



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

NOVES TECNOLOGIES PER AL DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA SÈPSIA

Elena Jordana Lluch

2015



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Genètica i Microbiologia



Universitat Autònoma
de Barcelona

Noves tecnologies per al diagnòstic molecular de la sèpsia

Memòria presentada per Elena Jordana Lluch per a optar al grau de Doctora en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Vist-i-plau dels directors de la tesi:

Dr. Vicenç Ausina Ruiz

Dra. Elisa Martró Català

Dra. Montserrat Giménez Pérez

Es hermoso lo que vemos.
Más hermoso lo que sabemos.
Pero mucho más hermoso lo que
desconocemos.

Niels Steensen

La experiencia no es lo que te sucede,
sino lo que haces con lo que te sucede.

Aldous Huxley

El campo de la ciencia es inagotable.
Cuanto más se investiga, más grandes
son los tesoros que se ofrecen a
nuestra mirada.

Louis Pasteur

May your hands always be busy,
may your feet always be swift,
may you have a strong foundation
when the winds of changes shift.

Bob Dylan

Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo.

Albert Einstein

Per a tu papa,
vas marxar massa prompte;
i per a vatros, mama i Ester, que
sempre esteu al meu costat.

Gràcies per ajudar-me a ser qui sóc.

New technologies for the molecular diagnosis of sepsis

| | |
|---|-----|
| <i>Acknowledgements</i> | 9 |
| Articles that conform this thesis | 17 |
| <i>Abbreviations</i> | 19 |
| Summary | 29 |
| <i>Introduction</i> | 33 |
| Objectives | 117 |
| Article I | 123 |
| Article II | 135 |
| Results and discussion | 157 |
| Conclusions | 197 |
| References | 209 |
| Appendix I: Tables | 227 |
| Appendix II: Complementary articles | 233 |
| Appendix III: Posters | 261 |
| Comprehensive index | 274 |

* Sections in italic are written only in Catalan. Appendices contain some material in Spanish.

Elena Jordana Lluch
2015

Noves tecnologies per al diagnòstic molecular de la sèpsia

| | |
|--|-----|
| Agraïments | 9 |
| <i>Articles que conformen aquesta tesi</i> | 17 |
| Abreviatures | 19 |
| Resum | 25 |
| Introducció | 33 |
| Objectius | 111 |
| <i>Article I</i> | 123 |
| <i>Article II</i> | 135 |
| <i>Resultats i discussió</i> | 157 |
| Conclusions | 203 |
| <i>References</i> | 209 |
| Apèndix I: Taules | 227 |
| Apèndix II: Articles complementaris | 233 |
| Apèndix III: Pòsters | 261 |
| Índex detallat | 275 |

* Les seccions en cursiva estan escrites només en anglès. Els apèndix contenen material en anglès i en castellà.

Elena Jordana Lluch

2015

AGRAÏMENTS

Mentre m'enfronto a aquestes paraules, em passen pel cap mil moments viscuts. El camí ha estat molt llarg i molta gent m'hi ha acompanyat. Tothom diu que escriure els agraïments és una de les parts més difícils d'una tesi i, ara que m'hi enfronto, els he de donar la raó. A veure si me'n surto!

En primer lloc, agrair al Dr. Ausina el fet de brindar-me la oportunitat de realitzar la tesi al Servei de Microbiologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Em va permetre dedicar-me al que jo volia, la recerca, quan ja gairebé havia renunciat al somni. Gràcies a la seva capacitat d'avançar-se en el temps, de saber veure el que ha de venir, he tingut la sort de realitzar aquest viatge. Gràcies per moure cel i terra per a que aquesta tesi arribés a bon port.

A la meva co-directora, Elisa, gràcies per guiar-me durant tot el camí, per compartir tot el que saps de biologia molecular i per endinsar-te amb mi al món de la sèpsia. Valoro molt tot el que m'has ensenyat, però valoro encara més tot allò que m'has transmès sense adonar-te'n. Que la recerca és un món difícil, però que val la pena. Que hi ha dificultats, però que tenim ferramentes per a superar-les. Que s'ha de ser pacient però perseverar i no deixar mai d'intentar-ho. Tan sols desitjo que, si la vida em deixa seguir per aquest camí, ser una investigadora tan capaç com tu.

Montse, tot i que la oficialització del teu càrrec de co-directora és prou recent, et vas implicar en aquesta tesi com si ho fossis des del primer moment. Gràcies per ensenyar-me la microbiologia clàssica del diagnòstic de la sèpsia, per ensenyar-me a llegir plaques. Gràcies per matinar més del compte per a passejar-nos pels diferents Serveis per a explicar aquesta tècnica i per passar-te hores amb mi revisant les històries clíniques dels pacients. He après moltíssim al teu costat. Y M^a Dolores, aunque te incorporaste un poquito más tarde al Equipo Sepsis, gracias por dedicarme parte de tu tiempo y ayudarme siempre que lo he necesitado. También ha sido un placer aprender contigo, ¡mil gracias!

Gràcies també a les meues “compis” de despatx, Vero i Melània. Gràcies per compartir amb mi bons moments i altres que no ho han estat tant, pel bon rotllo, pels vostres consells, ajuda i sobretot, pels ànims que em transmeteu (especialment en aquesta última etapa). Dóna gust treballar amb vosaltres! Vero, gracias tu capacidad de seguir adelante y tu pasión por este trabajo, eres mi apoyo moral.

Lurdes, gràcies per oferir-me ajuda i consell científic quan ho he necessitat i, sobretot, gràcies per ser la meua guia de l'oci particular. Dóna gust poder compartir pel·lícules i llibres “freaks” amb tu! Sònia, gràcies per ajudar-me durant les meves primeres passes en aquest laboratori, per ensenyar-me les tècniques moleculars de rutina i perquè sempre m'has donat una maneta quan ho he necessitat. Vicky, gracias por compartir buenos ratos en la cafetería, por estar dispuesta a ayudarme si hace falta y por compartir tus fotos conmigo. Cristina P. i Jose, gràcies pels vostres consells, per donar-li eixe punt distés als congressos i trobades i per compartir la vostra visió de les coses, que m'ha ajudat sovint. Àgueda, gràcies per mirar sempre per nosaltres i intentar que tot vagi com ha d'anar, per buscar recursos sota les pedres, per oferir-me consell i ajuda quan ho he necessitat. També infinites gràcies per patir amb mi (i més gent) el trasbals d'enviar mostres a Genòmica amunt i avall. Ester S. i Aida, gràcies per encarregar-vos de les meves PCR a hores intempestives! Albert, gràcies per aguantar els meus monòlegs matinals de camí a Can Ruti!

Gema, gracias por tus consejos y ayuda incondicional en todos los ámbitos imaginables. Gracias por tu apoyo y sufrir conmigo esta etapa final. Y sobre todo, gracias por los momentos de confesionario sobre ruedas, donde todo vale y nada se juzga.

Carmen, Montse M. i Paqui, gràcies per encarregar-vos de que tinguem sempre tot el que ens cal per fer la nostra feina. Gràcies també per solucionar els petits entrebancs que sorgeixen (o saber qui ho pot solucionar). Y Montse S., gracias por dejarnos siempre el laboratorio reluciente, anda que no lo notamos cuando tu no estás!

