

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 001**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2016 PCT/EP2016/081283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2016 E 16819858 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3391057**

54 Título: **Marcadores diagnósticos de inmunosenescencia y métodos para determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales**

30 Prioridad:

16.12.2015 EP 15307024

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

12.11.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE MARNE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HUE, SOPHIE y
LEVY, YVES**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 793 001 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

Marcadores diagnósticos de inmunosenescencia y métodos para determinar la susceptibilidad a las infecciones nosocomiales

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al campo de la medicina, y más particularmente a marcadores de inmunosenescencia y métodos para determinar la sensibilidad a infecciones nosocomiales.

Antecedentes de la invención

- 10 Las infecciones asociadas a la atención sanitaria (HAI) constituyen un problema importante de salud pública ya que son comunes y están asociadas tanto con altas tasas de morbilidad y mortalidad como con altos costes de atención médica^{1, 2}. El 54% de todas las HAI ocurrieron en personas de 65 años o más³. Los factores de riesgo para las HAI varían con el sitio de infección, el centro de atención médica y la edad del paciente. Anteriormente se informó que entre los pacientes de 70 años de edad o más, los procedimientos invasivos y las co-morbilidades evaluadas usando la Escala de Calificación de Enfermedad Acumulativa para Geriátrica (CIRS-G), fueron factores de riesgo importantes para las HAI⁴. En individuos de edad avanzada, el aumento de la susceptibilidad a infecciones graves y la disminución de la eficacia de la vacunación pueden reflejar el envejecimiento del sistema inmune, llamado inmunosenescencia, que involucra a casi todos los componentes del sistema inmune^{5, 6}.

- 20 Actualmente se debaten dos líneas principales de hipótesis para explicar la inmunosenescencia. Por un lado, se ha atribuido un papel importante a la disminución progresiva de los recuentos de células T vírgenes circulantes (paralela a la involución del timo), la expansión de células T memoria y la acumulación de células T CD8 efectoras terminalmente diferenciadas⁷. El citomegalovirus (CMV) también se considera crucial entre los estímulos antigénicos repetidos responsables de la acumulación de células T CD8 efectoras oligoclonales⁸. El Fenotipo de Riesgo Inmune (IRP) acuñado por Pawelec y cols. tiene en cuenta estas alteraciones. Incluye la inversión de la relación CD4/CD8 y la expansión de células T CD8 CD28 negativas, asociadas con la serología positiva del CMV¹⁰. En un estudio anterior, al inicio del estudio, los pacientes con HAI posterior mostraron, de hecho, recuentos de células T CD4⁺ y CD8⁺ y recuentos más altos de células T CD28⁺ CD8⁺¹¹. Sin embargo, las alteraciones de los parámetros se mantuvieron dentro del intervalo normal. La medición del IRP mostró que los pacientes que exhibían el IRP tenían una tasa más alta de infección nosocomial, aunque solo en el pulmón.

- 30 Por otro lado, la inflamación crónica de bajo grado se encuentra a menudo en personas de edad avanzada¹². Los mecanismos que subyacen a este nivel elevado de inflamación basal asociado al envejecimiento pueden implicar cambios en el número y las funciones de las células inmunes innatas, lo que da lugar a una respuesta ineficiente, así como a una disminución de la tolerancia. La inflamación crónica se encuentra comúnmente en la aterosclerosis¹³, enfermedad de Alzheimer¹⁴ e infección por VIH¹⁵. Recientemente se ha sugerido que la translocación microbiana tiene un papel clave para impulsar esta activación inmune persistente en individuos con infección crónica por VIH¹⁶. La translocación microbiana consiste en (i) la translocación de productos microbianos comensales de la luz intestinal, que ahora se sabe que ocurre en condiciones saludables; y (ii) la transferencia a la circulación sistémica (en ausencia de bacteriemia manifiesta), que es anormal y se acompaña de una activación inmune persistente que da lugar a una respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado¹⁷.

- 40 La evidencia reciente sugiere que la ruptura de la barrera intestinal está asociada con el envejecimiento¹⁸. El primer evento que da lugar a la translocación microbiana consiste en la alteración de la barrera epitelial, registrada usando la concentración en plasma de la proteína de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (I-FABP), que refleja la apoptosis de la capa de células epiteliales¹⁹. Los productos microbianos están fisiológicamente controlados por el sistema inmune intestinal y no alcanzan la periferia. Cuando el sistema inmune intestinal no puede completar su función de cortafuegos, se produce la translocación microbiana. Una vez en la circulación, los productos microbianos pueden estimular las células innatas, como los monocitos y los macrófagos. La endotoxina (lipopolisacárido, LPS), un componente presente en la membrana de las bacterias Gram-negativas, se une a diferentes proteínas extracelulares y de superficie celular: la proteína de unión a LPS (LBP), CD14, MD-2 y el receptor de tipo Toll (TLR)-4. Después de la estimulación del LPS, la activación de los monocitos/macrófagos da lugar a la liberación del CD14 de superficie. El CD14 soluble (sCD14) liberado a la sangre está elevado en pacientes con infección y se informa que aumenta de una manera dependiente a la gravedad^{20, 21}.

- 50 Por lo tanto, es esencial determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales con el fin de ser capaz de ofrecer un manejo personalizado y tratar de minimizar los riesgos adicionales de un desenlace fatal. Por lo tanto, existe una verdadera necesidad de otros marcadores inmunológicos con los que sea posible obtener una predicción fácil y rápida de la susceptibilidad de un paciente a las infecciones nosocomiales. La capacidad de identificar a las personas con mayor riesgo de contraer una infección nosocomial permitiría establecer una mejor terapia preventiva mejor adaptada y mejor dirigida.

Además, el deterioro de la función inmune es un sello distintivo prominente del envejecimiento y en parte solo se puede explicar por una pérdida de células T CD4 vírgenes y centrales de memoria debido a una involución tímica. Se han descrito defectos en el sistema inmune innato y adaptativo de los mayores e incluyen cambios en la abundancia

y frecuencias relativas de subpoblaciones de células inmunes, hematopoyesis alterada, alteraciones en la presentación de antígeno, disminución de la proliferación de células B así como de células T, un repertorio TCR reducido y un defecto en la producción de anticuerpos (Weiskopf y cols., 2009). En última instancia, estas alteraciones dan como resultado una fuerte disminución en la respuesta a los antígenos nuevos persistentes, también llamada inmunosenescencia como se mencionó anteriormente.

Por lo tanto, no es sorprendente que las enfermedades infecciosas sean una de las principales causas de mortalidad en los mayores de 65 años y que la vacunación protectora de los mayores sea más difícil de establecer que en los individuos más jóvenes (Goodwin, 2006).

Debido a la complejidad del sistema inmune, los estudios de inmunosenescencia a menudo solo investigan una o algunas variables del sistema inmune de un individuo. Esto ha dificultado sacar conclusiones generales sobre los fenómenos que se describen o cómo podrían relacionarse entre sí. Las personas que tienen una función inmune alterada generalmente afrontan el riesgo de una mayor morbilidad y mortalidad. Esto es particularmente relevante para las personas mayores que presentan una respuesta reducida a la vacunación (Strindhall y cols., 2007).

Se puede lograr la inmunización activa y la activación de la respuesta inmune mediada por células T así como la humoral a través de la administración de material inmunogénico o vacunas. La vacunación busca prevenir, aliviar o incluso tratar los efectos nocivos de patógenos y carcinógenos, y la vacunación habitual se ha convertido en una parte integral de la medicina preventiva. Desafortunadamente, después de la vacunación, las personas mayores no desarrollan a menudo una respuesta inmune adaptativa completamente funcional, como la evidenciaría una fuerte producción de anticuerpos contra un inmunógeno introducido y, por lo tanto, no obtienen los beneficios de una protección duradera contra enfermedades recurrentes.

Por consiguiente, uno de los temas más desafiantes que afronta el mantenimiento de buena salud y longevidad es la identificación de individuos inmunocomprometidos que puedan parecer saludables pero que tienen un deterioro subyacente y no detectado de la función inmune y, por lo tanto, afrontan el riesgo de una mayor morbilidad y mortalidad. Además, predecir con una precisión muy alta si un individuo responderá adecuadamente a la vacunación activa y se protegerá contra las enfermedades recurrentes es un problema primordial para desarrollar planes de tratamiento personalizados y programas de inmunizaciones óptimos para estos pacientes.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones asociadas a la atención sanitaria (HAI), que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de la proteína C-reactiva (PCR) de alta sensibilidad, la proteína de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (I-FABP) y el CD14 soluble (sCD14) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en donde dicho paciente es un individuo de edad avanzada.

En un segundo aspecto, la descripción se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar una función inmune deteriorada o inmunosenescencia en un sujeto, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

En un tercer aspecto, la descripción se refiere a un método *in vitro* para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a la vacunación activa, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

En un cuarto aspecto, la descripción se refiere a un método para ajustar el tratamiento antiinfeccioso administrado a un paciente susceptible a HAI, que comprende las etapas de: (i) realizar el método para determinar la susceptibilidad del paciente a HAI de acuerdo con la invención, y (ii) ajustar el tratamiento antiinfeccioso.

En un quinto aspecto, la descripción se refiere a un método para ajustar el régimen de vacunación y/o la dosificación administrada a un sujeto, que comprende las etapas de: (i) realizar el método que predice la capacidad de respuesta de un sujeto a la vacunación de acuerdo con la invención, y (ii) ajustar el régimen de vacunación y/o la dosificación.

En un sexto aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende los medios para determinar los niveles de expresión de PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 solubles.

Descripción detallada de la invención

Los inventores plantearon la hipótesis de que la inflamación de bajo grado podría ser impulsada por la translocación microbiana y podría estar asociada con un alto riesgo de desarrollar HAI. El epitelio intestinal, alterado por la edad, podría no permanecer tan hermético como para evitar una translocación aumentada de productos microbianos, y la asociación con respuestas inmunes innatas locales alteradas podría dar lugar a la translocación microbiana verdadera. Por consiguiente, se midió la hs-PCR en suero (proteína C reactiva de alta sensibilidad) y la IL-6 (interleuquina 6),

como un marcador de inflamación de bajo grado en asociación con I-FABP en suero como un marcador de apoptosis de células epiteliales y de integridad de la barrera epitelial, y sCD14 en suero como un marcador de activación del compartimento monocito-macrófago por productos microbianos translocados. Estos marcadores se midieron al ingreso en pacientes mayores hospitalizados en la unidad de rehabilitación geriátrica.

