 101 (6):1644-1655

60 - Brendan MacLean *et al.*, 2010, BIOINFORMATICS, Vol. 26 n° 7: 966-968

- 5 - Bucki R. *et al.*, 2005, Inactivation of Endotoxin by Human Plasma Gelsolin, *Biochemistry*, 44 (28)
- Chahin A *et al.*, 2015, The novel immunotherapeutic oligodeoxynucleotide IMT504 protects neutropenic animals from fatal *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia and sepsis, *Antimicrob Agents Chemother*, 59(2):1225-9
- 10 - Eggiman P *et al.*, 2001, Infection control in the ICU, *Chest*, 120(6):2059-93
- Essader AS, *et al.*, 2005, A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun, *Proteomics*, 5, 24-34
- 15 - Fortin T. *et al.*, 2009, Clinical Quantitation of Prostate-specific Antigen Biomarker in the Low Nanogram/Milliliter Range by Conventional Bore Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) Coupling and Correlation with ELISA Tests. *Mol. Cell Proteomics*, 8(5): 1006-1015.
- Hanley, J.A. y McNeil, B.J., 1982, The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, *Radiology*, 143: 29-36.
- 20 - Jensen JU *et al.*, 2011, Procalcitonin-guided interventions against infections to increase early appropriate antibiotics and improve survival in the intensive care unit: a randomized trial, *Crit Care Med*, 39(9):2048-58
- Lambert ML SC *et al.*, 2011, Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to european intensive-care units: a cohort study, *Lancet Infect Dis*, 11:30-8
- 25 - Lee PS, *et al.*, 2008, Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PLoS One*. 2008; 3(11):e3712.
- Li GH, *et al.*, 2012, Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Med Res Rev*. 2012 Sep;32(5):999-1025
- 30 - Michel PE, *et al.*, 2003, Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel, isoelectric focusing, *Electrophoresis*, 24, 3-11
- Oschsner U.A. *et al.*, 2014, Systematic selection of modified aptamer pairs for diagnostic sandwich assays, *BioTechniques*, 56: 125-133
- 35 - Puisieux F, *et al.*, 1993, Prophylactic antibiotherapy using cefapirin in the surgery of duodenal ulcer: a randomized clinical trial, *Ann Fr Anesth Reanim.*, 12(3):289-92
- Vincent JL, 2003, Nosocomial infections in adult intensive-care units, *Lancet*, 361(9374):2068-77
- 40 - Wang H, *et al.*, 2008, Time course of plasma gelsolin concentrations during severe sepsis in critically ill surgical patients. *Crit Care*. 2008; 12(4):R106.
- Xianhui L. *et al.*, 2014, The association between plasma gelsolin level and prognosis of burn patients. *Burns*, vol,40, no. 8, páginas 1552-1555
- 45 - Zweig, M. H. y Campbell G., 1993, Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, *Clin. Chem.*, 39/4: 561-577

Listado de secuencias

- 50 <110> bioMérieux
HOSPICES CIVILS DE LYON
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES
- 55 <120> Predicción del riesgo de desarrollar, para pacientes admitidos en servicio de reanimación, una infección diseminada
<130> GELSOLINE
<150> FR1554227
<151> 12/05/2015
<160> 4
- 60 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 782
<212> PRT
- 65 <213> Homo sapiens
<400> 1

ES 2 750 627 T3

Met Ala Pro His Arg Pro Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ala Leu Ser Leu Pro Val Arg Ala Ala Thr Ala Ser Arg
 20 25 30

Gly Ala Ser Gln Ala Gly Ala Pro Gln Gly Arg Val Pro Glu Ala Arg
 35 40 45

Pro Asn Ser Met Val Val Glu His Pro Glu Phe Leu Lys Ala Gly Lys
 50 55 60

Glu Pro Gly Leu Gln Ile Trp Arg Val Glu Lys Phe Asp Leu Val Pro
 65 70 75 80

Val Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Asp Phe Phe Thr Gly Asp Ala Tyr Val
 85 90 95

Ile Leu Lys Thr Val Gln Leu Arg Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Asp Leu
 100 105 110

His Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Cys Ser Gln Asp Glu Ser Gly Ala Ala
 115 120 125

Ala Ile Phe Thr Val Gln Leu Asp Asp Tyr Leu Asn Gly Arg Ala Val
 130 135 140

Gln His Arg Glu Val Gln Gly Phe Glu Ser Ala Thr Phe Leu Gly Tyr
 145 150 155 160

ES 2 750 627 T3

Phe Lys Ser Gly Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Val Ala Ser Gly Phe
 165 170 175
 Lys His Val Val Pro Asn Glu Val Val Val Gln Arg Leu Phe Gln Val
 180 185 190
 Lys Gly Arg Arg Val Val Arg Ala Thr Glu Val Pro Val Ser Trp Glu
 195 200 205
 Ser Phe Asn Asn Gly Asp Cys Phe Ile Leu Asp Leu Gly Asn Asn Ile
 210 215 220
 His Gln Trp Cys Gly Ser Asn Ser Asn Arg Tyr Glu Arg Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Ser Lys Gly Ile Arg Asp Asn Glu Arg Ser Gly Arg Ala
 245 250 255
 Arg Val His Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Pro Glu Ala Met Leu Gln
 260 265 270
 Val Leu Gly Pro Lys Pro Ala Leu Pro Ala Gly Thr Glu Asp Thr Ala
 275 280 285
 Lys Glu Asp Ala Ala Asn Arg Lys Leu Ala Lys Leu Tyr Lys Val Ser
 290 295 300
 Asn Gly Ala Gly Thr Met Ser Val Ser Leu Val Ala Asp Glu Asn Pro
 305 310 315 320
 Phe Ala Gln Gly Ala Leu Lys Ser Glu Asp Cys Phe Ile Leu Asp His
 325 330 335
 Gly Lys Asp Gly Lys Ile Phe Val Trp Lys Gly Lys Gln Ala Asn Thr
 340 345 350
 Glu Glu Arg Lys Ala Ala Leu Lys Thr Ala Ser Asp Phe Ile Thr Lys
 355 360 365
 Met Asp Tyr Pro Lys Gln Thr Gln Val Ser Val Leu Pro Glu Gly Gly
 370 375 380
 Glu Thr Pro Leu Phe Lys Gln Phe Phe Lys Asn Trp Arg Asp Pro Asp
 385 390 395 400
 Gln Thr Asp Gly Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Ser Ser His Ile Ala Asn