A tots els companys tècnics del laboratori, gràcies per ensenyar-me i ajudar-me quan m'ha calgut. Loli, muchas gracias por enseñarme cómo se trabajan los hemocultivos y por guardarme todos los negativos durante meses para los estudios. Fede, Mari, i tots els que heu passat per recepció de mostres, mil gràcies per gestionar els meus tubs de sang, per deixar-les ara a la nevera, ara al congelador, ara amb data, ara ja no cal...perdoneu si us he marejat molt!, Eli, gracias por las risas interminables en el laboratorio y por echarme una mano siempre que lo he necesitado (sobre todo con el easyMAG) y Jessy H., gracias por buscar y rebuscar cepas y hacerme pases los fines de semana. A les “nenes de la tarde”, Natàlia i Georgina, gràcies pels vostres somriures i ànims quan em quedo fins tard i les anades de la castanya pels passadissos. Sobretot, a Natàlia i a Esther F., gràcies per ajudar-me amb el tema de la endotoxina, no ho hagués pogut fer sense vosaltres! Miguel Ángel, gracias por ser mi enfermero particular, aunque sé que en el fondo te gusta pinchar... I a la resta de companys tècnics, Maragda, Maria, Mireia, Noelia, Miguel, Luci, Marina, Marisol, Gregorio, Jordi, Javi, Dolors i tots els que heu format part d'aquesta gran família en algun moment... Gràcies per les bromes, els somriures, les rialles i eixes converses, potser intrascendents, però que fan començar el dia (o continuar amb ell) amb una mica més de bon humor.

A les secretes, per tot el que feu per facilitar-nos les coses. Cristina M., gracias, por llevar al día nuestro CV, aunque nos tengas que ir persiguiendo para que te rellenemos las fichas de formación. Ana Belén, gracias por tu buen humor perenne mientras estuviste aquí. Isa y Aroa, infinitas gracias porque siempre que tengo alguna duda o problema me respondéis con un “ven, que lo miramos ahora”. Gracias por saber sacarme una sonrisa en cualquier momento.

A les residents, Belén i Clara, per ajudar-me amb bases de dades i consentiments informats i també per compartir el vostre dia a dia amb mi. M'heu recordat quant m'agrada la microbiologia, que amb tanta molecular, de vegades, me n'oblido! Adrià, i Andreu, gràcies per fer més distret el laboratori, ja feien falta xics templatats entre tantes dones!

Agraïments

A les noies del “Despatx del fons (d’ara i sempre)”: Meissi, Alicia, Bárbara, Raquel, Esther G., Jessica D., Laura, Mar, Irene, Silvia, Loreto, Nerea, gràcies per compartir camins, dubtes i experiències (dins i fora de l’hospital). El camí es fa més planer quan viatges en companyia.

A nivell més personal, gràcies Aroa, Belén, Clara, Eli, Gema, Jessy i Meissi, per les estones de desconexió a la saleta (i fora de l’hospital), per fer de l’horòscop un esport de risc, pels moments de riure fins que et salten les llàgrimes...no tenen preu! Dels primers anys, gracias, Loreto, porque sé que tengo familia en Chile (y también un viaje pendiente). Desde que te fuiste los terremotos no son lo mismo. M^a José, me encantó formar parte de tu vida durante los meses que estuviste aquí. Al final me ganaste, Doctora!

A tot els pacients dels quals he estudiat una mostra seva, per haver accedit a participar en els nostres estudis. Al personal mèdic i d’infermeria dels Serveis d’Urgències, de Medicina Intensiva, Pediatria i Onco-Hematologia, per recollir les mostres de sang i consentiments que han possibilitat aquesta tesi.

I would like to thank Dave J. Ecker for his willingness to host me at Ibis Biosciences, and jointly with Ranga, Len and Larry, thanks for taking care that I had anything I needed while I was there. It would be impossible to name all the staff, so I won’t even try, so thanks to all for teaching me the basis of the PCR/ESI-MS, for helping me and fixing things when I messed them up. But, above all, thanks to all for making me feel like home since the first moment. It was an incredible experience sharing those months with you. I would also like to thank the European Abbott team: Martina, Guillaume, Julio, Carlos and Veronica. Thanks for making memorable the IRIDICA experience.

Tot i que queda un poc lluny, també voldria agrair a l’Isidre Gibert el haver-me acollit al seu laboratori de l’IBB. Ell és, en part, responsable de que volgués dedicar-me a la recerca. Gràcies també a l’Ignasi, l’Anaïs, la Núria, la Tània i la Lúcia, per fer inoblidable aquella temporada.

Als meus amics del poble de tota la vida i els nous que he trobat a Barcelona, que han sofert algun que altre rotllo quan els he intentat explicar de què va la meua tesi, gràcies per la vostra paciència. Sempre que vos necessito, esteu. I això és un tresor que no te preu! Sóc molt afortunada de tenir-vos a la meua vida. Josep, moltes gràcies per la coberta tan xula que m'has fet!

A les meues xiquetes, Daura, Nerea i Cate, que sou les que més m'heu sofert durant aquest camí, que m'heu escoltat, m'heu ajudat, m'heu dut a fer birres quan alguna cosa no sortia i necessitava esboirar-me. Dau, encara que és més complicat visitar-te a Múrcia que a Dublín, sempre em tindràs propet. Nerea, sables que aunque estés down under sigo siendo tu media mandarina! Cate, encara que hagi de ser per Skype, sempre em tindràs per a fer una birreta i filosofar sobre la vida.

A la meua família, responsable directa de que hagi arribat fins ací. Ester (“manger”), que es la meua fan N^o 1 (i jo la seva!), gràcies per donar-me ànims, escoltar-me, aconsellar-me i estar sempre al meu costat. Mama, gràcies pel teu amor incondicional, per la teua infinita paciència, per aguantar les meves histèries i nervis, per saber aconsellar-me, per tenir un “va, tranquil·la, que ja voràs que tot sortirà be” sempre a punt. Papa, et tinc sempre molt present, i a pesar de no ser-hi, m'ajuda molt pensar en tu i en com t'enfrontaries als problemes que em sorgeixen. Vos estimo molt!

Finalment, a la meua parella, Víctor, tinc tantes coses per les quals donar-te les gràcies que quasi podria escriure un llibre. Gràcies per fer-me d'editor personal i donar-li forma i estil a aquesta tesi (I damunt, xalar fent- ho!). Però sobretot, gràcies per patir amb mi i aguantar-me aquests últims mesos (i aquest quasi 4 anys), per escoltar-me, per animar-me, per fer-me somriure sempre, per estimar-me, per estar sempre al meu costat. Amb tu, al meu costat el cim més alt es converteix en un turonet i em sento capaç de tot. T'estimo, bitxo!

ARTICLES THAT CONFORM THIS THESIS

Article I

Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry

Elena Jordana-Lluch, Heather E. Carolan, Montserrat Giménez, Rangarajan Sampath, David J. Ecker, M^a Dolores Quesada, Josep M^a Mòdol, Fernando Arméstar, Lawrence B. Blyn, Lendell L. Cummins, Vicente Ausina, Elisa Martró.

PLoS One, 2013;8(4):e62108.

Article II

Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology in blood specimens for the molecular diagnosis of bloodstream infections

Elena Jordana-Lluch, Montserrat Giménez, M^a Dolores Quesada, Belén Rivaya, Clara Marcó, M^a Jesús Domínguez, Fernando Arméstar, Elisa Martró, Vicente Ausina.