5 Los inventores mostraron que niveles aumentados de hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y sCD14 constituyen un perfil que permite identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar HAI. Los inventores, de hecho, encontraron que la elevación de hs-PCR ($\geq 6,02$ mg/l) estaba asociada con un riesgo significativamente más alto de HAI cuando el nivel de I-FABP estaba en el cuartil más alto (OR, 4; 95%CI, 1,39-11,49; $P=0,010$). Los pacientes con altos niveles de todos los tres marcadores (hs-PCR, I-FABP y sCD14) tenían un riesgo 11 veces más alto de HAI (OR, 10,8; 95%CI, 2,28-51,1; $P=0,003$). En contraste, la elevación combinada de hs-PCR y I-FABP sin elevación de sCD14 no se asoció con un riesgo significativamente más alto de HAI.

10 Los inventores sustituyeron la IL-6 por hs-PCR como el marcador para la inflamación de bajo grado, los resultados no cambiaron, la elevación de IL-6 ($\geq 4,99$ pg/l) se asoció con un riesgo significativamente mayor de HAI cuando el nivel de I-FABP estaba en el cuartil más alto y los pacientes con niveles altos de los tres marcadores tenían un riesgo 6 veces mayor de HAI.

Definiciones

A lo largo de la especificación se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

20 Como se usa en esta memoria, el término “gen de proteína C reactiva (PCR)” codifica una proteína de 224 aminoácidos que es un miembro de la familia de proteínas de pentraxina. La PCR es una proteína pentamérica, anular (de forma de anillo) encontrada en el plasma sanguíneo, cuyos niveles se elevan en respuesta a la inflamación. El término incluye la PCR natural y variantes de esta. La proteína PCR humana natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el GenBank de proteínas con N° de acceso NP_000558 y esta codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos de GenBank bajo el N°. de acceso NM_000567.

25 Como se usa en esta memoria, los términos “gen de IL-6” o “gen de interleuquina-6” (NCBI Gene ID: 3569) codifican una proteína de 212 aminoácidos, interleuquina-6 (IL-6) (Referencia Uniprot: P05231). La IL-6 es una citoquina que funciona en la inflamación y en la maduración de células B. Además, se ha demostrado que la proteína codificada es un pirógeno endógeno capaz de inducir fiebre en personas con enfermedades autoinmunes o infecciones.

30 Como se usa en esta memoria, el término “gen de la proteína de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (I-FABP)” codifica una proteína de 132 aminoácidos también conocida como proteína de unión a ácidos grasos 2 (FABP2). El término incluye I-FABP natural y variantes de esta. La proteína I-FABP natural humana tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el GenBank de proteínas bajo el N°. de acceso NP_000125 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos del GenBank bajo el N°. de acceso NM_000134.

35 Como se usa en esta memoria, el término “gen del Clúster de Diferenciación (CD14)” codifica una glicoproteína de 375 aminoácidos que se ha identificado como un marcador de diferenciación expresado en la membrana del monocito y se sabe que tiene la función de un receptor para el LPS (lipopolisacárido). Las especies moleculares conocidas de la molécula de CD14 incluyen dos tipos, a saber, CD14 unido a membrana (mCD14) que se expresa en la superficie celular y CD14 soluble (sCD14). El término incluye CD14 natural y variantes de este. La proteína CD14 humana natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el GenBank de proteínas bajo el N°. de acceso NP_000582 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos del GenBank bajo en N°. de acceso NM_000591. Las especies moleculares de sCD14 conocidas incluyen la que tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kDa y la que tiene un peso molecular de aproximadamente 49 kDa y se cree que estas se producen por secreción del hígado, así como por escisión por la enzima asociada de mCD14 mediante la activación de un monocito.

45 Como se usa en esta memoria, el término “gen del Clúster de Diferenciación (CD163)” codifica una glicoproteína de 1156 aminoácidos que se ha identificado como un receptor carroñero (scavenger) para el complejo hemoglobina-haptoglobina y se sabe que marca las células del linaje monocito/macrófago. Las especies moleculares conocidas de la molécula CD163 incluyen dos tipos, a saber, CD163 unido a membrana (mCD163) que se expresa en la superficie celular y CD163 soluble (sCD163). El término incluye CD163 natural y variantes de este. La proteína CD163 humana natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el GenBank de proteínas bajo el N°. de acceso NP_004235.4 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos del GenBank bajo en N°. de acceso NM_004244. Las especies moleculares de sCD163 conocidas incluyen la generada por la pérdida del ectodominio del receptor unido a membrana. El sCD163 está regulado a la alza en una amplia gama de enfermedades inflamatorias.

55 Como se usa en esta memoria, el término “gen” se refiere a una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de una o más proteínas o enzimas y puede incluir, o no, secuencias reguladoras de ADN, como secuencias promotoras que determinan, por ejemplo, las condiciones bajo las cuales se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, se pueden transcribir a partir de ADN a ARN, pero no traducirse en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como

reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN. En particular, el término gen puede estar destinado a la secuencia genómica que codifica una proteína, es decir, una secuencia que comprende secuencias reguladoras, promotoras, intrónicas y exónicas.

5 Una "secuencia codificadora" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificadora para una proteína puede incluir un codon de inicio (normalmente ATG) y un codon de terminación.

10 Como se usa en esta memoria, "determinar" abarca detectar o cuantificar. De hecho, un nivel de expresión puede ser cualitativo o cuantitativo. Por lo tanto, una determinación de si un polinucleótido o polipéptido está presente o ausente (p. ej., detectable o indetectable) constituye determinar su nivel de expresión en varias realizaciones mientras en otras realizaciones, se determina un nivel cuantitativo. Una única medida puede proporcionar información acerca del nivel de expresión, actividad o ambos. Por lo tanto, evaluar el nivel de expresión de una proteína incluye evaluar uno o más parámetros o características que proporcionan información acerca del nivel de expresión de la proteína, la actividad de la proteína, o ambos.

15 Como se usa en esta memoria, "detectar" significa determinar si está presente o no PCR, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 en una muestra biológica y "cuantificar" significa determinar la cantidad de PCR, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 en una muestra biológica.

20 Como se usa en esta memoria, el término "nivel de referencia predeterminado" se refiere a los niveles de expresión de PCR, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 en muestras biológicas obtenidas de la población general o de una población seleccionada de sujetos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta por pacientes aparentemente sanos, como individuos que no habían tenido previamente ningún signo o síntoma que indicara la presencia de infecciones. Se puede determinar, por ejemplo, un "nivel de referencia predeterminado" determinando el nivel de expresión de los ácidos nucleicos o de los polipéptidos codificados de PCR, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 en una muestra biológica correspondiente obtenida de uno o más sujeto(s) control (p.ej., no padece una infección nosocomial o se sabe que no es susceptible a dicha enfermedad). Cuando se usa tal nivel de referencia predeterminado, unos niveles más altos o aumentados determinados en una muestra biológica (es decir, una muestra de prueba obtenida del sujeto) son indicativos, por ejemplo, de que dicho paciente está en riesgo de desarrollar infecciones nosocomiales. El nivel de referencia predeterminado se puede establecer en base a mediciones de los niveles de expresión de los biomarcadores de interés en una muestra de sangre obtenida de una gran cohorte de población general.

30 Como se usa en esta memoria, el término "muestra biológica" se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de evaluación *in vitro*. En los métodos de la invención, la muestra biológica puede comprender cualquier fluido corporal obtenido de un paciente. Las muestras biológicas típicas que se usarán en los métodos de acuerdo con la invención son muestras de sangre (p. ej., muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma).
35 Una muestra biológica se puede opcionalmente tratar previamente o procesar antes de su uso. Los ejemplos de etapas de tratamiento previo incluyen la adición de un reactivo como un estabilizante, un conservante, un fijador, un reactivo de lisis, un diluyente, un reactivo anti-apoptótico, un reactivo tamponante, un reactivo regulador de la osmolaridad, un reactivo regulador del pH, etc.

Pronóstico y métodos de diagnóstico de la invención:

40 En un primer aspecto, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones asociadas a la atención sanitaria, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-PCR), de la proteína de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (I-FABP) y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en CD14 soluble (sCD14) y CD163 soluble (sCD163) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

45 En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones asociadas a la atención sanitaria, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de la proteína C reactiva (hs_PCR) y/o interleuquina-6 (IL-6), de la proteína de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (I-FABP) y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en CD14 soluble (sCD14) y CD163 soluble (sCD163) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

50 Los términos "infección nosocomial", "infección asociada a la atención sanitaria" (HAI) e "infección adquirida en el hospital" se usan indistintamente. Por "infección nosocomial" se entiende cualquier infección, principalmente bacteriana, pero también viral y fúngica, que ocurre en un centro de salud durante o después del tratamiento del paciente (diagnóstico, terapia terapéutica, paliativa, preventiva o de rehabilitación) y que no estuvo presente ni bajo incubación en el momento en que se inició la gestión del paciente. Cuando no se conoce específicamente el estado infeccioso del paciente al inicio del tratamiento generalmente se acepta un tiempo de al menos 48 horas o un tiempo más largo que el periodo de incubación para definir una infección nosocomial.

55 En una realización de la invención, la infección nosocomial es una infección nosocomial bacteriana.

5 Como se usa en esta memoria, los términos “paciente” abarcan seres humanos que tienen las defensas inmunes reducidas o deterioradas posteriores a patologías que dañan directamente su competencia inmunológica, o debido a su estado general. Estos pacientes, en particular aquellos del intervalo de edad superior (los mayores) y aquellos en unidades de cuidados intensivos que en otras unidades hospitalarias son especialmente sensibles a las infecciones en general y, en particular, al inicio de infecciones nosocomiales. La alta incidencia de infecciones nosocomiales en este sector se puede explicar por la combinación nociva de varios factores endógenos de riesgo: exposición del paciente a procedimientos invasivos (ventilación artificial, cateterismo urinario y de otra cateterización), la gravedad de la afección del paciente (y las co-morbilidades asociadas) y los tratamientos (transfusiones múltiples, sedación). Sin embargo, a pesar de todas las medidas de higiene y de monitorización tomadas (riesgos exógenos) y la consideración dada a estos factores de riesgo endógenos, la incidencia de infecciones se mantiene estable o disminuye ligeramente.