ES 2 750 627 T3

	405					410					415				
Val	Glu	Arg	Val	Pro	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	His	Thr	Ser	Thr	Ala
			420					425					430		
Met	Ala	Ala	Gln	His	Gly	Met	Asp	Asp	Asp	Gly	Thr	Gly	Gln	Lys	Gln
			435				440					445			
Ile	Trp	Arg	Ile	Glu	Gly	Ser	Asn	Lys	Val	Pro	Val	Asp	Pro	Ala	Thr
	450					455					460				
Tyr	Gly	Gln	Phe	Tyr	Gly	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Ile	Leu	Tyr	Asn	Tyr
465					470					475					480
Arg	His	Gly	Gly	Arg	Gln	Gly	Gln	Ile	Ile	Tyr	Asn	Trp	Gln	Gly	Ala
				485					490						495
Gln	Ser	Thr	Gln	Asp	Glu	Val	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Gln
			500					505						510	
Leu	Asp	Glu	Glu	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gln
		515					520					525			
Gly	Lys	Glu	Pro	Ala	His	Leu	Met	Ser	Leu	Phe	Gly	Gly	Lys	Pro	Met
	530					535					540				
Ile	Ile	Tyr	Lys	Gly	Gly	Thr	Ser	Arg	Glu	Gly	Gly	Gln	Thr	Ala	Pro
545				550						555					560
Ala	Ser	Thr	Arg	Leu	Phe	Gln	Val	Arg	Ala	Asn	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr
				565					570						575
Arg	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Pro	Lys	Ala	Gly	Ala	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp
			580					585						590	
Ala	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Ser	Ala	Ala	Tyr	Leu	Trp	Val	Gly	Thr
		595					600					605			
Gly	Ala	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Thr	Gly	Ala	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Val
	610					615					620				
Leu	Arg	Ala	Gln	Pro	Val	Gln	Val	Ala	Glu	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Gly
625					630					635					640
Phe	Trp	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Arg	Thr	Ser	Pro	Arg
				645					650						655

ES 2 750 627 T3

Leu Lys Asp Lys Lys Met Asp Ala His Pro Pro Arg Leu Phe Ala Cys
 660 665 670

Ser Asn Lys Ile Gly Arg Phe Val Ile Glu Glu Val Pro Gly Glu Leu
 675 680 685

Met Gln Glu Asp Leu Ala Thr Asp Asp Val Met Leu Leu Asp Thr Trp
 690 695 700

Asp Gln Val Phe Val Trp Val Gly Lys Asp Ser Gln Glu Glu Glu Lys
 705 710 715 720

Thr Glu Ala Leu Thr Ser Ala Lys Arg Tyr Ile Glu Thr Asp Pro Ala
 725 730 735

Asn Arg Asp Arg Arg Thr Pro Ile Thr Val Val Lys Gln Gly Phe Glu
 740 745 750

Pro Pro Ser Phe Val Gly Trp Phe Leu Gly Trp Asp Asp Asp Tyr Trp
 755 760 765

Ser Val Asp Pro Leu Asp Arg Ala Met Ala Glu Leu Ala Ala
 770 775 780

<210> 2

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 2

His Val Val Pro Asn Glu Val Val Val Gln Arg

10 1

5

10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 3

Ala Gly Ala Leu Asn Ser Asn Asp Ala Phe Val Leu Lys

20 1

5

10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 4

Gln Thr Gln Val Ser Val Leu Pro Glu Gly Gly Glu Thr Pro Leu Phe

1

5

10

15

Lys

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de predicción del riesgo de desarrollar una infección diseminada en un paciente admitido en el servicio de reanimación que no tiene ningún síntoma clínico de tal infección, que comprende las etapas siguientes:

- 5 - determinar una primera dosis de gelsolina G1 en una muestra biológica de dicho paciente procedente de una primera extracción en el tiempo T1, efectuada entre el día de admisión en el servicio de reanimación y 48 horas después,
- 10 - determinar una segunda dosis de gelsolina G2 en una muestra biológica de dicho paciente procedente de una segunda extracción en el tiempo T2, efectuada de dos a tres días después de la primera extracción,
- calcular la variación entre la dosis de gelsolina G2 y la dosis de gelsolina G1, que da un valor Δ,
- 15 - comparar el valor Δ obtenido en la etapa anterior, con un valor umbral S previamente determinado a partir de dos poblaciones de paciente admitidos en el servicio de reanimación, una que no ha desarrollado una infección diseminada y la otra que ha desarrollado tal infección,
- un valor Δ inferior a dicho valor umbral S significa que el paciente admitido en el servicio de reanimación es un paciente con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada, y
- 20 • un valor Δ superior a dicho valor umbral S significa que el paciente admitido en el servicio de reanimación no es un paciente con alto riesgo de desarrollar una infección diseminada.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el valor Δ se calcula según la fórmula siguiente (I):

$$G2 - G1 \text{ (I)}$$

30 3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el valor Δ corresponde al porcentaje de variación relativa y se calcula según la formula siguiente (II):

$$\frac{G2-G1}{G1} \times 100 \text{ (II)}$$

35 4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el valor Δ corresponde a la diferencia de dosis por unidad de tiempo y se calcula según la fórmula siguiente (III):

$$\frac{G2-G1}{T2-T1} \text{ (III)}$$

40 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la primera extracción (T1) se efectúa el día de admisión en el servicio de reanimación.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que las muestras biológicas son la sangre total, el plasma, el suero o cualquiera derivado de la sangre.