PLoS One, 2015;10(10):e0140865

ABREVIATURES

| | |
|-----------------------------|--|
| A | Adenina |
| ACCP | <i>American College of Chest Physicians</i> |
| aPPT | <i>Activated partial thromboplastin time</i> |
| AT | <i>Antithrombin</i> |
| <i>bla</i> _{CTX-M} | Gen de resistència a β -lactàmics |
| <i>bla</i> _{kpc} | Gen de resistència al carbapenem |
| <i>bla</i> _{SHV} | Gen de resistència a β -lactàmics |
| C | Citosina |
| C(3a/5a/5b-9) | Proteïnes del sistema del complement |
| C5aR | Receptor de la proteïna c5a |
| CD(48/64) | Clúster de diferenciació 48 o 64 |
| CFU/UFC | <i>Colony for unit/unitat</i> formadora de colònia |
| CLR | <i>C-type lectin receptors</i> |
| CoNS | <i>Coagulase-negative staphylococci</i> |
| DAMPs | <i>Danger associated molecular patterns</i> |
| DIC | <i>Disseminated intravascular coagulation</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> /Àcid desoxirribonucleic |
| dNTPs | Deoxinucleòtids trifosfat |
| ELAM-1 | <i>Endothelial leukocyte adhesion molecule 1</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ER | <i>Emergency room</i> |
| ESI-TOF | <i>Electrospray ionization-time of flight</i> |
| FISH | <i>Fluorescent in situ hybridization</i> |
| FNT | Factor de necrosi tumoral |
| G | Guanina |
| Hg | Mercuri |
| HMGB-1 | <i>High-mobility group box 1 protein</i> |
| HUGTiP | Hospital Universitari Germans Trias i Pujol |
| ICAM-1 | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> |
| ICU/UCI | <i>Intensive Care Unit/Unitat de Cures</i> Intensives |
| ID | <i>Identification/Identificació</i> |

Abreviatures

| | |
|--------------------------|--|
| IFN | Interferó |
| IgG | Immunoglobulina G |
| IL | Interleuquina |
| IL-Ra | Receptor antagonista d'interleuquina |
| ITS | <i>Internal transcribed spacer</i> |
| LBP | <i>LPS-binding protein</i> |
| LPS | Lipopolisacàrid |
| LTA | Àcid lipoteicoic |
| MALDI-TOF | <i>Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight</i> |
| MCP | Proteïna atraiet de monòcits |
| <i>mecA</i> | Gen de resistència a la meticil·lina |
| MIF | <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> |
| mHDLR | <i>Monocytic human leukocyte antigen DR</i> |
| MODS | <i>Multiple organ disjunction syndrome/</i> Síndrome de Disfunció Multiorgànica |
| MS | <i>Mass spectrometry/</i> Espectrometria de masses |
| m/z | Ràtio massa/càrrega |
| NLR | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i> |
| NPV | <i>Negative predictive value</i> |
| PaCO ₂ | Pressió parcial de diòxid de carboni |
| PAMPs | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PCR/CRP (biomarcador) | Proteïna C reactiva/ <i>C reactive protein</i> |
| PCR (molecular) | <i>Polymerase chain reaction/</i> reacció en cadena de la polimerasa |
| PCR/ESI-MS | <i>PCR/electrospray ionization mass spectrometry</i> |
| PCT | Procalcitonina |
| PNA | <i>Peptide-nucleic acid</i> |
| PPV | <i>Positive predictive value</i> |
| PRP | <i>Pattern-recognition receptors</i> |

| | |
|----------------|--|
| PT | <i>Prothrombin time</i> |
| RANTES | <i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> |
| RLR | <i>Retinoic acid inducible gene 1-like receptors</i> |
| rRNA | <i>Ribosomal ribonucleic acid/ Àcid ribonucleic ribosomal</i> |
| SIDA | <i>Síndrome d'immunodeficiència adquirida</i> |
| SIRS | <i>Systemic Inflammatory response syndrome / Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica</i> |
| STREM-1 | <i>Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i> |
| sTNF | <i>Soluble tumor necrosis factor</i> |
| suPAR | <i>Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor</i> |
| T | <i>Timina</i> |
| TLR | <i>Toll-Like receptors</i> |
| TF | <i>Tissular factor / Factor tissular</i> |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TP | <i>Temps de positivitat</i> |
| vanA | <i>Gen de resistència a la vancomicina</i> |
| vanB | <i>Gen de resistència a la vancomicina</i> |

RESUM

La sèpsia és la resposta sistèmica de l'organisme, en la que es produeixen un conjunt de canvis humorals i cel·lulars, com a resposta a la invasió sanguínia per microorganismes i/o les seves toxines. En l'evolució clínica del pacient intervindran diferents factors com les característiques del microorganisme (inòcul, virulència), la immunocompetència de l'hoste (patologia de base, factors genètics,...) i la rapidesa en administrar el tractament antibiòtic i de suport adequats. Degut a l'augment de l'expectativa de vida i dels tractaments i manipulacions exploratòries cada vegada més agressius, la incidència de sèpsia s'incrementa any darrere any. Aquesta síndrome té una mortalitat elevada, essent-ne la primera causa a la Unitats de Cures Intensives. A més a més, s'ha demostrat que aquesta s'incrementa en els malats que reben un tractament antibiòtic inadequat. Per tant, la rapidesa en l'obtenció del diagnòstic microbiològic és crucial per a la disminució de la mortalitat.

Actualment, el mètode de referència (*gold standard*) per al diagnòstic microbiològic de la sèpsia continua sent l'hemocultiu. La seva principal limitació és la mitjana de 15 hores d'incubació per a l'obtenció d'un resultat positiu i després, de 24-48 hores més per a la identificació i l'antibiograma, el que pot implicar un retard en l'aplicació d'una teràpia antibiòtica efectiva. A més a més, en els malats en que ja s'ha administrat alguna dosi d'antibiòtic prèviament a la inoculació de l'hemocultiu, el rendiment de les tècniques microbiològiques convencionals és baix, el que fa que, en moltes ocasions, no s'arribi al diagnòstic etiològic i, per tant, es desconegui la sensibilitat als antibiòtics del microorganisme causant de la sèpsia. Tot i que fa diversos anys que existeixen assajos moleculars comercialitzats per a aquesta finalitat, només un (SeptiFAST, Roche, Manheim, Alemanya) ha estat extensament avaluat en l'àmbit hospitalari donant resultats variables i encara no ha estat àmpliament implementat.

En aquesta tesi doctoral s'ha avaluat la utilitat de la tecnologia PCR/ESI-MS per al diagnòstic molecular de la sèpsia. Aquesta tècnica es basa en una PCR d'ampli espectre seguida d'una espectrometria de masses d'io-

nització per electrospray i permet la identificació de bacteris i fongs a partir de mostra directa en unes 6 h. Durant l'avaluació de la primera versió (PLEX-ID), es van obtenir resultats prometedors però la sensibilitat de l'assaig era moderada (43,5 %) en comparació del mètodes convencionals de diagnòstic. Tot i això, aquesta tecnologia va ser capaç de detectar fins a 12 microorganismes clínicament significants que no van ser aïllats per l'hemocultiu. Degut a aquesta sensibilitat insuficient, es va redissenyar la tecnologia. La nova versió, anomenada IRIDICA, presenta com a canvi més important la utilització de 5 mL de sang (en comparació dels 1,250 mL utilitzats amb el PLEX-ID). Amb la nova versió de la tecnologia s'ha obtingut una sensibilitat del 73 % en comparació amb els mètodes convencionals. A més a més, IRIDICA va detectar fins a 41 microorganismes clínicament significatius en pacients amb hemocultiu negatiu, la majoria dels quals ja havien rebut tractament antibiòtic.

Aquesta tesi també explora la utilitat d'aquesta tècnica en diferents tipus de pacients. Es van analitzar mostres de pacients provinents del Servei d'Urgències i de pacients ingressats a la Unitat de Cures Intensives. En aquest últim grup, IRIDICA va demostrar una millor sensibilitat (83 %) en comparació als mètodes convencionals. Aquests resultats són concordants amb un estudi multicèntric recentment publicat on s'avalua aquesta tècnica per al diagnòstic molecular de la sèpsia en malats crítics i que inclou pacients diferents Unitats de Cures Intensives de sis països europeus.