De acuerdo con la invención, el paciente es un individuo de edad avanzada.

Los términos “individuo de edad avanzada”, “mayores” u “individuo mayor”, como se usa en esta memoria, define a un ser humano que tiene aproximadamente 60 años de edad o mayor.

15 En otra realización de la invención, el paciente es un paciente afectado con cualquier afección que da lugar a inmunodeficiencia (terapia inmunosupresora, inmunodeficiencia primaria o secundaria) o un paciente diagnosticado con factores de co-morbilidad (como enfermedades crónicas del corazón y pulmonares, metabólicas o neurodegenerativas). En una realización particular de la invención, el paciente es un paciente infectado con VIH o infectado por otro virus como un paciente infectado con CMV. En otra realización particular de la invención, el paciente es un paciente hospitalizado en cuidados intensivos y/o que ha sufrido una agresión (cirugía, quemaduras, trauma,...). Aún en otra realización particular de la invención, el paciente es un paciente con una enfermedad crónica como diabetes que incluye diabetes mellitus o un paciente timectomizado.

En una realización particular de la invención, la muestra biológica es una muestra de sangre (p.ej., muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma).

25 En una realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, I-FABP y sCD14 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de IL-6, I-FABP y sCD14 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, I-FABP y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

35 En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de IL-6, I-FABP y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, I-FABP, sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

40 En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de IL-6, I-FABP, sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD14 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

50 En otra realización, la descripción se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, IL-6, I-FABP, sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de hs-PCR, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente y, (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia

predeterminados, en donde un aumento en los niveles de expresión de hs-PCR, I-FABP y al menos un marcador de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas a la atención sanitaria.

5 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

10 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR, I-FABP y sCD14 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR, I-FABP y sCD14 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

15 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la IL-6, I-FABP y sCD14 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la IL-6, I-FABP y sCD14 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

20 En una realización preferida, el nivel de hs-PCR sérica de referencia predeterminado es de aproximadamente 6,0 mg/l. En una realización de la invención, el nivel de I-FABP sérico de referencia predeterminado es de aproximadamente 2000 pg/ml. En una realización de la invención, el nivel de sCD14 sérico de referencia predeterminado es de aproximadamente 0,7 µg/ml. En una realización de la invención, el nivel de IL-6 sérica de referencia predeterminado es de aproximadamente 5,0 pg/l.

25 En una realización, dichos métodos comprenden una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR, I-FABP y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR, I-FABP y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

30 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la IL-6, I-FABP y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la IL-6, I-FABP y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

35 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR, I-FABP, sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR, I-FABP, sCD14 y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

40 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la IL-6, I-FABP, sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la IL-6, I-FABP, sCD14 y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD14 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD14 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

45 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

50 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinar el nivel de expresión de la hs-PCR, IL-6, I-FABP, sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparar dichos niveles de expresión con sus niveles de referencia predeterminados, en donde un incremento en los niveles de expresión de la hs-PCR, IL-6, I-FABP, sCD14 y sCD163 es indicativo de ser susceptible (o en riesgo) de infecciones asociadas con la atención sanitaria.

55 En un segundo aspecto, la descripción se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la función inmune alterada o inmunosenescencia en un sujeto, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, I-FABP

y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

5 En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la función inmune alterada o inmunosenescencia en un sujeto, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

10 El término “función inmune alterada”, como se usa en esta memoria, se refiere a cualquier reducción en la función inmune en un individuo, en comparación con un individuo completamente sano. Los individuos con una función inmune alterada son fácilmente identificables por la abundancia sustancialmente aumentada de células CD8⁺ CD28⁻ o, más ampliamente, por respuestas reducidas de citoquinas, niveles incrementados de fosfoproteínas basales y otras medidas concurrentes.

15 Como se usa en esta memoria, el término “inmunosenescencia” se refiere a los defectos en el sistema inmune innato y adaptativo que se han descrito e incluyen cambios en la abundancia y frecuencias relativas de subpoblaciones de células inmunes, hematopoyesis alterada, alteraciones en la presentación del antígeno, disminución de células B, así como proliferación de células T, un repertorio de TCR reducido y defectos en la producción de anticuerpos (Weiskopf y cols., 2009). En última instancia, estas alteraciones dan como resultado una fuerte disminución en la respuesta a los antígenos nuevos y persistentes y se denominan, en conjunto, inmunosenescencia. Por lo tanto, no es sorprendente que las enfermedades infecciosas sean una de las principales causas de mortalidad en los mayores de 65 años y que la vacunación protectora sea más difícil de establecer que en los individuos más jóvenes (Goodwin y cols., 2006).

20 De acuerdo con la invención, el sujeto es una persona de avanzada edad (p. ej., de al menos 60 años de edad o mayor).

25 En otra realización, el sujeto es un paciente afectado con cualquier afección que da lugar a una inmunodeficiencia (terapia inmunosupresora, inmunodeficiencia primaria o secundaria) o un paciente diagnosticado con factores de comorbilidad (como enfermedades crónicas cardíacas y pulmonares, metabólicas y neurodegenerativas). En una realización particular, el paciente es un paciente infectado con VIH. En otra realización particular, el paciente se ve afectado con una enfermedad crónica que da lugar a una función inmune alterada o inmunosenescencia como un paciente con diabetes que incluye diabetes mellitus, un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o un paciente con enfermedad de células falciformes.

30 En otro aspecto, la descripción de la invención se refiere al uso de hs-PCR y/o IL-6 y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 como un biomarcador de la función inmune alterada o inmunosenescencia.

35 El término “biomarcador”, como se usa en esta memoria, se refiere generalmente a una molécula, es decir, un gen (o ácido nucleico que codifica dicho gen), proteína, la expresión del cual en una muestra biológica de un paciente se puede detectar mediante métodos estándar en la técnica (así como aquellos descritos en esta memoria), y es predictivo o denota una afección del paciente del que se ha obtenido.

En un tercer aspecto, la descripción se refiere a un método *in vitro* para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a la vacunación, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

40 En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un método *in vitro* para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a la vacunación, que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

45 Los términos “inmunización activa” y “vacunación”, como se usan en esta memoria, se refieren a la adquisición de memoria inmunológica y protección duradera frente a enfermedades recurrentes a través de la producción de anticuerpos en respuesta a la administración de un antígeno inmunogénico.

50 Por ejemplo, los sujetos se pueden inmunizar con una vacuna contra una enfermedad infecciosa viral como la infección por el virus de la influenza (gripe). La vacuna contra a la influenza, también conocida como vacuna contra la gripe, es una vacuna anual que usa una vacuna que es específica para un año determinado para proteger contra el virus de la gripe sumamente variable. Cada vacuna contra la influenza estacional contiene antígenos que representan tres (vacuna trivalente) o cuatro (vacuna tetravalente) cepas del virus de la influenza: una cepa del virus de la influenza tipo A subtipo H1N1, una cepa del virus de la influenza tipo A subtipo H3N2 y una o dos cepas del virus de la influenza tipo B.

Métodos para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores de la invención:

La determinación del nivel de expresión de los genes de *PCR* y/o *IL-6*, *I-FABP*, *sCD14* y/o *sCD163* se puede realizar mediante una variedad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión determinado es un nivel de expresión relativo. Por ejemplo, la determinación comprende poner en contacto la muestra biológica con reactivos selectivos como sondas o ligandos y detectar así la presencia, o medir la cantidad de ácidos nucleicos o polipéptidos de interés originalmente en dicha muestra biológica. El contacto se puede realizar en cualquier dispositivo adecuado, como una placa, placa de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna, etc. En realizaciones específicas, el contacto se realiza en un sustrato recubierto con el reactivo, como una matriz de ácido nucleico o una matriz de ligando específico. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semi-sólido como cualquier soporte adecuado que comprende vidrio, plástico, nylon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de varias formas y tamaños, como un porta-objetos, una membrana, una perla, una columna, un gel, etc. El contacto se puede realizar en cualquier condición adecuada para que un complejo detectable, como un híbrido de ácido nucleico o un complejo antígeno-anticuerpo, se forme entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra biológica.

En una realización particular de la invención, se puede determinar el nivel de expresión de los genes de *PCR* y/o *IL-6*, *I-FABP*, *sCD14* y/o *sCD163* determinando la cantidad de ARNm.

Los métodos para determinar la cantidad de ARNm se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se extrae primero el ácido nucleico contenido en las muestras biológicas (p. ej., células mononucleares de sangre periféricas (PBMC) aisladas de una muestra de sangre obtenida del paciente) de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, usando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas que unen ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta después mediante hibridación (p. ej., análisis de transferencia de Northern) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR). Se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa. Es particularmente ventajosa la RT-PCR a tiempo real o la semi-cuantitativa.

Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que exhiben complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en esta memoria encuentran utilidad como sondas de hibridación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, pero típicamente son al menos aproximadamente un 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente un 85% idénticos e incluso más preferiblemente un 90-95% idénticos. Las sondas típicamente comprenden ácidos nucleicos de una única cadena de entre 10 a 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferiblemente de entre 15 y 700, típicamente de entre 20 y 500. Las sondas y cebadores son "específicos" a los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, preferiblemente hibridan en condiciones de hibridación de alta astringencia (que corresponden a la temperatura de fusión más alta T_m , p. ej., formamida al 50%, SCC 5x o 6x. El SCC es NaCl 0,15 M, Na-citrato 0,015 M).

En el contexto de la invención, la "hibridación" se refiere al hecho de obtener una interacción estrecha de la sonda de nucleótidos y la región diana que se espera que se revele mediante la detección de la sonda de nucleótidos. Dicha interacción se puede lograr mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre la sonda de nucleótidos y la secuencia diana, lo que es típico de las interacciones entre moléculas de nucleótidos complementarias capaces de apareamiento de bases. Los enlaces de hidrógeno se pueden encontrar, por ejemplo, en la hibridación de dos hebras complementarias de ADN.

Será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, como un marcador detectable para detectar la hibridación. Se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados en la técnica que incluyen ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros.