45 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la determinación de la dosis de gelsolina se realiza mediante una técnica seleccionada entre la espectrometría de masa y el inmunoensayo.

50 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicho paciente se selecciona entre unos pacientes politraumatizados, unos pacientes denominados grandes quemados, unos pacientes que padecen pancreatitis o síndrome respiratorio agudo.

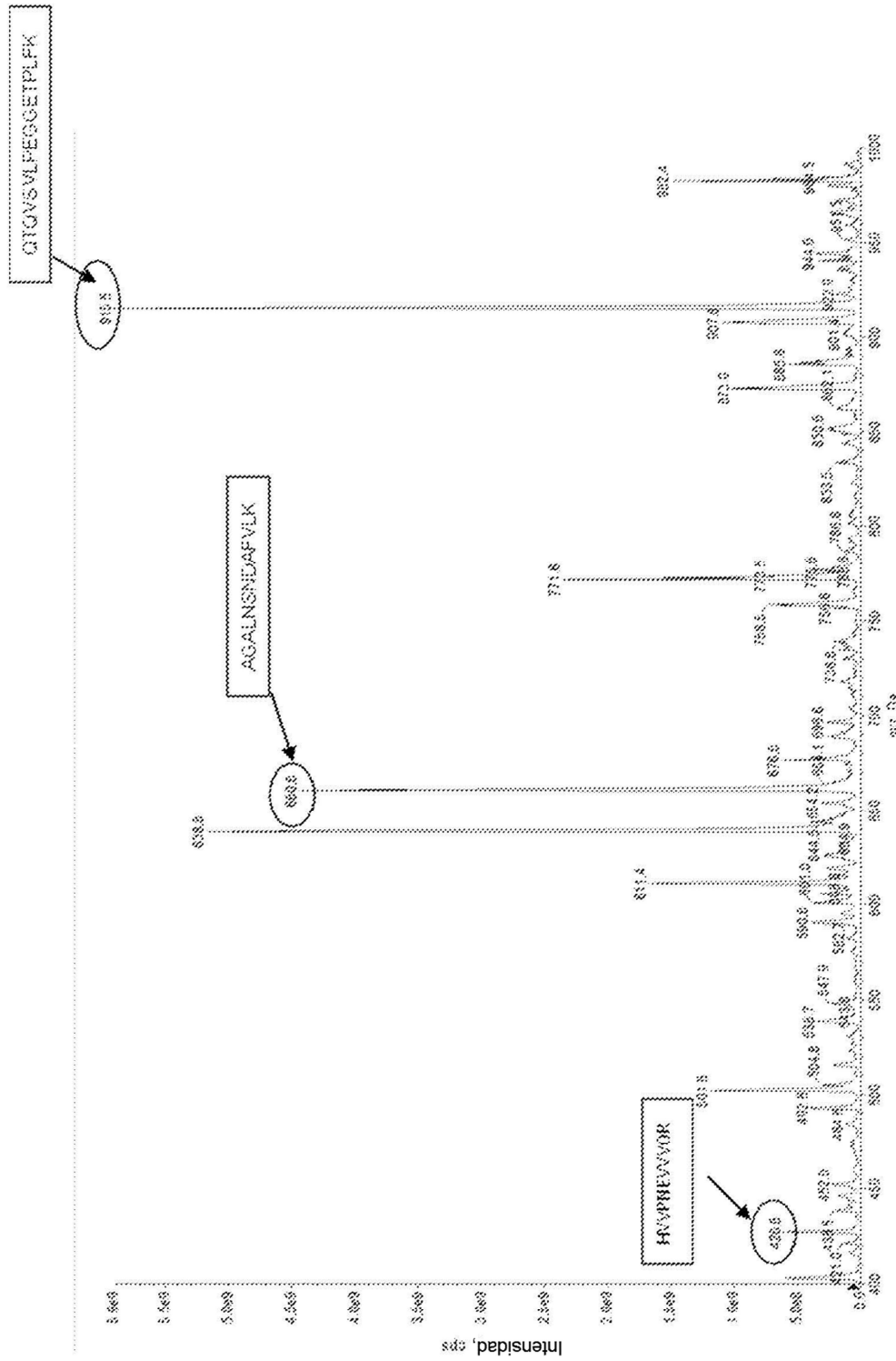