Per tant, IRIDICA és un sistema robust, ràpid i fiable per a la detecció de microorganismes en sang total. La utilització d'aquest sistema tindria més rellevància en malats crítics, i permetria una identificació precoç del microorganisme causant de la sèpsia. Per tant, es podria adequar abans el tractament antibiòtic, millorant la taxa de supervivència i el maneig del pacient. A més a més, permetria augmentar el nombre de casos confirmats microbiològicament, incloent els pacients que ja estan en tractament amb antimicrobians.

SUMMARY

Sepsis is a systemic response of the organism to the invasion by microorganisms and/or their toxins in the blood, characterized by a variety of humoral and cellular changes. Several factors will influence the clinical outcome of the patient, such as the characteristics of the microorganism (inoculum, virulence), immunocompetence of the host (pathology, genetic factors, etc.) and the time elapsed until the administration of antibiotic treatment and appropriate support. Due to increased life expectancy and more aggressive treatments in addition to exploratory manipulations, the incidence of sepsis increases every year. This syndrome has a high mortality rate, being the first cause of death in the Intensive Care Unit. Moreover, it has been shown that mortality is higher in patients receiving inadequate antibiotic treatment. Therefore, obtaining a rapid microbiological diagnosis is crucial to the decrease in mortality. Currently, the reference method (gold standard) for the microbiological diagnosis of sepsis is blood culture. Its main limitation is the average of 15 hours of incubation needed to obtain a positive result, and the additional 24–48 hours needed for identification and antimicrobial susceptibility testing, which may cause a delay in the implementation of an effective antibiotic therapy. Furthermore, in patients who are already under antibiotic treatment prior to the inoculation of the blood culture, the performance of conventional microbiological techniques is lower; meaning that, in many cases, the etiological diagnosis cannot be obtained and, therefore, antibiotic sensitivity of the microorganism causing sepsis is unknown. Although there are several molecular assays commercially available, only SeptiFAST (Roche, Mannheim, Germany) has been extensively evaluated in the hospital setting showing heterogeneous results but has not been widely implemented as of yet.

This thesis has evaluated the usefulness of the technology PCR/ESI-MS for the molecular diagnosis of sepsis. This technique is based on a broad spectrum PCR followed by mass spectrometry electrospray ionization and is able to identify bacteria and fungi from direct specimens in about 6 hours. During the evaluation of the first version of this technology

(PLEX-ID) promising results were obtained but its sensitivity was moderate (43.5 %) in comparison with conventional diagnostic methods. On the other hand, this technology was able to detect up to 12 clinically significant microorganisms that were not isolated by blood culture. Because of its suboptimal sensitivity, however, the technology was refurbished. The newer version, named IRIDICA, presents, as a major change, the increase of the volume of blood analyzed, up to 5 mL (in comparison with the 1.250 mL used for the PLEX-ID). With this updated version, the technology achieved a sensitivity of 73 % in comparison with conventional methods. Furthermore, IRIDICA detected up to 41 clinically significant microorganisms in patients with negative blood culture, most of whom had previously received antibiotic treatment.

This thesis explores the usefulness of this technique in different types of patients. We analyzed samples of patients from the Emergency Room and patients admitted to the Intensive Care Unit. In the latter group, IRIDICA showed a higher sensitivity (83 %) compared to conventional methods. These results are consistent with a recently published multicentric study that evaluated this technique for the molecular diagnosis of sepsis in critically ill patients admitted to Intensive Care Units from six European countries.

In conclusion, IRIDICA is a robust, rapid and reliable technology for the detection of microorganisms directly from whole blood. This technology would increase the number of microbiologically confirmed sepsis cases, even in the presence of antimicrobial treatment. The utilization of this system would provide early identification of the microorganism causing sepsis, with improved performance in critically ill patients. Therefore, IRIDICA would lead to a prompt administration of the antimicrobial treatment, thus improving survival rate and patient management.

INTRODUCCIÓ

| | |
|---|----|
| 1. La sèpsia a través de la història | 35 |
| 2. Definició de sèpsia: emmarcant el problema | 39 |
| 3. Epidemiologia de la sèpsia | 45 |
| 4. Immunologia de la sèpsia | 55 |
| 5. Biomarcadors | 69 |
| 6. Maneig del pacient amb sèpsia | 75 |
| 7. Diagnòstic microbiològic de la sèpsia | 79 |

1. La sèpsia a través de la història

Des de l'antiguitat, l'home s'ha hagut d'enfrontar a les infeccions i a les seves conseqüències. Es podria pensar que, degut al desconeixement sobre l'existència dels microorganismes i la seva implicació en els processos infecciosos, les deïtats haurien esdevingut l'explicació del perquè i, sobretot, de les conseqüències d'aquests processos (infecció, pus, mort, etc.). Això hagués tingut com a resultat una intervenció minoritària de l'home per evitar o pal·liar els efectes d'una malaltia que era causada pels déus i que per tant, quedava fora de les seves mans. Sorprenentment però, a través de la història observem que algunes de les tècniques utilitzades per les primeres civilitzacions per combatre les infeccions (curació de ferides, etc.) van perdurar durant molt de temps, corroborant per una banda la seva eficàcia i per l'altra la importància d'un raonament científic, que no va deixar tant de lloc als déus com cabria esperar [1]. Els primers manuscrits on es descriu la simptomatologia d'una infecció sistèmica es remunten a l'època dels egipcis. En uns papirs trobats a Luxor datats del 3000 a.C., es descriuen 48 casos de ferides traumàtiques on es detallen minuciosament els símptomes, tractament, seguiment i evolució dels pacients. En aquests casos, la presentació de febre, com a conseqüència secundària de la ferida, es considerava símptoma de mal pronòstic, sobretot si era persistent.

Però la paraula sèpsia, tal i com la coneixem, prové del grec “σήψις”, que significa *descomposició* o *putrefacció* [2]. La utilització d'aquest terme dins del context mèdic començà amb Hipòcrates, qui ja la descriu dins dels seus escrits (*Corpus Hippocraticum*). El model Hipocràtic de salut i malaltia incloïa dos processos bàsics de descomposició biològica: *pepsis*, procés pel qual es descomponia el menjar (digestió) i per tant, sinònim de salut, i *sepsis*, el procés pel qual es descomponien els teixits (formació de pus, mort tissular, males olors) i per tant, causant de malaltia. El concepte de sepsis però, no s'aplicava només en termes de salut, sinó que implicava a tot allò on podia existir putrefacció i males olors. A més, es creia que aquest procés de descomposició alliberava uns vapors putre-

factes, anomenats *miasma* o *misamata*, i que el fet de respirar aquests vapors podia causar malaltia i per tant, el procés de sepsis al cos humà [3]. Tan sols uns pocs anys després d'Hipòcrates, Aristòtil va afegir que, a més, el procés de sepsis donava origen a petites i invisibles criatures per generació espontània. Aquestes teories van ser recolzades també pel prominent metge romà Galè i van perdurar fins a més enllà de l'Edat Mitjana sense ser posades en dubte.

Un dels factors clau que va permetre l'avanç de la microbiologia va ser l'aparició de les lents. Anthony van Leeuwenhoek (1632 – 1723), a pesar de no tenir coneixements científics relacionats amb la medicina, va aconseguir veure per primera vegada aquestes “petites criatures invisibles”, a les que va anomenar *animalcules*. Mitjançant lents, va ser capaç de descriure esferes, bastons i espirals (és a dir, cocs, bacils i espiroquetes) i la comunitat científica de l'època va començar a estudiar-los, obrint pas a tot un món nou ple d'excitants descobriments. Durant els segles XVII, XVIII i XIX es van realitzar diferents experiments per tal de demostrar o refutar la teoria de la generació espontània, la qual va estar vigent fins que Louis Pasteur la va excloure categòricament i va presentar la seva “Teoria microbiana de les malalties infeccioses” l'any 1878 [2].