Los métodos y reactivos convencionales para aislar ARN de una muestra comprenden el Kit de Aislamiento High Pure miRNA (Roche), Trizol (Invitrogen), extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, kit de aislamiento de miRNA PureLink™ (Invitrogen), Sistema de Purificación de ARN Total Micro-to-Midi PureLink (Invitrogen), kit RNeasy (Qiagen), kit Oligotex (Qiagen), extracción con fenol, extracción con fenol-cloroformo, precipitación con TCA/acetona, precipitación con etanol, purificación con Columna, purificación con membrana de gel de Sílice, Midiprep RNA PureYield™ (Promega), PolyATtract System 1000 (Promega), Maxwell® 16 System (Promega), SV Total RNA Isolation (Promega), kit geneMAG-RNA/DNA (Chemicell), TRI Reagent® (Ambion), kit RNAqueous (Ambion), kit ToTALLY RNA™ (Ambion), kit Poly(A)Purist™ (Ambion) y cualquier otro método comercialmente disponible o no, conocidos para la persona experta.

En una realización, el nivel de expresión de uno o más ARNms se determina mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR). La QPCR se puede realizar usando reactivos químicos y/o máquinas de una plataforma comercialmente disponible. La QPCR se puede realizar usando máquinas de QPCR de cualquier plataforma comercialmente disponible; como los sistemas Prism, geneAmp o StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems), LightCycler (Roche), RapidCycler (Idaho Technology), MasterCycler (Eppendorf), BioMark™ HD System (Fluidigm), sistema iCycler iQ, sistema Chromo 4, CFX, sistemas MiniOpticon y Opticon (Bio-Rad), sistema SmartCycler (Cepheid), sistema RotorGene (Corbett Lifescience), sistemas MX3000 y MX3005 (Stratagene), sistema DNA Engine Opticon (Qiagen), sistemas Quanta qPCR (Techne), sistema de ciclador InSyte y Syncrom (BioGene), DT-322 (DNA Technology), ciclador Exicycler Notebook Thermal, TL998 System (lanlong), sistemas Line-Gene-K (Bioer Technology), o cualquier otra plataforma comercialmente disponible. La QPCR se puede realizar usando reactivos químicos de cualquier plataforma comercialmente disponible, como NCode EXPRESS qPCR o EXPRESS qPCR (Invitrogen), sistemas Taqman o SYBR green qPCR (Applied Biosystems), reactivos de PCR a tiempo real

(Eurogentec), mezcla iTaq (Bio-Rad), mezclas y kits para qPCR (Biosense) y cualquier otro reactivo químico, comercialmente disponible o no, conocido por una persona experta. Los reactivos de QPCR y el sistema de detección pueden ser a base de sondas, o se pueden basar en la quelación de un reactivo químico fluorescente dentro de oligonucleótidos de doble cadena.

- 5 La reacción de QPCR se puede realizar en un tubo; como un único tubo, una tira de tubos o una placa, o se puede realizar en una tarjeta microfluídica en la que ya están integradas las sondas relevantes y/o los cebadores.

En una realización particular, se puede determinar el nivel de expresión de los genes de *PCR* y/o *IL-6*, *I-FABP*, *sCD14* y/o *sCD163* determinando la cantidad de proteína codificada por los genes *PCR*, *I-FABP*, *sCD14* y/o *sCD163*.

- 10 Tales métodos comprenden poner en contacto la muestra biológica con una pareja de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína presente en dicha muestra. La pareja de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal.

- 15 Como se usa en esta memoria, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie de sitio de combinación con el anticuerpo capaz de reaccionar inmunológicamente con un epítipo particular. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal muestra típicamente una afinidad única de unión por cualquier epítipo con el que reacciona inmunológicamente. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación con el anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un epítipo diferente, p. ej., un anticuerpo monoclonal biespecífico. Aunque históricamente un anticuerpo monoclonal se producía mediante la inmortalización de una línea celular secretora de inmunoglobulinas clonalmente pura, también se puede preparar una población monoclonalmente pura de moléculas de anticuerpo mediante los métodos de la invención.

- 20 Los métodos de laboratorio para preparar anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y cols., 1988). Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se pueden preparar mediante inmunización con *PCR* y/o *IL-6*, *I-FABP*, *sCD14* y/o *sCD163* en un mamífero, p. ej., un ratón, rata, ser humano y mamíferos similares. Se aíslan las células productoras de anticuerpos en el mamífero inmunizado y se fusionan con células de mieloma o de heteromioma para producir células híbridas (hibridoma). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se utilizan como una fuente del anticuerpo monoclonal deseado. Este método estándar de cultivo de hibridoma se describe en Kohler y Milstein (1975).

- 30 Si bien los mAbs se pueden producir mediante cultivo de hibridoma, la invención no debe ser tan limitada. También se contempla el uso de mAbs producidos por un ácido nucleico de expresión clonado a partir de un hibridoma de esta invención. Es decir, se puede transferir el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma de esta invención a otra línea celular para producir un transformante. El transformante es genóticamente distinto del hibridoma original, pero es capaz también de producir moléculas de anticuerpo de esta invención, que incluyen fragmentos inmunológicamente activos de moléculas completas de anticuerpos correspondientes a las secretadas por el hibridoma. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º. 4.642.334 de Reading; las publicaciones de Patentes Europeas N.º. 0239400 de Winter y cols. y la N.º. 0125023 de Cabilly y cols.

También se contemplan las técnicas de generación de anticuerpos que no implican inmunización como por ejemplo el uso de la tecnología de visualización de fagos para examinar librerías vírgenes (a partir de animales no inmunizados); véase Barbas y cols. (1992) y Waterhouse y cols. (1993).

- 40 Alternativamente se pueden usar agentes de unión diferentes de los anticuerpos para el propósito de la invención. Estos pueden ser, por ejemplo, aptámeros, que son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótido u oligopéptido con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar a través de la Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento EXponencial (SELEX) de una librería aleatoria de secuencias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La librería aleatoria de secuencias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta librería, cada miembro es un oligómero lineal, finalmente modificado químicamente, de una única secuencia. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo restringida de manera conformacional exhibida por una plataforma de proteína como la Tiorredoxina A de *E. coli* que se selecciona de librerías combinatorias mediante métodos de doble híbrido (Colas y cols., 1996).

- 55 Las parejas de unión de la invención como anticuerpos o aptámeros se pueden marcar con una molécula o sustancia detectable como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen en la técnica los marcadores, que generalmente proporcionan una señal (ya sea directa o indirectamente). Como se usa en esta memoria, el término "marcado", con respecto al anticuerpo o aptámero, pretende abarcar el marcaje directo del anticuerpo o del aptámero mediante acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable, como un agente radiactivo o un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o Indocianina (Cy5) al anticuerpo o aptámero, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad

con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la invención se puede marcar con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la técnica.

5 Los ensayos ya mencionados implican generalmente el recubrimiento de la pareja de unión (es decir, anticuerpo o aptámero) en un soporte sólido. Los soportes sólidos que se pueden usar en la práctica de la invención incluyen sustratos como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillo de microtitulación); cloruro de polivinilo (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilidina; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas que responden magnéticamente y similares.

10 En otra realización de la invención, se puede lograr la medición de los biomarcadores en la muestra biológica mediante un sistema de matriz de perlas citométricas en donde los anticuerpos que se unen a los biomarcadores están recubiertos directa o indirectamente sobre las perlas. Típicamente, se puede usar la tecnología Luminex®, que es una nueva tecnología basada en la detección fluorescente usando un citómetro de flujo, micropérlas teñidas con múltiples colores fluorescentes y láseres de detección. Por lo tanto, se puede usar el kit Luminex® Performance Assay Human CD14 comercializado por R&D Systems, Inc. dentro del contexto de la invención.

15 Por ejemplo, se puede medir el nivel de una proteína biomarcadora como hs-PCR y/o IL-6, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 usando técnicas electroforéticas y de diagnóstico inmunológico estándar, que incluyen inmunoensayos como ensayos de competición, de reacción directa o de tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, transferencia de Western; ensayos de aglutinación; ensayos inmunológicos marcados y mediados con enzimas, como ELISAs; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmuniprecipitación.

20 Se puede medir la concentración de hs-PCR mediante un ensayo inmunológico turbidimétrico mejorado de partícula de proteína C reactiva que usa anticuerpos anti-PCR anclados a látex (es decir, Roche CRP Tinaquant®). Brevemente, se recoge aproximadamente 1,0 ml de muestra de suero de paciente y se almacena en un tubo de recogida de plástico. La muestra se coloca en el tampón apropiado y se añade anticuerpo anti-CRP acoplado a micropartículas de látex a la muestra para iniciar la reacción. Estos anticuerpos anti-CRP con micropartículas de látex conjugadas reaccionan con el antígeno en la muestra para formar un complejo antígeno/anticuerpo. Después de la aglutinación, esta se mide de manera turbidimétrica usando un analizador Modular P Roche/Hitachi o un analizador Advia 1650 Siemens.

25 Más particularmente, se puede usar un método de ELISA en donde los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos con un conjunto de anticuerpos contra PCR y/o IL-6, I-FABP, sCD14 y/o sCD163. Una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene PCR y/o IL-6, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 se añade después a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la(s) placa(s) se puede(n) lavar para eliminar los componentes no unidos y añadir una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora capturada de la muestra, se lava la placa y se detecta la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

35 Son bien conocidos por los expertos en la técnica los ELISA útiles para determinar el nivel de expresión de I-FABP como el ELISA Quantikine®, Inmunoensayo de FABP2/I-FABP Humano comercializado por R&D Systems, Inc.

Son bien conocidos por los expertos en la técnica los ELISA útiles para determinar el nivel de expresión de sCD14 como el ELISA Quantikine®, Inmunoensayo de sCD14 Humano comercializado por R&D Systems, Inc.

40 Son bien conocidos por los expertos en la técnica los ELISA útiles para determinar el nivel de expresión de sCD163 como el ELISA Quantikine®, Inmunoensayo de sCD163 Humano comercializado por R&D Systems, Inc.