Figura 1

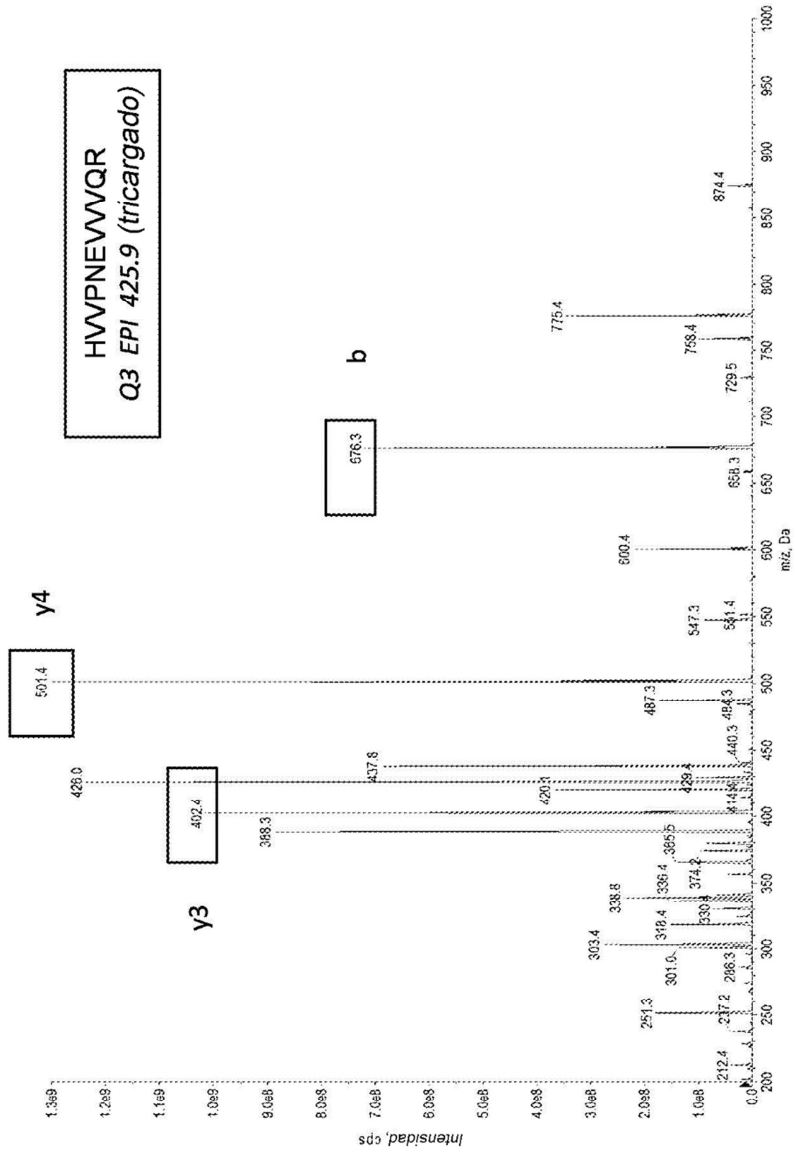


Figura 2

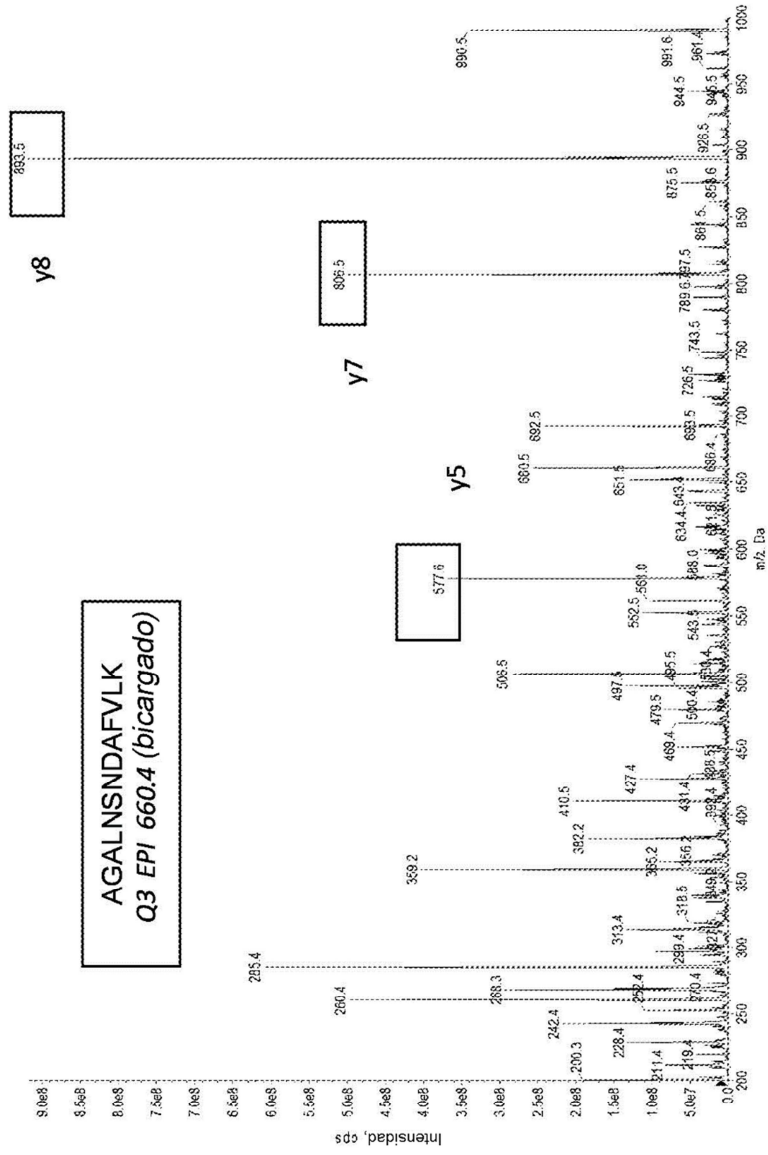


Figura 3

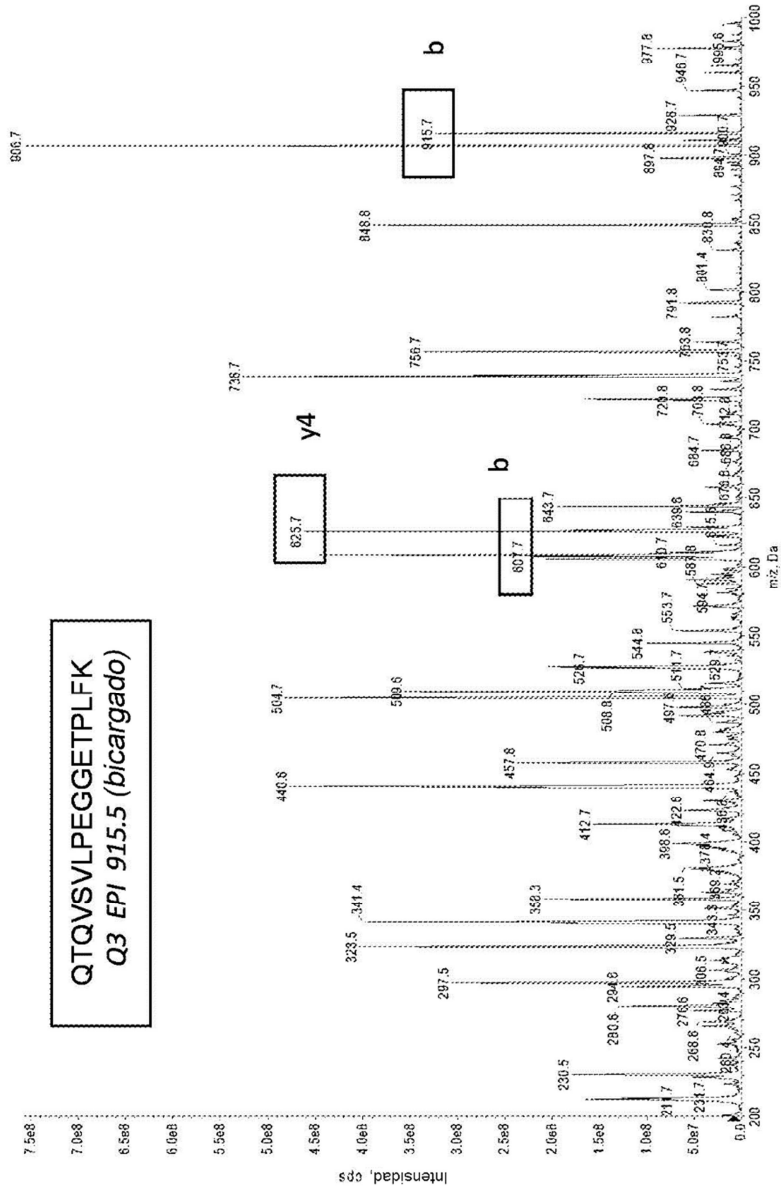


Figura 4