Però ja a partir del segle XVIII, les malalties amb simptomatologia d'infecció sistèmica van esdevenir cada vegada més comuns. Això es pot atribuir a causes tan diverses com l'augment de ferides de bala, que s'infectaven més fàcilment o l'augment de procediments quirúrgics degut a un millor coneixement de l'anatomia humana [3]. Centenars de pacients amuntegats als hospitals, compartint material quirúrgic, presumiblement sense esterilitzar (ja que no es coneixia el procés de transmissió de les malalties), va causar l'augment d'aquestes “ferides i malalties pútrides”, caracteritzades per que desprenien males olors i recolzades, a més, per la troballa d'abscessos en les autòpsies d'aquests malalts. Amb unes taxes de mortalitat hospitalària preocupantment elevades, Ignaz Semmelweis (1818 – 1865), va treure algunes conclusions que haurien de revolucionar el camp de la medicina. Aquest metge vi-

enès, va observar que la mortalitat per sèpsia puerperal era molt més elevada quan els que assistien el part eren estudiants de medicina que quan ho feien les matrones (16 % *vs.* 2 %) [2]. En aquells temps, els estudiants practicaven fent autòpsies i tot seguit, i sense netejar-se les mans, es dirigien a les sales de part. Imposant la rutina de la neteja de mans, la mortalitat va baixar fins al 3 %. Malauradament, la mesura no va agradar gaire als seus col·legues metges, els quals opinaven que “els metges eren senyors, i els senyors tenen les mans netes”. Va ser despatxat i finalment va morir d’una infecció estreptocòcica en un asil per a dements.

Com hem dit abans, el rebuig definitiu de la teoria de la generació espontània arribà finalment amb Louis Pasteur (1822 – 1895), qui, amb els seus experiments, va demostrar que l’aire en si mateix no produeix putrefacció, sinó que són unes petites partícules (bacteris) presents en aquest medi les que ho fan. Aquests experiments, van fer que Lister (1827 – 1912), cirurgià anglès, arribés a la conclusió que les infeccions de les ferides obertes eren degudes als microorganismes presents a l’aire. Va treballar amb la creació de material antisèptic per a evitar les infeccions, reduint notòriament la taxa d’incidència de la sèpsia causada per ferides i la seva mortalitat. De nou, les seves troballes, a pesar de la forta evidència, van ser rebudes amb molta cautela.

En aquesta mateixa època, Robert Koch (1843 – 1919) va establir la teoria microbiana de les malalties infeccioses amb els seus postulats. Mitjançant els seus experiments va poder aïllar de la sang d’animals malalts els bacteris causants de l’àntrax i va formular els postulats per a establir un agent com a causa d’una infecció: 1) l’agent ha de ser aïllat de l’animal infectat; 2) l’agent ha de poder ser cultivat; 3) la infecció d’un hoste sà amb l’agent ha de causar infecció i 4) s’ha d’aïllar el mateix agent dels nous animals infectats [2].

Hugo Schottmüller (1867 – 1936) va ser el primer en relacionar la presència de bacteris a la sang amb els signes i simptomatologia sistèmi-

ca i va definir la sèpsia per primera vegada l'any 1914 com “ l'estat causat per una invasió microbiana del torrent sanguini provinent d'un focus local d'infecció, la qual cosa pot originar símptomes de malaltia sistèmica en òrgans remots” [5]. Per altra banda, William Osler (1849 – 1919) també havia reconegut la importància de la resposta de l'hoste: “excepte en algunes ocasions, sembla que els pacients moren degut a la resposta de l'hoste a la infecció més que per la infecció en si”. Aquestes apreciacions van donar peu tant a la definició actual de la sèpsia com a l'enteniment del rol de la resposta immune de l'hoste a la infecció.

2. Definició de sèpsia: emmarcant el problema

Des de la definició d'Hugo Schottmüller, es van utilitzar molts termes per a referir-se al concepte de sèpsia: septicèmia, bacterièmia, síndrome sèptic, xoc sèptic, i d'altres. [6, 7]. La utilització de diferents termes per a un mateix concepte, junt amb el fet d'emprar sèpsia o síndrome sèptic per a referir-se a processos no infecciosos, generava confusió i a més, dificultava la interpretació dels estudis clínics publicats fins al moment. Per tal d'estandarditzar la nomenclatura, l'any 1991 el Col·legi Americà de Pneumologia (ACCP) proposà una sèrie de definicions consensuades (**Taula 1**) amb l'objectiu de facilitar l'estudi d'aquesta malaltia i millorar el reconeixement dels símptomes i, per tant, el maneig dels pacients.

Taula 1. Definicions consensuades a la Conferència consens del 1991 (ACCP).

- **Bacterièmia:** presència de bacteris viables a la sang. De la mateixa manera, **fungèmia** i **virèmia** es refereix respectivament a la presència de fongs o virus a la sang.
- **Síndrome de Resposta Inflamatòria Sistèmica (SIRS):** resposta immunitària de l'hoste enfront una agressió, manifestada per dos o més dels següents símptomes:
 - Temperatura corporal $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Freqüència cardíaca > 90 batecs/minut
 - Freqüència respiratòria > 20 respiracions/minut
 - $\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg
 - Recompte leucocitari > 12.000 cels/ mm^3 o < 4.000 cels/ mm^3 o $> 10\%$ formes immadures
- **Sèpsia:** SIRS causada per una infecció sospitada o documentada.
- **Sèpsia severa:** Sèpsia amb, com a mínim, disfunció d'un òrgan o hipoperfussió.
- **Xoc sèptic:** Sèpsia amb hipotensió a pesar de la correcta administració de fluids.
- **Síndrome de Disfunció Multiorgànica (MODS):** Funció alterada de dos o més òrgans en malalts aguts on l'homeòstasi no es pot mantenir sense intervenció.

Malgrat que aquesta conferència va donar el marc necessari per definir el concepte de sèpsia, les definicions no eren suficientment acurades degut a què els criteris de SIRS no eren específics només de sèpsia, ja que aquesta simptomatologia pot donar-se per altres causes d'origen no infecciosos, com traumatismes, cremades o pancreatitis, tal i com s'observa a la **Figura 1**. [8 – 10].

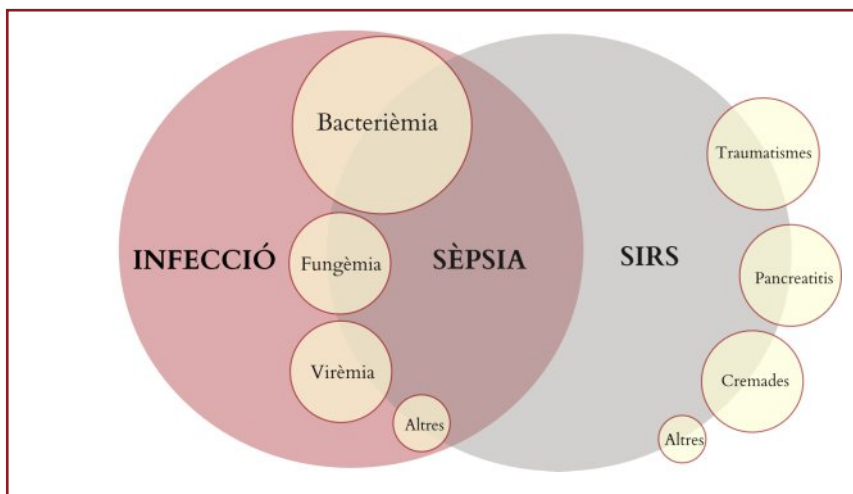


Fig. 1. Relació entre la síndrome de resposta immunitària sistèmica (SIRS), la infecció i la sèpsia. Figura modificada de la referència [9].