45 La medición del nivel de una proteína biomarcadora como PCR y/o IL-6, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 (con o sin métodos basados en inmunoensayo) también puede incluir la separación de proteínas: centrifugación basada en el peso molecular de la proteína; electroforesis basada en la masa y la carga; HPLC basada en la hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaño basada en el tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad de la proteína por la fase sólida particular que se usa. Una vez separadas, se pueden identificar PCR y/o IL-6, I-FABP, sCD14 y/o sCD163 en base al "perfil de separación" conocido p.ej., tiempo de retención para esa proteína y medición usando técnicas estándar.

Alternativamente, las proteínas separadas se pueden detectar y medir mediante, por ejemplo, un espectrómetro de masas.

50 Métodos para ajustar un tratamiento o una vacuna:

La descripción proporciona además métodos para desarrollar planes de tratamiento personalizado. La información obtenida mediante los métodos descritos anteriormente se puede usar para desarrollar un plan de tratamiento personalizado para un paciente identificado como susceptible a infecciones nosocomiales con un perfil de inmunosenescencia y/o que no responda a la vacunación de acuerdo con los métodos anteriormente descritos.

En un cuarto aspecto, la descripción se refiere a un método para ajustar el tratamiento anti-infeccioso administrado a un paciente susceptible a infecciones nosocomiales que comprende las etapas de: (i) realizar el método para determinar la susceptibilidad del paciente a infecciones nosocomiales de la invención, y (ii) ajustar el tratamiento anti-infeccioso.

- 5 Los métodos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, usando cualquiera de los determinantes de la susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales descritos anteriormente y, en consideración de los resultados obtenidos, diseñar un plan de tratamiento para el paciente. Si se determina la susceptibilidad, esta indica que dicho paciente está en riesgo de una infección nosocomial. La capacidad de identificar a las personas con mayor riesgo de contraer una infección nosocomial permitiría establecer una terapia preventiva mejor adaptada y mejor dirigida. Por lo tanto, dicho paciente es candidato para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones nosocomiales en general y de infecciones bacterianas nosocomiales en particular mediante la administración de un tratamiento anti-infeccioso como un antibiótico. Por el contrario, la ausencia de susceptibilidad es indicativa de un riesgo reducido de infección nosocomial. Además, dependiendo de la susceptibilidad, el paciente puede requerir un régimen de tratamiento que sea más o menos agresivo que un régimen estándar, o se puede determinar que el paciente es el más adecuado para un régimen estándar.

Alternativamente, el tratamiento anti-infeccioso puede consistir o incluir un manejo preventivo personalizado con el fin de minimizar riesgos adicionales en un paciente determinado como de riesgo para una infección nosocomial: por ejemplo, limitando la exposición del paciente a procedimientos invasivos (ventilación artificial, cateterización urinaria u otra), tomando todas las medidas de higiene necesarias (habitación individual, dieta equilibrada adecuada, etc...).

- 20 En una realización de la descripción, la infección nosocomial es una infección nosocomial bacteriana y el fármaco anti-infeccioso es un antibiótico.

Como se usa en esta memoria, el término "antibiótico" se refiere a una sustancia antibacteriana que ayuda a un organismo a combatir una infección bacteriana.

- 25 Ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes grandes familias: aminoglucósidos, beta-lactamas, como beta-lactamas de cefalosporina, beta-lactamas de penicilina y otras beta lactamas (carbapenems, monobactams), ciclinas (doxiciclina, limeciclina, metaciclina, minociclina, tetraciclina, oxtetraciclina, tigeciclina), glucopéptidos (teicoplanina, vancomicina) y polipéptidos, macrólidos y compuestos tipo macrólidos (lincosamidas, ketólidos, estreptograminas), quinolonas que incluyen fluoroquinolonas, péptidos antibacterianos, en particular gramicidina, fagos y otros (ácido fusídico, noxitiolina, daptomicina, fosfomicina, oxazolidinona, fenicoles, polimixinas, rifampicina, etc.).

En un quinto aspecto, la descripción se refiere a un método para ajustar el régimen de vacunación y/o la dosificación administrada a un sujeto, que comprende las etapas de: (i) realizar el método que predice la capacidad de respuesta de un sujeto a la vacunación de la invención, y (ii) ajustar las dosis de vacuna.

- 35 En una realización de la descripción, la vacunación es contra una enfermedad infecciosa como enfermedades infecciosas virales. Ejemplos de enfermedad infecciosa viral incluyen, pero no se limitan a, SIDA, Virus Respiratorio Sincitial (RSV), Varicela (Varicela), resfriado común, Infección por Citomegalovirus, fiebre de garrapatas de Colorado, fiebre del Dengue, fiebre hemorrágica del Ébola, enfermedad mano, pie y boca, Hepatitis, Herpes simplex, Herpes zoster, HPV, Influenza (Gripe), fiebre de Lassa, Sarampión, fiebre hemorrágica de Marburgo, Mononucleosis infecciosa, Paperas, Norovirus, Poliomieltis, Leucoencefalopatía multifocal progresiva, Rabia, Rubeola, SARS, Viruela (Viruela), Encefalitis viral, Gastroenteritis viral, Meningitis viral, Neumonía viral, Enfermedad de West Nile y Fiebre amarilla.

Los métodos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, usando cualquiera de los determinantes de la predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto a la vacunación descritos anteriormente y, en consideración de los resultados obtenidos, diseñar un plan de tratamiento para el paciente.

- 45 Dependiendo de la eficacia de la vacuna de interés (como la eficacia de la vacuna de la influenza) y, por lo tanto, el sujeto responde o no a la vacunación, el sujeto puede requerir un régimen de vacunación y/o dosificación que sea más importante que un régimen estándar, o se puede determinar que el paciente es el más adecuado para un régimen estándar.

- 50 En una realización de la descripción, el sujeto es un sujeto sin protección contra la influenza, ya sea virgen o que no ha respondido previamente a la infección o vacunación contra la influenza. De manera adecuada, el sujeto es una persona de edad avanzada (p. ej., de al menos 60 años o más).

- 55 En otra realización de la descripción, el sujeto es un paciente afectado con cualquier afección que da lugar a inmunodeficiencia (terapia inmunosupresora, inmunodeficiencia primaria o secundaria) o un paciente diagnosticado con factores de co-morbilidad (como enfermedades crónicas cardíacas y pulmonares, metabólicas y neurodegenerativas). En una realización particular, el paciente es un paciente infectado con VIH. En otra realización particular, el paciente está afectado con una enfermedad crónica que da lugar a una función inmune alterada o

inmunosenescencia como un paciente con diabetes que incluye diabetes mellitus, un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o un paciente con enfermedad de células falciformes.

- 5 Se aplican internacionalmente los estándares para medir la eficacia de las vacunas de la influenza. Las variables serológicas se evalúan de acuerdo con los criterios de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos de uso humano (CHMP/BWP/214/96, Comité de la Propiedad de Medicamentos (CPMP). Nota para la armonización de requisitos para las vacunas contra la influenza, 1997. CHMP/BWP/214/96 circular N°. 96-0666: 1-22) para ensayos clínicos relacionado con los procedimientos de licencia anual de las vacunas de la influenza (Tabla a continuación).

Criterio CHMP

	18-60 años	> 60 años
Tasa de conversión*	>40%	>30%
Factor de conversión**	>2,5	>2,0
Tasa de protección***	>70%	>60%

- 10 * La tasa de seroconversión se define como la proporción de sujetos en cada grupo que tiene un título protector posterior a la vacunación > 1:40. La tasa de seroconversión simplemente es el % de sujetos que tienen un título de HI de <1:10 antes de la vacunación y >1:40 después de la vacunación. Sin embargo, si el título inicial es >1:10, entonces debe haber al menos un aumento de cuatro veces en la cantidad de anticuerpos después de la vacunación.

- 15 ** El factor de conversión se define como el aumento de veces en los títulos medios geométricos de HI en suero (GMTs) después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

*** La tasa de protección se define como la proporción de sujetos que fueron seronegativos antes de la vacunación y tienen un título de HI después de la vacunación (protector) de > 1:40 o que fueron seropositivos antes de la vacunación y tuvieron un aumento significativo de 4 veces el título después de la vacunación; normalmente se acepta como indicativo de protección.

- 20 Los requerimientos son diferentes para poblaciones adultas (18-60 años) y poblaciones de edad avanzada (>60 años). Para vacunas de la influenza inter-pandémicas, al menos una de las evaluaciones (factor de seroconversión, tasa de seroconversión, tasa de seroprotección) debe cumplir con los requisitos europeos para todas las cepas de influenza incluidas en la vacuna.

Kits:

- 25 En un sexto aspecto, la descripción se refiere a un kit adecuado para realizar los métodos de la invención en donde dicho kit comprende los medios para medir los niveles de expresión de hs-PCR, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163.

- 30 En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un kit adecuado para realizar los métodos de la invención en donde dicho kit comprende los medios para medir los niveles de expresión de hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163.

En una realización de la descripción, el kit comprende anticuerpos marcados que se unen a hs-PCR y/o IL-6, I-FABP y al menos un marcador de activación de monocitos seleccionado del grupo que consiste en sCD14 y sCD163.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

- 35 Ejemplo: Asociación de altos niveles de plasma de hs-CRP, IL-6, I-FABP y sCD14 identifica pacientes mayores con alto riesgo de desarrollar infecciones asociadas con la atención sanitaria.

Métodos

Diseño del estudio

- 40 Se usan datos de un estudio de cohorte prospectivo (Laurent M, Bories PN, Le Thuaut A, Liuu E, Ledudal K, Bastuji-Garin S, y cols. Impact of comorbidities on hospital-acquired infections in a geriatric rehabilitation unit: prospective study of 252 patients. J. Am. Med. Dir. Assoc. oct 2012; 13(8): 760.e7-12) realizado entre julio de 2006 y noviembre de 2008 en un hospital Universitario (1.300 camas) en el área de Paris, Francia. La cohorte comprende 252 caucásicos consecutivos de 75 años de edad o más que fueron remitidos a una unidad de rehabilitación geriátrica por unidades médicas o quirúrgicas agudas durante el periodo de estudio. Los criterios de inclusión fueron el estado médicamente estable al ingreso; necesidad de cuidados y rehabilitación a largo plazo; y ausencia de enfermedad terminal (p. ej.,
- 45

malignidad no controlada o demencia severa), fiebre, infección, cáncer o disfunción inmunológica conocida. No fueron elegibles los pacientes tratados con corticosteroides o inmunosupresores y aquellos que permanecieron menos de 48 horas en la unidad de rehabilitación. Los pacientes se siguieron hasta el alta de la unidad de rehabilitación o hasta 3 meses después de la inclusión. Se incluyeron en el estudio los 121 pacientes para los que las muestras de suero de referencia estaban aún disponibles. El estudio fue aprobado por el comité de ética de Ile-de-France IX en París, Francia (#SCR06010). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente antes de su inclusión en la cohorte.