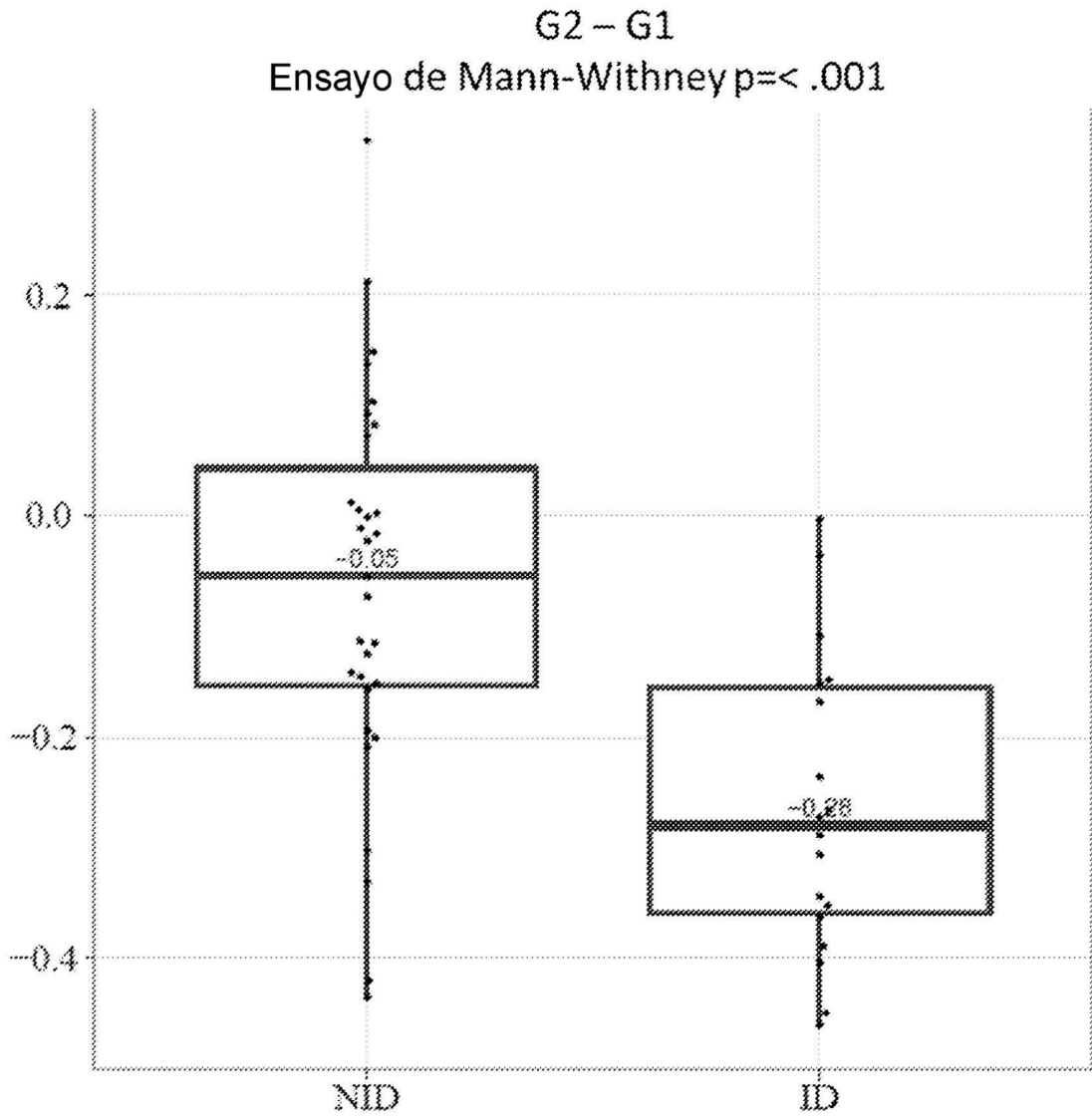


Figura 5

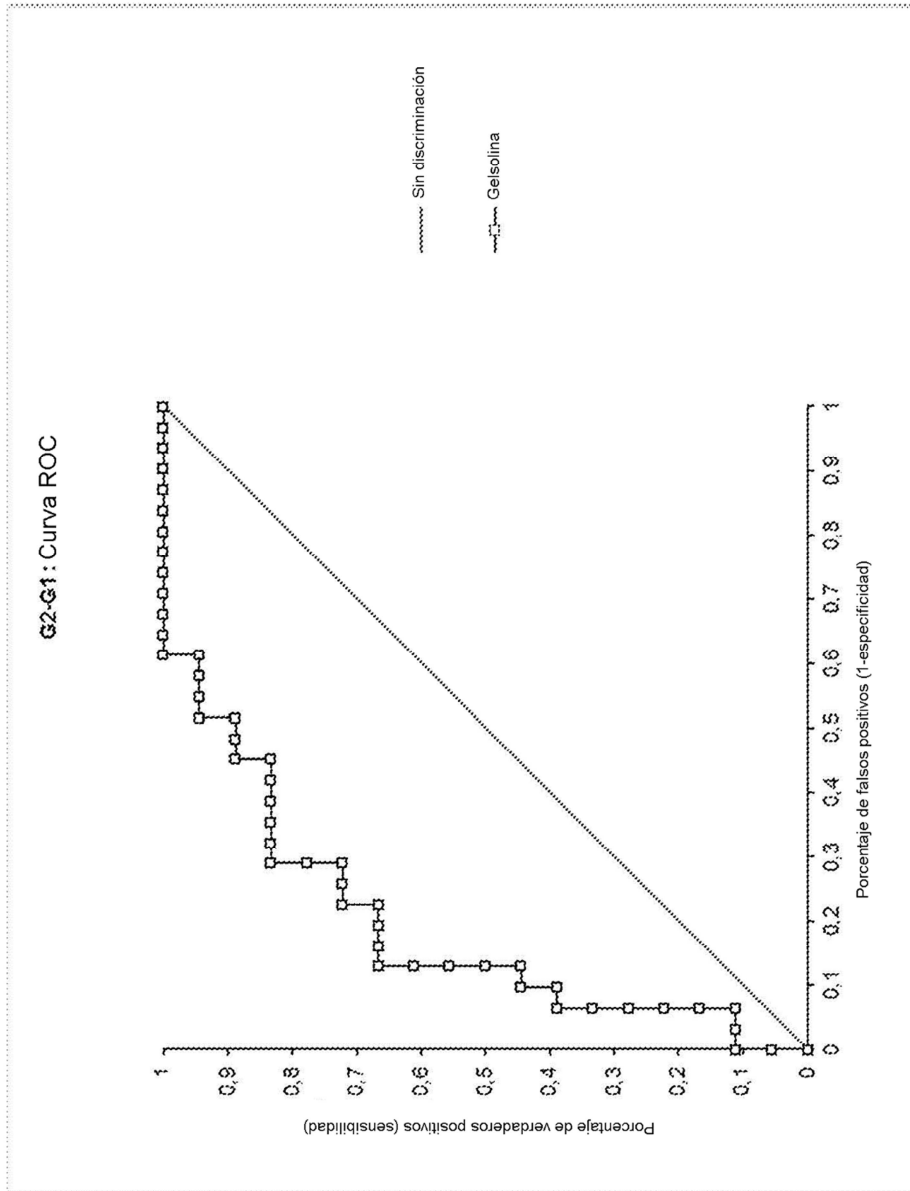


Figura 6

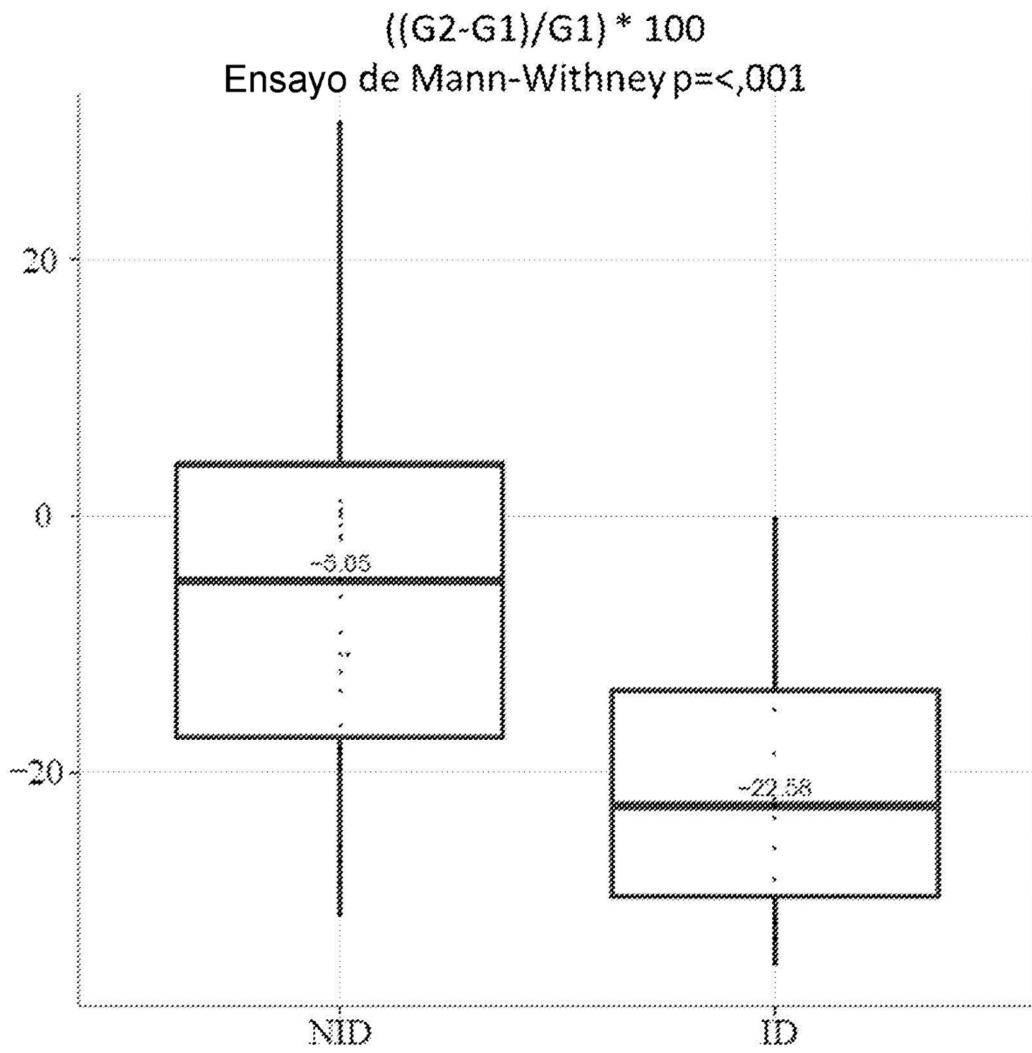


Figura 7