L'any 2001 es va celebrar una segona conferència, amb participants de reconegudes associacions mèdiques tant europees com nord-americanes, amb l'objectiu d'ampliar i redefinir els conceptes ja establerts en la conferència del 1991 [11]. Les manifestacions clíniques de la sèpsia són molt variables i els signes d'infecció i/o disfunció d'òrgans poden ser molt subtils [12], per això, tot i que la definició de SIRS resultava molt útil, calia afegir símptomes d'alarma compatibles amb la presència de sèpsia a la definició per tal que fos més acurada (**Taula 2**) [10 – 13]. Tot i la inclusió de més paràmetres clínics o analítics, la definició consensuada al 1991 (dos o més criteris de SIRS causada per una infecció sospitada o documentada) continua vigent i és àmpliament utilitzada en la majoria d'estudis clínics [14].

Taula 2. Criteris de sèpsia segons la conferència consens del 2001 [12].

1. Sèpsia (infecció documentada o sospitada amb un o més dels següents paràmetres clínics o analítics)¹

Paràmetres generals

- Febre (temperatura termometrada $>38,3^{\circ}\text{C}$)
- Hipotèrmia (temperatura termometrada $<36^{\circ}\text{C}$)
- Taquicàrdia (>90 batecs/minut o >2 desviacions estàndard per sobre el límit del rang normal per edat)
- Taquipnea
- Estat mental alterat
- Edema perifèric significatiu o balanç de fluids positiu (>20 mL/kg de massa corporal durant 24 hores)
- Hiperglucèmia (glucosa en plasma >120 mg/dL [$6,7$ mM/L]) en absència de diabetis

Paràmetres d'inflamació

- Leucocitosis (recompte de glòbuls blancs $> 12.000/\text{mm}^3$)
- Leucopènia (recompte de glòbuls blancs $< 4.000/\text{mm}^3$)
- Recompte normal de glòbuls blancs amb $> 10\%$ de formes immadures
- Augment de la Proteïna C Reactiva en plasma (> 2 desviacions estàndard per sobre el límit del rang normal)
- Augment de la procalcitonina en plasma (> 2 desviacions estàndard per sobre el límit del rang normal)

1. En nens, els criteris de diagnòstic de sèpsia són signes i símptomes d'inflamació més infecció amb hipertèrmia o hipotèrmia (temperatura rectal $> 38,5^{\circ}\text{C}$ o $< 35^{\circ}\text{C}$ respectivament), taquicàrdia (pot no trobar-se amb hipotèrmia) i al menys un de les següents indicacions d'alteració d'òrgans: estat mental alterat, hipoxèmia, augment dels nivells de lactat en sèrum o polsos exaltats.

Taula 2 (continuació).

Paràmetres hemodinàmics

- Hipotensió arterial (pressió sistòlica, < 90 mm Hg; pressió arterial mitja < 70 mm Hg; o disminució en pressió sistòlica de > 40 mm Hg en adults o > 2 desviacions estàndard per sobre el límit del rang normal per edat).
- Augment de la saturació d'oxigen en vena (> 70 %)²
- Índex cardíac elevat (>3,5 L/min/m² de superfície del cos)³

Paràmetres de disfunció d'òrgans

- Hipoxèmia arterial (ràtio de la pressió parcial de l'O₂ i la fracció inspirada d'O₂ < 300)
- Oligúria aguda (producció d'orina < 0,5 mL/kg/h o 45 mL/h durant al menys 2 hores)
- Augment del nivell de creatinina > 0,5 mg/dL (> 44 µmol/L)
- Anomalies en la coagulació sanguínia (ràtio normalitzat internacional > 1,5 o temps de tromboplastina parcial activada > 60 s)
- Ili paralític (absència de sorolls intestinals)
- Trombocitopènia (recompte de plaquetes < 100.000 mm³)
- Hiperbilirrubinèmia (bilirrubina total en plasma >4 mg/dL [68 µmol/L])

Paràmetres de perfusió tissular

- Hiperlactatèmia (lactat, < 1 mmol/L)
- Reompliment capil·lar disminuït

2. Sèpsia severa (sèpsia més disfunció d'òrgans)

3. Xoc sèptic (sèpsia més hipotensió (refractària a fluids intravenosos) o hiperlactatèmia)

2. Una saturació d'oxigen en vena > 70 % és normal en nadons i nens (rang pediàtric, 75 - 80 %).

3. Un índex cardíac entre 3,5 i 5,5 litres per minut i m² és normal en nens.

J. L. Vincent et al. explica molt bé la complexitat per a definir la sèpsia en un dels seus articles [15]:

La sèpsia és un procés molt complex que pot afectar a qualsevol individu, pot tenir diferents orígens i estar causat per un gran nombre de microorganismes. Es pot presentar acompanyada d'un elevat nombre de senyals i símptomes, cap dels quals són específics de sèpsia i tots ells poden variar segons el pacient o en un mateix pacient al llarg del temps. Els símptomes poden variar en el grau de severitat, des de lleus fins a xoc sèptic fulminant. Potser una definició simple per a la sèpsia no serà mai possible degut a la diversitat i complexitat que aquesta engloba.

En l'actualitat, s'està generalitzant l'opinió que la utilització dels criteris de SIRS per a definir els pacients amb sèpsia no és l'aproximació adequada. Per una banda, aquest criteri és massa sensible, ja que més del 90 % de pacients que ingressen a una Unitat de Medicina Intensiva (UCI) el compleixen i no necessàriament degut a una infecció. Com s'ha indicat abans, existeixen processos d'inflamació estèrils que activen les cascades de la immunitat innata de la mateixa manera que una infecció [16, 17]. Per altra banda, la necessitat de presentar mínim dos criteris de SIRS s'ha criticat per la baixa especificitat que presenta, ja que existeixen pacients (com per exemple, ancians o aquells amb tractament que controla el ritme cardíac o la febre) que, tot i tenir infecció i disfunció d'òrgans, no compleixen el mínim de dos criteris de SIRS [17]. Actualment, la *Society of Critical Care* i la *European Society of Intensive Care Medicine* estan treballant per revisar i actualitzar aquesta definició. Però a grans trets, la nova definició proposada de sèpsia serà la següent:

La sèpsia és un excés de la resposta inflamatòria de l'hoste, deguda a una infecció que desemboca en una disfunció multiorgànica [16].

3. Epidemiologia de la sèpsia

3.1. Incidència

Arribar a una definició de consens de la sèpsia va suposar un increment en el nombre d'estudis epidemiològics [18], ja que conèixer l'epidemiologia local de la sèpsia és essencial per al correcte maneig dels pacients [19]. Actualment, hi ha una extensa bibliografia d'estudis epidemiològics. Per a analitzar-los, cal tenir present el tipus d'estudi, ja que les dades depenen del tipus de població. Els que donen una idea més clara de la incidència real són els estudis poblacionals, on s'expressa la incidència en casos per 100.000 habitants, mentre que els estudis centrats en un tipus de pacient o en un Servei hospitalari, poden resultar esbiaixats [20].