Evaluación de infecciones adquiridas en el hospital

Como se describió anteriormente, la HAI se definió como una infección bien documentada que no estaba presente ni incubándose al ingreso y que cumplía con la definición de infección nosocomial de los Centros para el Control de Enfermedades de infección nosocomial (Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Huges JM. Las definiciones del CDC de enfermedades nosocomiales, 1988. Am. J. Infect. Control. Junio 1988; 16(3): 128-40). El procedimiento para determinar las HAIs se describe en el Material Complementario.

Recogida de datos

Los técnicos cegados al estado del paciente evaluaron hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD14 en muestras de suero de referencia. Para cada paciente, se recopilaron los dos factores principales de riesgo conocidos para las HAIs-co-morbilidades y procedimientos invasivos- de manera rutinaria en un formulario estandarizado.

Análisis estadístico

Se describieron las variables cualitativas como un número (%) y se compararon usando la prueba de Chi² o la prueba exacta de Fischer, como apropiadas. Las variables cuantitativas se describieron como la mediana [percentiles 25^o-75^o] y se compararon usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se compararon los grupos con y sin HAI con respecto a las siguientes características basales: co-morbilidades (puntuación CIRS-G), procedimientos invasivos y niveles de cuatro marcadores de laboratorio (hs-PCR, IL-6, I-FABP y sCD14) (Tabla 1). Se calcularon las razones de momios ("odd ratios", OR) invariables con sus intervalos de confianza del 95% (95%CI) usando modelos de regresión logística. Debido a su distribución sesgada, CIRS-G, hs-PCR, IL-6 y sCD14 se transformaron logarítmicamente; se proporcionan las ORs y los 95%CI para una desviación estándar 1 (SD) en los valores transformados logarítmicamente. Se realizaron análisis pareados para evaluar las interacciones y factores de confusión ajustándolos a modelos multiplicativos. Cuando se encontró una interacción significativa, se construyó una variable compuesta. Para esta etapa, se categorizaron los valores variables cuantitativos como por debajo o dentro del cuartil más alto (Q3; codificado 0 o 1, respectivamente) o como por debajo o por encima del valor medio (Q2; codificado 0 o 1, respectivamente), como apropiados. Ya que tanto hs-PCR como IL-6 son marcadores inflamatorios, se consideraron dos modelos separados, uno que combina hs-PCR, I-FABP y sCD14 y el otro usando IL-6 en lugar de hs-PCR. Luego, se usaron modelos multivariados para evaluar si estos marcadores se asociaban con el riesgo de HAI de manera independiente a partir de las co-morbilidades y los procedimientos invasivos.

Se realizó un ensayo de sensibilidad entre los pacientes que permanecieron al menos 5 días en la unidad de rehabilitación, bajo la hipótesis de que la estancia de 48 horas requerida para el análisis principal podría ser demasiado corta para que las HAIs se volvieran sintomáticas.

Todas las pruebas fueron de dos vías y los valores $P \leq 0,05$ se consideraron significativos. No se realizaron ajustes para las comparaciones múltiples. Los datos se analizaron usando el paquete informático STATA SE12.0 (StataCorp, College Statio, TX).

Resultados

Características de referencia

La Tabla 1 muestra las características basales de los 121 pacientes. La duración de sus estancias promedio en la unidad de rehabilitación fue de 45 días (intervalo, 3-91). Al menos se diagnosticó una HAI en 62 pacientes. Los sitios más comunes de HAI fueron el tracto respiratorio (50%; 31/62) y el tracto urinario (38,7%; 24/62). El tiempo medio hasta el diagnóstico de HAI después de la admisión a la unidad de rehabilitación fue de 12 días (intervalo, 2-62).

Las co-morbilidades y procedimientos invasivos estaban significativamente asociados con la HAI posterior, mientras el recuento de linfocitos de referencia no.

Asociaciones que vinculan los niveles basales de biomarcadores con la infección hospitalaria posterior (HAI)

Los niveles basales de hs-PCR, IL-6 y s-CD14 estaban significativamente asociados con la aparición de HAI ($P < 0,05$), mientras que solamente se observó una tendencia de asociación para I-FABP (Tabla 1).

Identificación de pacientes con alto riesgo de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (HAIs)

En análisis conjuntos, se observó una interacción significativa de tercer grado para los niveles séricos de hs-PCR, I-FABP y sCD14; así como interacciones de segundo grado para cada una de las tres parejas formadas con estas tres

variables. Por lo tanto, se construyeron variables compuestas que combinaban hs-PCR (\geq Q2 frente a $<$ Q2), I-FABP (\geq Q3 frente a $<$ Q3) y sCD14 (\geq Q2 frente a $<$ Q2). Ya que el alto riesgo era menos en pacientes con valores de hs-PCR por debajo del valor medio, independientemente de sus niveles de I-FABP y sCD14, todos estos pacientes se juntaron en una categoría de referencia. Como se muestra en la Tabla 2 (modelo 1), la elevación de hs-PCR estaba asociada con un riesgo significativamente más alto de HAI cuando el nivel de I-FABP estaba en el cuartil más alto (OR, 4; 95%CI, 1,39-11,49; P=0,010).

Después se consideraron los niveles de I-FABP y de sCD14 (Tabla 2, modelo 2). Los pacientes con altos niveles de todos los tres marcadores tenían un riesgo 11 veces más alto de HAI (OR, 10,8; 95%CI, 2,28-51,1; P=0,003). En contraste, la elevación combinada de hs-PCR y de I-FABP sin elevación de sCD14 no estaba asociada con un riesgo significativamente más alto de HAI.

Cuando se sustituyeron la IL-6 por la hs-PCR como el marcador para la inflamación de bajo grado, los resultados no cambiaron (Tabla 2, modelo 2): la elevación de IL-6 (\geq mediana) se asoció con un riesgo significativamente más alto de HAI cuando el nivel de I-FABP estaba en el cuartil más alto y los pacientes con altos niveles de todos los tres marcadores tenían un riesgo 6 veces más alto de HAI.

Se sugirió que el término "perfil de riesgo del biomarcador" para designar la combinación de altos niveles de hs-PCR o IL-6, I-FABP y sCD14.

Asociación entre el perfil de riesgo del biomarcador y el riesgo de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (HAIs)

Se informó anteriormente que las co-morbilidades y los procedimientos invasivos eran los principales factores de riesgo para las HAIs (Plonquet A, Bastuji-Garin S, Tahmasebi F, Brisacier C, Ledukal K, Farcet J, y cols. El fenotipo de riesgo inmune está asociado con infecciones nosocomiales pulmonares en pacientes internos de avanzada edad. *Immun. Ageing A.* 2011; 8:8). El ajuste para estos dos factores en el análisis de multivarianza tiene poco efecto en estos resultados: el perfil de riesgo del biomarcador que usa la hs-PCR se mantuvo asociado con un riesgo de HAI 10 veces más alto después del ajuste para la dependencia de acuerdo con el criterio CIRS-G o para los procedimientos invasivos (Tabla 3, modelo 1). Del mismo modo, el perfil de riesgo del biomarcador que usa la IL-6 se mantuvo asociado con un riesgo de HAI 5 veces más alto después del ajuste para la dependencia de acuerdo con el criterio CIRS-G o para los procedimientos invasivos (Tabla 3, modelo 2).

Análisis de sensibilidad

Los análisis realizados entre los 100 pacientes que permanecieron al menos 5 días en la unidad de rehabilitación produjeron resultados muy similares (Tabla 4). El perfil de riesgo del biomarcador con hs-PCR estaba asociado con un perfil de riesgo de HAI 13 veces más alto después del ajuste para la dependencia de acuerdo con el criterio CIRS-G o para los procedimientos.

Tabla 1: Características de línea de base de la población general del estudio (N=121) y de los subgrupos con y sin infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (análisis univariado)

	General (N=121)	Infección asociada con la asistencia sanitaria		Análisis univariado OR (95%CI)	Valor P ^a
		No 59 (48,8%)	Si 62 (51,2%)		
Características generales					
Edad, mediana (Q1-Q3), años	84 (81-90)	84 (80-90)	85,5 (81-89)	1,01 (0,95-1,08)	0,77
Género femenino, N (%)	91 (75,2)	45 (76,3)	46 (74,2)	0,89 (0,39-2,04)	0,79
Procedimientos invasivos, N (%)	38 (31,4)	9 (15,3)	29 (46,8)	4,88 (2,05-11,62)	<0,001
CIRS-G, mediana (Q1-Q3)	11 [10-14]	10 [9-13]	13 [10-15]	1,84 (1,20-2,82)	0,005
Parámetros biológicos					
Células blancas sanguíneas (x10 ⁹ /l)	6,9 (5,6-8,3)	6,5 (5,6-8,0)	7,2 (5,7-8,6)	1,11 (0,83-1,48)	0,18
hs-PCR (mg/l), mediana (Q1-Q3)	6,43 (2,11-13)	6,02 (1,51-11)	6,59 (4,23-13,43)	1,54 (1,02-2,33) ^b	0,047
IL6 (pg/ml), mediana (Q1-Q3)	5,70 (3,14-9,86)	4,99 (2,67-9,46)	6,30 (4,34-10,27)	1,47 (1,02-2,12) ^b	0,04
I-FABP (pg/ml), mediana (Q1-Q3) (n=2)	1.428 (951-2.455)	1.413 (938-2.004)	1.510 (1.037-3.057)	1,50 (1,00-2,24) ^b	0,06
sCD14 (μ g/ml), mediana (Q1-Q3) (n=9)	0,68 (0,60-0,77)	0,65 (0,58-0,75)	0,71 (0,61-0,81)	1,55 (1,11-2,16) ^b	0,02