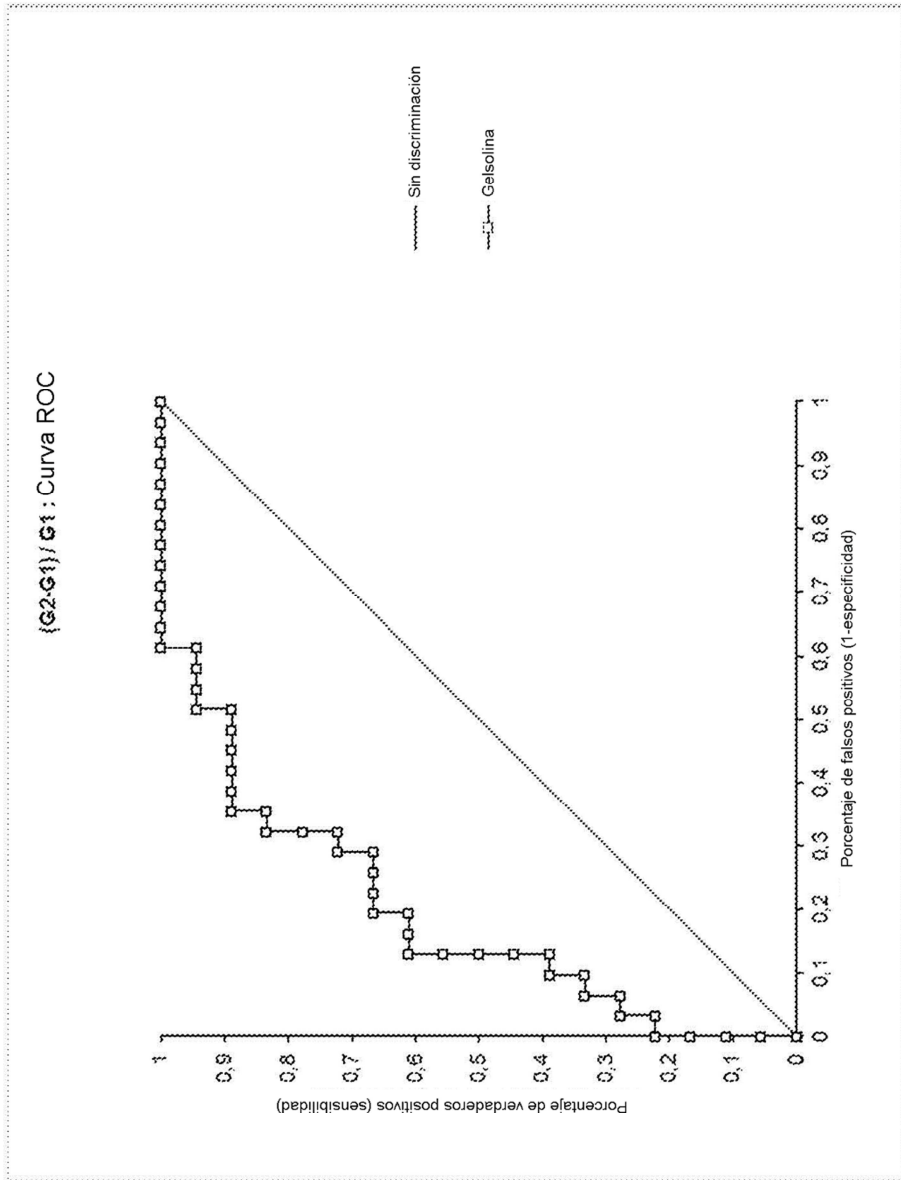


Figura 8

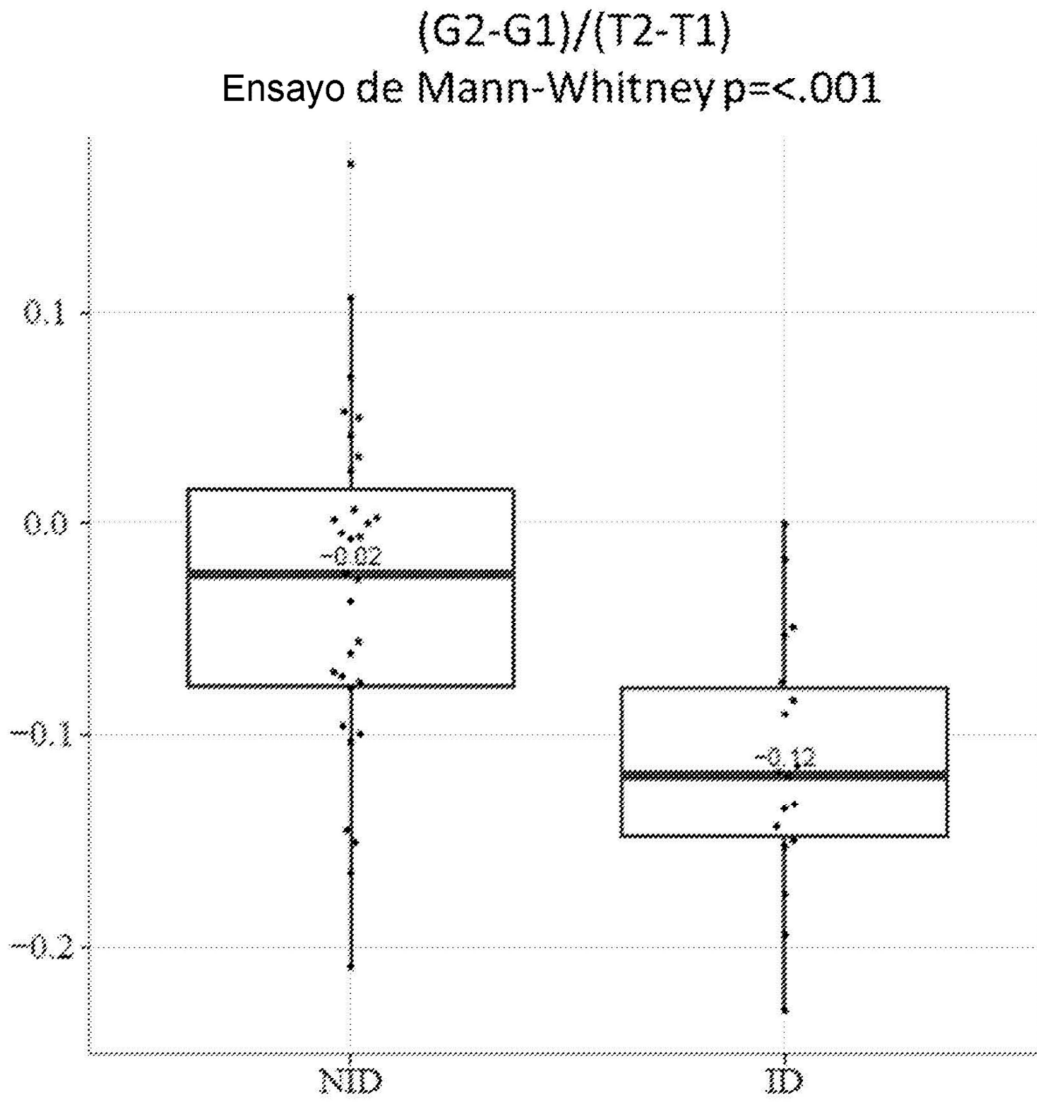


Figura 9

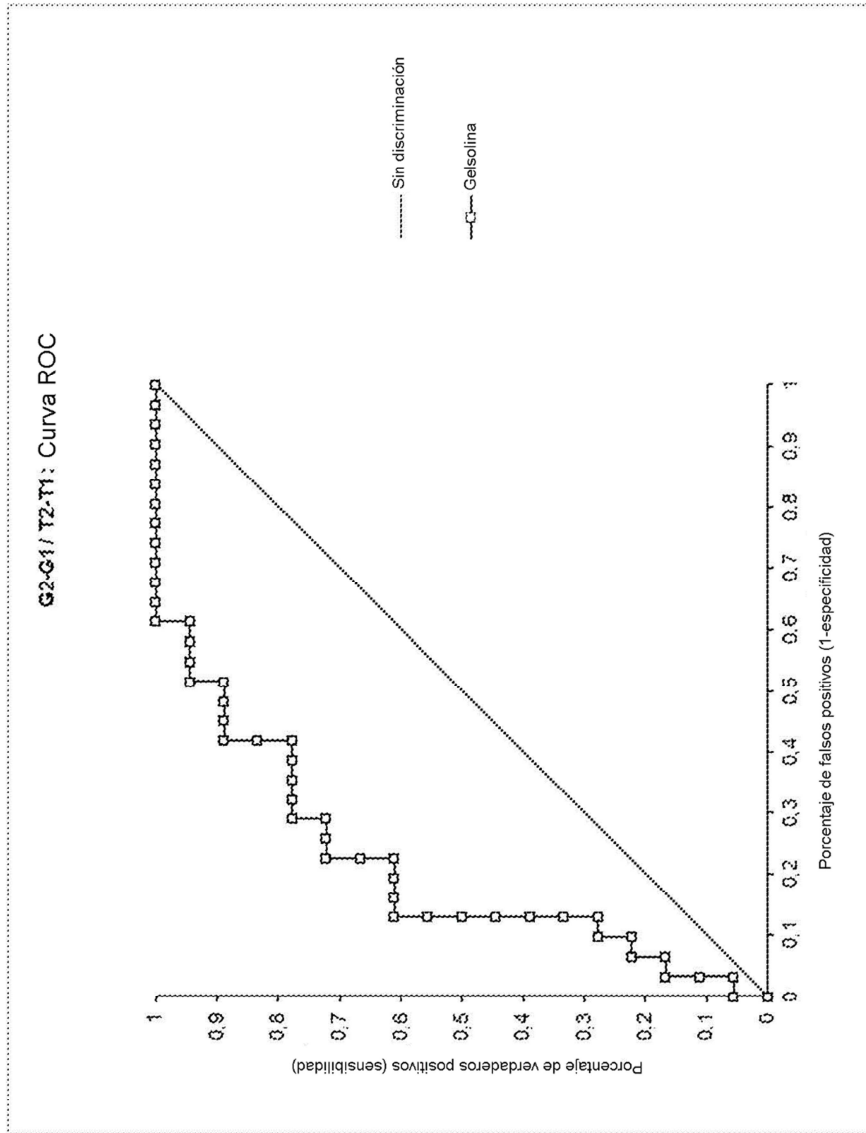


Figura 10