En els darrers anys, s'ha vist un augment en la incidència que és difícil d'explicar per un sol factor, podent existir diverses causes [18, 21 – 24]:

- Augment de l'edat de la població
- Augment de processos quirúrgics i invasius
- Augment de la utilització de dispositius intravasculars
- Augment de la població amb malalties de base que afecten el sistema immunitari (càncer, SIDA, diabetis, etc.)
- Augment de les resistències als antibiòtics
- Utilització de sistemes automatitzats per a la detecció del creixement bacterià en els hemocultius (millora de la sensibilitat, i per tant, augment del nombre de casos detectats)

Extrapolant les dades d'incidència dels Estats Units, N.K.J. Adhkari *et al.* van calcular una incidència de 19 milions de casos de sèpsia a l'any a tot el món [25]. Per donar una idea més concreta segons regions geogràfiques, en la **Taula 3** s'observen les dades d'incidència per 100.000 habitants referents a Estats Units i Europa i, dins d'Espanya, les dades de dos estudis que comprenen un llarg període de temps realitzats a Madrid i a la Comunitat Valenciana.

Taula 3. Incidència de la sèpsia al món.

| Àrea geogràfica (Anys Estudi) | Població (milions d'habitants) | Incidència (casos per 100.000 habs. i any) | Mortalitat (casos per 100.000 habs. i any) | Referència |
|-------------------------------|--------------------------------|--|---|------------|
| Estats Units (2010) | 308 | 174 - 204 | 23,5 - 27,5 | [26] |
| Europa (2007) | 731 | 166 - 189 | 21,6 - 37,8 | [26] |
| Madrid (1985 - 2006) | 604.904 - 743.387 | 130,3 - 269,8 | Sense dades | [23] |
| C. Valenciana (1995 - 2004) | 3,9 - 4,4 | 64,11 - 114,02 | 40 - 44 % durant el període de l'estudi (*) | [27] |

* No expressat com a casos per 100.000 habitants i any.

A Catalunya, tal i com es pot trobar al Registre del Conjunt Mínim Bàsic de Dades (CMBD) del Servei Català de la Salut (CatSalut), la incidència hospitalària de la sèpsia greu (pacients amb infecció i com a mínim fracàs d'un òrgan) ha augmentat de l'1,3 % fins al 2,1 % en quatre anys (2008 a 2012), tal i com es mostra en la **Figura 2**.

Tot i que la incidència de la sèpsia augmenta any rere any, la població no està conscienciada sobre l'impacte que té aquesta malaltia. En la part superior de la **Figura 3A**, s'observa la incidència de la sèpsia durant l'any 2010 en comparació amb altres malalties probablement més conegudes per la població com l'infart agut de miocardi o el càncer. Per altra banda, a la part inferior de la **Figura 3B** s'observen els resultats d'una enquesta realitzada a la població de diferents països i es presenta el percentatge de persones que coneixien el concepte sèpsia.

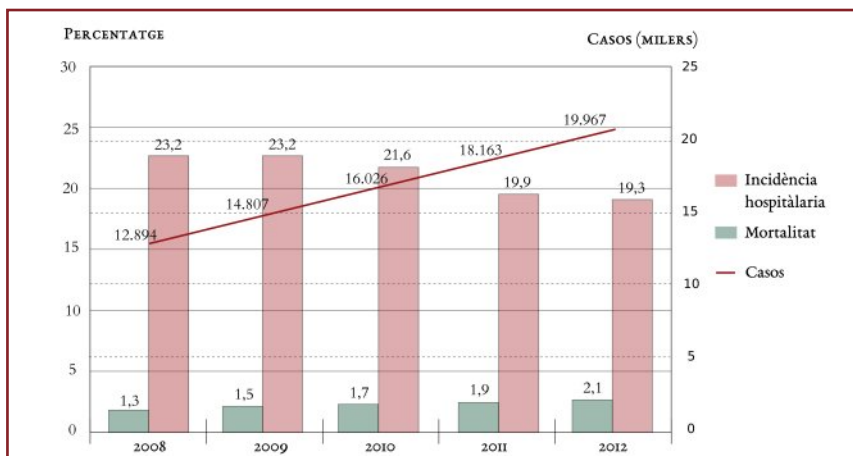


Figura 2. Incidència i mortalitat de la sèpsia greu a Catalunya durant els anys 2008 a 2012 (modificat de [28]).

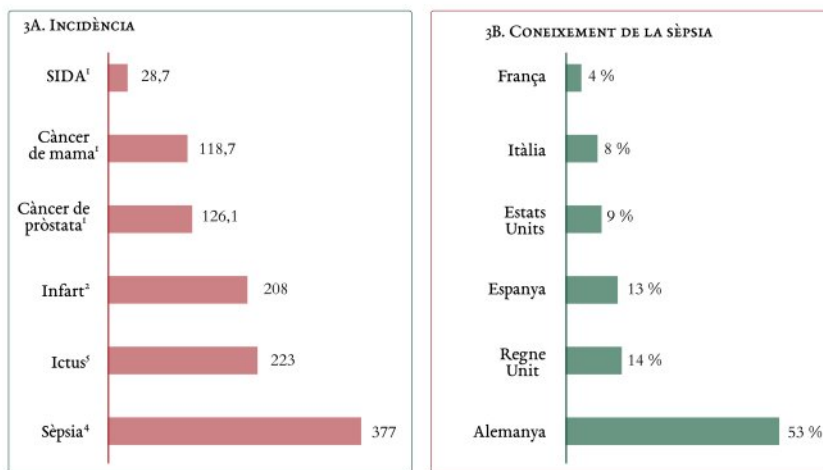


Figura 3. Comparació de la incidència de la sèpsia amb el coneixement de la població sobre aquesta síndrome.

3A. Casos per 100.000 habitants a EEUU. Modificat de:

1. www.cdc.gov, estadístiques 2010; 2. N Engl J Med, 2010; 362(23):2155-65; 3. Lancet Neurol, 2009;8(4):355-69; 4. NCHD data brief no. 62, National Center for Health Statistics, 2011

3B. Percentatge de persones que coneixen el concepte de sèpsia. Modificat de [29].

3.2. Mortalitat i despesa sanitària associada

Tot i que la mortalitat de la sèpsia ha disminuït dràsticament des de la incorporació de les Unitats de Cures Intensives als hospitals, on es pot proporcionar suport vital als pacients amb sèpsia severa i xoc sèptic (d'unes taxes de mortalitat del 80 % fa no més de 30 anys al 20-30 %) [12], la proporció de malalts de sèpsia que moren a causa d'aquest síndrome segueix sent molt elevada, amb una morbi-mortalitat associada important [19]. A més, la mortalitat augmenta amb la gravetat d'aquest síndrome (**Figura 4**) [30]. Malgrat que la taxa de mortalitat ha disminuït, l'augment de la incidència ha fet augmentar la mortalitat relacionada amb la sèpsia i s'estima que als Estats Units, un 9,6 % de totes les morts són degudes a aquesta síndrome, situant-se com la 10^a causa de mort a aquest país [7, 31]. A Espanya, s'estimen unes 12.000 morts anuals relacionades amb la sèpsia [32].

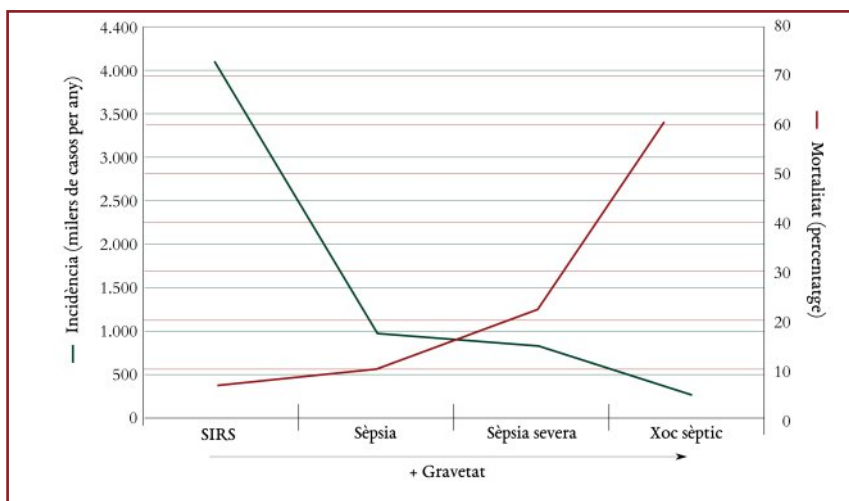


Figura 4. Incidència i mortalitat de la sèpsia segons la seva gravetat. Modificat de [30].