Abreviaturas: OR, Razón de momios; 95%CI, intervalo de confianza del 95%; CIRS-G, Escala acumulativa de calificación de enfermedad para geriatría; N, número de pacientes; Q1-Q3, percentil 25th-75th; hs-PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; (n=), número de pacientes con falta de datos

^a Valor P obtenido durante el uso de la prueba de Mann-Whitney no paramétrica, prueba de Chi2 o prueba exacta de Fischer, según sea apropiado

^b Las razones de momios se calcularon para un aumento de 1 desviación estándar en los valores logarítmicamente transformados

Tabla 2: Riesgo de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria de acuerdo con los niveles séricos de hs-PCR, I-FABP y sCD14 (análisis univariado que usa modelos de regresión logística)

		Modelo 1 ^b		Modelo 2 ^b	
		OR 95%CI	Valor P	OR 95%CI	Valor P
Hs-PCR < Q2 (6,02 mg/l) N=55 HAI: 25 (45,5%)		1 (categoría de referencia)		1 (categoría de referencia)	
I-FABP < Q3 (2.004 pg/l), N=36; HAI: 17 (47,2%)		0,89 [0,39-2,02]	0,78	sCD14 < Q2 (0,65 µg/ml), N=14, HAI: 5 (35,7%)	0,67 [0,20-2,25]
I-FABP > Q3 (N=26; HAI: 20 (76,9%))		1,00 [1,30-17,49]	0,93	sCD14 > Q2 N=22, HAI: 11 (50,0%)	1,44 [0,53-3,89]
sCD14 < Q2 (N=6; HAI: 2 (33,3%))		0,60 [0,12-3,55]	0,57		
sCD14 > Q2 (N=50; HAI: 39 (78%))		10,96 [2,39-51,11]	0,003		
Análisis de sensibilidad que usa IL6 en lugar de hs-PCR para evaluar la inflamación de bajo grado					
IL6 < Q2 (4,99 pg/l) N=52 HAI: 22 (42,3%)		1 (categoría de referencia)		1 (categoría de referencia)	
I-FABP < Q3 (2.004 pg/l), N=36, HAI: 18 (50%)		1,24 [0,55-2,80]	0,61	sCD14 < Q2 (0,65 µg/ml), N=15, HAI: 6 (40%)	0,91 [0,28-2,93]
I-FABP > Q3 (N=27; HAI: 20 (74,1%))		6,36 [1,46-10,67]	0,009	sCD14 > Q2, N=21, HAI: 12 (57,1%)	1,82 [0,65-5,06]
sCD14 < Q2 (N=5; HAI: 2 (40%))		0,91 [0,14-5,91]	0,92		
sCD14 > Q2 (N=22; HAI: 16 (72,7%))		5,14 [1,82-10,65]	0,003		

Abreviaturas: hs-PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; I-FABP, proteína intestinal de unión a ácidos grasos; sCD14, CD14 soluble; OR, Razón de momios; 95%CI, intervalo de confianza al 95%; N, número de pacientes; Q2, valor medio; Q3, percentil 75^a

5 ^a El modelo 1 tiene en cuenta una combinación de niveles de hs-PCR (IL6) y I-FABP codificados como sigue: 0 si hs-PCR (IL6) < Q2 cualquiera que sea el nivel de I-FABP; 1 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, y I-FABP < Q3; y 2 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2 y I-FABP ≥ Q3.

10 ^b El modelo 2 tiene en cuenta una combinación de niveles de hs-PCR (IL6), I-FABP y sCD14 codificados como sigue: 0 si hs-PCR (IL6) < Q2 cualquiera que sean los niveles de I-FABP y sCD14; 1 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP < Q3 y sCD14 < Q2; 2 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP < Q3 y sCD14 ≥ Q2; 3 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3, y sCD14 < Q2; y 4 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3, y sCD14 ≥ Q2.

Tabla 3: Riesgo de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria de acuerdo con los niveles séricos de PCR, I-FABP y sCD14 ajustados para los principales factores de riesgo para las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (análisis de regresión logística multivariado)

	OR (95%CI)	Valor P
Modelo con procedimientos invasivos^a		
Procedimientos invasivos ^b	4,70 (1,84-12,01)	0,001
hs-PCR \geq Q2, I-FABP \geq Q3 y sCD14 \geq Q2	9,62 (2,04-45,4)	0,004
Modelo con CIRS-G^a		
CIRS-G	1,14 (1,01-1,28)	0,029
hs-PCR \geq Q2, I-FABP \geq Q3 y sCD14 \geq Q2	9,45 (2,05-43,69)	0,004
Análisis de sensibilidad que usa IL6 en lugar de hs-PCR para evaluar la inflamación de bajo grado		
Modelo con procedimientos invasivos^a		
Procedimientos invasivos ^b	4,83 (1,90-12,27)	0,001
IL6 \geq Q2, I-FABP \geq Q3 y sCD14 \geq Q2	5,0 (1,50-16,64)	0,009
Modelo con CIRS-G^a		
CIRS-G	1,15 (1,02-1,29)	0,024
IL6 \geq Q2, I-FABP \geq Q3 y sCD14 \geq Q2	4,68 (1,44-15,7)	0,01

Abreviaturas: OR, Razón de momios; 95%CI, intervalo de confianza al 95%; hs-PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; CIRS-G, Escala acumulativa de calificación de enfermedad para Geriátría; Q2, valor mediano; Q3, percentil 75^o

5 ^a Para estos modelos, en lugar de usar las combinaciones previas de los niveles de hs-PCR (IL6), I-FABP y sCD14 (hs-PCR (IL6) < Q2 cualquiera que sean los niveles de I-FABP y sCD14; hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP < Q3 y sCD14 < Q2; hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP < Q3 y sCD14 ≥ Q2; hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3 y sCD14 < Q2); y hs-PCR (IL-6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3 y sCD14 ≥ Q2), se compararon hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3 y sCD14 ≥ Q2 frente a todas las demás categorías agrupadas.

10 ^b Los procedimientos invasivos registrados para cada paciente hasta que se produjo la HAI o el paciente fue dado de alta de la unidad de rehabilitación incluyeron catéter intravenoso , catéter urinario permanente, catéter urinario intermitente, endoscopia de tracto gastrointestinal, sonda nasogástrica, colonoscopia y broncoscopia.

Tabla 4: Riesgo de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria de acuerdo con los niveles séricos de hs-PCR, I-FABP y sCD14 entre los 100 pacientes que permanecieron al menos cinco días en la unidad de rehabilitación (análisis univariado y multivariado que usa modelos de regresión logística)

	Modelo 1 ^b		Modelo 2 ^b	
	OR 95%CI	Valor P	OR 95%CI	Valor P
Hs-PCR < Q2 (4,8 mg/l) N=40 HAI: 15 (37,5%)	1 (categoría de referencia)		1 (categoría de referencia)	
I-FABP < Q3 (2.106 pg/l), N=32, HAI: 15 (46,9%)	1,40 [0,56-3,53]	0,47	sCD14 < Q2 (0,65 µg/ml), N=11, HAI: 5 (35,7%)	0,95 [0,24-3,81]
PCR ≥ Q2 N=37			sCD14 ≥ Q2, N=21, HAI: 11 (52,4%)	0,27
I-FABP ≥ Q3 N=35 HAI: 19 (54,3%)	5,46 [1,72-16,16]	0,004	sCD14 < Q2 N=7, HAI: 3 (42,9%)	1,25 [0,25-6,37]
PCR ≥ Q2 N=35 HAI: 19 (54,3%)	5,46 [1,72-16,16]	0,004	sCD14 ≥ Q2, N=19, HAI: 13 (68,4%)	0,002
Modelo con procedimiento invasivo^c				
Al menos 1 procedimiento invasivo ^d				Valor P
		6,78 (2,32-19,84)		<0,001
Hs-PCR ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3 y sCD14 ≥ Q2		11,27 (2,29-55,45)		0,003
Modelo con CIRS-G^e				
CIRS-G		1,14 (1,00-1,30)		0,047
Hs-PCR ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3 y sCD14 ≥ Q2		9,82 (2,08-46,44)		0,004

5 Abreviaturas: hs-PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; I-FABP, proteína intestinal de unión a ácidos grasos; sCD14, CD14 soluble; OR, Razón de momios; 95%CI, intervalo de confianza al 95%; N, número de pacientes; Q2, valor medio; Q3, percentil 75^o, CIRS-G, Escala acumulativa de calificación de enfermedad para Geriatria

^a El modelo 1 tiene en cuenta una combinación de niveles de hs-PCR (IL6) y I-FABP codificados como sigue: 0 si hs-PCR (/)IL6 < Q2 cualquiera que sea el nivel de I-FABP; 1 si hs-PCR (/)IL6 ≥ Q2 y I-FABP < Q3; y 2 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2 y I-FABP ≥ Q3.

5 ^b El modelo 2 tiene en cuenta una combinación de niveles de hs-PCR (IL6), I-FABP y sCD14 codificados como sigue: 0 si hs-PCR (IL6) < Q2 cualquiera que sean los niveles de I-FABP y sCD14; 1 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP < Q3 y sCD14 < Q2; 2 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP < Q3 y sCD14 ≥ Q2; 3 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3, y sCD14 < Q2; y 4 si hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3, y sCD14 ≥ Q2.

^c Para estos modelos, en lugar de usar las combinaciones anteriores de niveles de hs-PCR (IL6), I-FABP y sCD14, se compararon hs-PCR (IL6) ≥ Q2, I-FABP ≥ Q3 y sCD14 ≥ Q2 frente a todas las demás categorías agrupadas.

10 ^d Los procedimientos invasivos registrados para cada paciente hasta que se produjo la HAI o el paciente fue dado de alta de la unidad de rehabilitación incluyeron catéter intravenoso, catéter urinario permanente, catéter urinario intermitente, endoscopia de tracto gastrointestinal, sonda nasogástrica, colonoscopia y broncoscopia.

Conclusión

15 Se evaluó si los biomarcadores de inflamación asociados con la translocación microbiana precedían al riesgo de HAI. En pacientes de 75 años o más y admitidos en una unidad de rehabilitación geriátrica, las elevaciones concomitantes en los niveles de tres biomarcadores (hs-PCR, I-FABP y sCD14) se asociaron con un riesgo 11 veces mayor de HAI. El ajuste en dos factores de riesgo conocidos, co-morbilidades y procedimientos invasivos, no cambiaron las asociaciones que vinculan los tres marcadores con el riesgo de HAI. Usando otros marcador inflamatorio, la IL-6, se obtuvieron resultados similares, lo que sugiere que este perfil de biomarcadores de riesgo puede ayudar a identificar a los pacientes con altos riesgos de HAI.

20 La inmunosenescencia es un proceso multifactorial cuyo componente es la inflamación de bajo nivel, conocida como inflamación. Nuestro estudio apoya la translocación microbiana como un contribuyente al aumento del riesgo de HAI observado en personas mayores. Por lo tanto, los pacientes con altos niveles de hs-PCR o IL-6 y de I-FABP exhibieron un riesgo 4 veces mayor de HAI. La translocación microbiana desempeña un papel clave en impulsar la activación inmune persistente, como se muestra en pacientes infectados con VIH (Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30: 149-73). El envejecimiento puede inducir una alteración de la barrera intestinal comparable a la causado por el VIH. Por lo tanto, las células endoteliales envejecidas tienen mutaciones mitocondriales que afectan a su progenie en la mucosa (Saffrey MJ. Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. *Age Dordr Neth.* Junio 2014; 36(3): 9603), y el envejecimiento está asociado con la remodelación de las uniones estrechas entre las células epiteliales (Tran L, Greenwood-Van Meerveld B. Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Sept. 2013; 68(9): 1045-56). El control local de los microorganismos que atraviesan la barrera intestinal también se puede ver comprometido por muchas alteraciones inmunológicas relacionadas con la edad, como la quimiotaxis y la fagocitosis alteradas, la expresión alterada de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), la activación de estos receptores por ligandos endógenos asociados con el daño celular y eventos alterados de señalización corriente debajo de la activación de los PRR lo que da como resultado la secreción de citoquinas (Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* Dic. 2013; 13(12): 875-87).

30 El sCD14 alto en plasma fue uno de los tres componentes del perfil de biomarcadores de riesgo identificado en este estudio. Los niveles de sCD14 en plasma reflejan la activación de monocitos. El LPS, encontrado en la membrana de las bacterias Gram-negativas, es un potente activador de monocitos que se une al CD14 e induce la liberación de sCD14. En estudios anteriores, los niveles de sCD14 estaban asociados con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular clínica futura en adultos mayores (Reiner AP, Lange EM, Jenny NS, Chaves PHM, Ellis J, Li J, y cols. Soluble CD14: genomewide association analysis and relationship to cardiovascular risk and mortality in older adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* En. 2013; 33(1): 158-64) y un alto riesgo de mortalidad en el shock séptico gram-negativo (Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, y cols. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis.* Mar. 1995; 171(3): 639-44). En otro estudio, la proteína de unión a LPS, otro biomarcador de translocación microbiana se asoció con la función física en adultos mayores sanos, mientras el sCD14 se asoció con varios marcadores inflamatorios pero no con la función física (Stehle JR, Leng X, Kitzman DW, Nicklas BJ, Kritchevsky SB, High KP. Lipopolysaccharide-binding protein, a surrogate marker of microbial translocation, is associated with physical function in healthy older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* nov. 2012; 67(11): 1212-8).

35 En nuestro estudio, la elevación de I-FABP consistente con la ruptura de la barrera intestinal se asoció con el riesgo de HAI solamente cuando también se elevó el sCD14, lo que indica la activación de monocitos, es decir, la penetración de microorganismos intestinales y/o sus productos en la circulación sistémica. En pacientes con altos niveles de hs-PCR y I-FABP, pero niveles bajos de sCD14, el riesgo HAI era similar al de los pacientes con niveles normales de hs-PCR. Este hallazgo sugiere que la ruptura de la barrera intestinal puede dar lugar a la translocación microbiana solamente si es deficiente el sistema inmune local. El anticuerpo IgA secretorio en las superficies de las mucosas juega un papel fundamental en el control de la microbiota (Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol.* Abr. 2012; 33(4): 160-7). Se ha informado de una

5 producción deficiente de IgA en individuos de edad avanzada (Sato S, Kiyono H, Fujihashi K. Mucosal Immunosenescence in the Gastrointestinal Tract: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015; 61(4): 336-42). La combinación de la ruptura de la barrera intestinal y de la alterada inmunidad de la pared intestinal puede generar inflamación sistémica de bajo nivel, que a su vez puede afectar a la regulación de la respuesta inmune, lo que da como resultado un aumento del riesgo de HAIs. Finalmente, en pacientes con altos niveles de hs-PCR, pero niveles normales de I-FABP, pueden estar activos otros mecanismos y dar lugar a consecuencias diferentes.

10 Se usaron dos estrategias para probar la solidez de nuestros hallazgos. Primero, se repitió el análisis después de reemplazar hs-PCR con IL6, un marcador inflamatorio asociado con la inflamación en la población general (Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, y cols. Proinflammatory cytokines, aging and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc*. dic. 2013; 14(12): 877-82). Los pacientes con altos niveles de IL-6, I-FABP y sCD14 tenían un riesgo 6 veces más alto de HAI. Además, el perfil de marcadores de riesgo con IL-6 se mantuvo asociado con un riesgo de HAI 5 veces mayor después del ajuste por dependencia o procedimientos invasivos. Estos resultados apoyan un vínculo entre la translocación microbiana y la inflamación de bajo grado. En segundo lugar, se limitó el análisis a los pacientes que permanecieron al menos 5 días en la unidad de rehabilitación. La estancia de 48 horas requerida para el análisis principal puede ser demasiado corta para que las HAIs se vuelvan sintomáticas en pacientes que vienen de unidades de cuidados intensivos. De nuevo, estos resultados no sufrieron esencialmente cambios, con un riesgo de HAI 13 veces más alto entre pacientes con altos niveles de todos los tres marcadores. Además, el tiempo medio para el diagnóstico de HAI fue de 12 días. Estos datos sugieren que la elevación de los tres marcadores al ingreso estaba unida a inflamación de bajo grado. No se tiene conocimiento de informes anteriores de que un perfil de biomarcadores de riesgo esté fuertemente asociado con HAIs en pacientes de 75 años de edad o más. Merece investigarse, si la evaluación de rutina de este perfil seguida de una prevención y monitorización intensificada, si es positiva, disminuya las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas con HAIs.

Conclusión

25 Este estudio identificó un perfil de biomarcadores de riesgo fuertemente asociado con HAIs en pacientes de 75 años de edad o más que fueron admitidos en una unidad de rehabilitación. El perfil involucra tres biomarcadores, hs-PCR o IL-6 para la inflamación sistémica, I-FABP para la ruptura de la barrera intestinal y sCD14 para la activación sistémica de monocitos.

30 Nuestros hallazgos apoyan el vínculo entre la translocación microbiana y la inflamación de bajo grado observada en algunos pacientes mayores con HAI e identifican una combinación de biomarcadores como un factor de riesgo para HAI. Se necesita más investigación para elucidar el papel de la inflamación de bajo grado y la translocación microbiana en las HAIs. Sin embargo, desde un punto de vista clínico, nuestros hallazgos sugieren que los tres biomarcadores pueden ayudar a identificar a los individuos con mayor riesgo de sufrir HAI.

REFERENCIAS

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

- 5 1. Magill, S. S., Edwards, J. R., Fridkin, S. K. & Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Survey of health care-associated infections. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2542-2543 (2014).
2. Zimlichman, E. *y cols.* Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern. Med.* **173**, 2039-2046 (2013).
3. Emori, T. G. *y cols.* Nosocomial infections in elderly patients in the United States, 1986-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *A. J. Med.* **91**, 289S-293S (1991).
- 10 4. Laurent, M. *y cols.* Impact of comorbidities on hospital-acquired infections in a geriatric rehabilitation unit: prospective study of 252 patients. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **13**, 760.e7-12 (2012).
5. Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat. Immunol.* **14**, 428-436 (2013).
- 15 6. Panda, A. *y cols.* Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* **30**, 325-333 (2009).
7. Hakim, F. T., Flomerfelt, F. A., Boyiadzis, M. & Grees, R. E. Aging, immunity and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 151-156 (2004).
8. Derhovanessian, E., Larbi, A. & Pawelec, G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 440-445 (2009).
- 20 9. Pawelec, G., Ferguson, F. G. & Wikby, A. The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 132-134 (2001).
10. Strindhall, J. *y cols.* No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *Exp. Gerontol.* **42**, 753-761 (2007).
- 25 11. Plonquet, A. *y cols.* Immune risk phenotype is associated with nosocomial lung infections in elderly in-patients. *Immun. Ageing A* **8**, 8(2011).
12. Shaw, A. C., Goldstein, D. R. & Montgomery, R. R. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 875-887 (2013).
13. Viola, J. & Soehnlein, O. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Semin. Immunol.* **27**, 184-193 (2015).
- 30 14. Serpente, M., Bonsi, R., Scarpini, E. & Galimberti, D. Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to treatment. *Neuroimmunomodulation* **21**, 79-87 (2014).
15. Klatt, N. R., Chomont, N., Douek, D. C. & Deeks, S. G. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol. Rev.* **254**, 326-342 (2013).
- 35 16. Brenchley, J. M. & Douek, D. C. Microbial translocation across the GI tract. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 149-173 (2012).
17. Sandler, N. G. & Douek, D. C. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 655-666 (2012).
18. Tran, L. & Greenwood-Van Meerveld, B. Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **68**, 1045-1056 (2013).
- 40 19. Pelsers, M. M. A. L. *y cols.* Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin. Biochim.* **36**, 529-535 (2003).
20. Shozushima, T. *y cols.* Usefulness of presepsina (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* **17**, 764-769 (2011).
- 45 21. Ulla, M. *y cols.* Diagnostic and prognostic value of presepsina in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R168 (2013).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad del paciente a las infecciones asociadas a la atención sanitaria (HAI), que comprende una etapa de determinar el nivel de expresión de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-PCR), la proteína de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (I-FABP) y el CD14 soluble (sCD14) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente en donde dicho paciente es un individuo de edad avanzada.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una etapa de comparar dichos niveles de expresión con niveles de referencia predeterminados, en donde un aumento en los niveles de expresión de hs-PCR, I-FABP y sCD14 es indicativo de ser susceptible a HAI.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es una muestra de sangre.