Segons estudis recents la mortalitat intra-hospitalària de la bacterièmia es troba entre el 12 % i el 21 %, i entre el 30 % i el 50 % en els casos de sèpsia severa. Tot i això, analitzant poblacions específiques, aquestes es-

radístiques poden variar, depenent de les característiques del pacient (edat, patologia de base, estat immunològic), focus d'infecció (per exemple, les infeccions respiratòries tenen un risc més elevat de mortalitat) o el microorganisme causant de la infecció (factors de virulència, resistència a antibiòtics, etc.) [19, 32].

Una conseqüència directa de l'augment dels casos de sèpsia és l'increment de la despesa sanitària associada a aquesta patologia, principalment per l'excés dels dies d'estada (de setmanes a mesos) a les UCI [33]. En un estudi realitzat als Estats Units l'any 2001 per Angus, D. *et al.* [34] es va estimar un cost mitjà per cas de sèpsia de 22.100 dòlars, amb una despesa anual total de 16,7 milers de milions de dòlars a nivell nacional. Un altre estudi americà, atribuïa a la sèpsia nosocomial uns costos entre 23.000 i 56.000 dòlars de despeses hospitalàries extra [35]. Estudis similars a nivell d'Europa estimen una despesa d'entre 22.000 i 45.000 euros per cas de sèpsia, i a Espanya es calcula una despesa a nivell nacional d'entre 300 i 500 milions d'euros per any [27, 36].

3.3. Microbiologia de la sèpsia: microorganismes implicats

La sèpsia pot estar causada per un rang molt ampli de patògens, bacteris, fongs i inclús virus [18]. Els microorganismes causants varien segons la via d'adquisició, la patologia de base i factors predisposants del pacient, el focus, l'exposició prèvia a antibiòtics i l'epidemiologia local. Tot i això, existeixen un cert nombre de microorganismes predominants: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, estafilococs coagulasa negativa, *Streptococcus pneumoniae* i altres estreptococs, *Enterococcus spp.*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, Enterobacteris, *Pseudomonas aeruginosa* i altres bacils gramnegatius no fermentadors, bacteris anaeròbies i fongs, principalment *Candida spp.* [19]. A més, les bacterièmies poden estar causades per un o més microorganismes, podent-se detectar infeccions polimicrobianes en un 6 – 18 % dels casos. Tot i això, els microorganismes més freqüents també varien segons el focus infecció o segons l'origen de la sèpsia (comunitària o nosocomial).

3.3.1. Microorganismes més freqüents segons el focus

Sovint, la bacterièmia indica la presència d'un focus infectat a partir del qual s'estén aquesta infecció, com per exemple, una infecció respiratòria, urinària o la infecció d'un dispositiu intravascular. En aquests casos, s'anomena bacterièmia secundària. Per contra, una bacterièmia primària és aquella on no es pot identificar cap focus d'infecció. En la **Taula 4**, es troben llistats els microorganismes més freqüentment aïllats segons el focus d'infecció, extret de les dades del Servei de Microbiologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol (HUGTiP) dels últims 5 anys.

Taula 4. Microorganismes més habituals segons el focus de la sèpsia (ordenats de més a menys freqüència d'aïllament).

| Abdominal | Primari |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i> | Altres enterobacteris |
| <i>Enterococcus</i> spp. | <i>Enterococcus faecium</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Serratia</i> spp. | <i>Streptococcus</i> spp. |
| <i>Streptococcus</i> spp. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>Bacteroides</i> spp. | <i>Candida</i> spp. |
| <i>Clostridium</i> spp. | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| Urològic | Respiratori |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>Enterococcus faecalis/faecium</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | |

Catèter

Estafilococs coagulasa negativa
Staphylococcus aureus
Enterobacteris
Pseudomonas aeruginosa
Enterococcus faecalis/faecium

Cutani

Staphylococcus aureus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pyogenes

Parts toves

Staphylococcus aureus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pyogenes
Streptococcus spp.

Meningi

Neisseria meningitidis
Streptococcus pneumoniae
Listeria monocytogenes

Ferida operatòria

Escherichia coli
Enterobacter cloacae
Citrobacter spp.
Staphylococcus aureus

Osteoarticular

Staphylococcus aureus
Streptococcus spp.
Kingella kingae

Vascular

Estreptococs del grup mitis
Enterococcus faecalis/faecium
Staphylococcus spp.

3.3.2. Microorganismes segons l'origen de la sèpsia

Una altra forma de classificar la sèpsia és segons el seu origen: adquirida en la comunitat (malalts sense un contacte hospitalari previ), relacionada amb l'assistència sanitària (malalts que reben atenció mèdica ambulatoria o en centres sociosanitaris, de llarga estada o al domicili) i nosocomial, la qual és adquirida durant l'estada hospitalària. En una revisió recent, J. Rodriguez Baño *et al.* [19] determinen que el percentatge de bacterièmies comunitàries correspondria a un 18 - 61 % de tots els casos de bacterièmia, entre 24 - 37 % del casos serien bacterièmies associades a l'atenció sanitària i entre 25 - 41 % dels casos correspondrien a bacterièmies d'origen nosocomial. Depenent de l'origen de la bacterièmia, els microorganismes causants també són diferents, per la qual cosa és molt necessari poder classificar-les correctament. En la **Taula 5**, es troben llistats els microorganismes més freqüentment aïllats segons l'origen de la sèpsia, extret de les dades del Servei de Microbiologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol dels últims 5 anys.

Taula 5. Microorganismes més freqüents segons l'origen de la sèpsia (ordenats de més a menys freqüència d'aïllament).

| Comunitària o relacionada amb l'assistència sanitària | Nosocomial |
|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Estafilococ coagulasa negativa |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Estafilococ coagulasa negativa | <i>Enterococcus faecium</i> |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> resistent a la meticil·lina |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Serratia marcescens</i> |

3.3.3. Evolució dels microorganismes causants de la sèpsia

En els darrers anys, hi ha hagut una evolució important en els microorganismes causants de la sèpsia. Inicialment es creia, i així es descrivia, que la sèpsia era originada majoritàriament per bacteris gramnegatius i que la principal responsable de la sèpsia era l'endotoxina [18], la qual, tal i com s'explicarà posteriorment, té la capacitat de generar una resposta immunitària molt potent [37]. Per aquest motiu, es van destinar molts esforços a fer assajos clínics per a eliminar l'endotoxina com a potencial tractament per a la sèpsia. Però en els darrers 30 anys hi ha hagut canvis considerables en el patró dels microorganismes causants. Tal com mostra la **Figura 5**, de l'any 1985 fins al 2006, els bacteris grampositius van superar en incidència als gramnegatius. Alguns dels factors que ho van promoure van ser la massiva utilització de catèters intravasculars i altres dispositius, processos invasius i, en algunes poblacions seleccionades, l'ús de profilaxi amb fluoroquinolones (més efectives contra bacteris gramnegatius) entre d'altres. També cal remarcar l'augment de la incidència dels fongs com a microorganismes causants de la sèpsia, probablement lligat a l'augment de casos de sèpsia nosocomial.

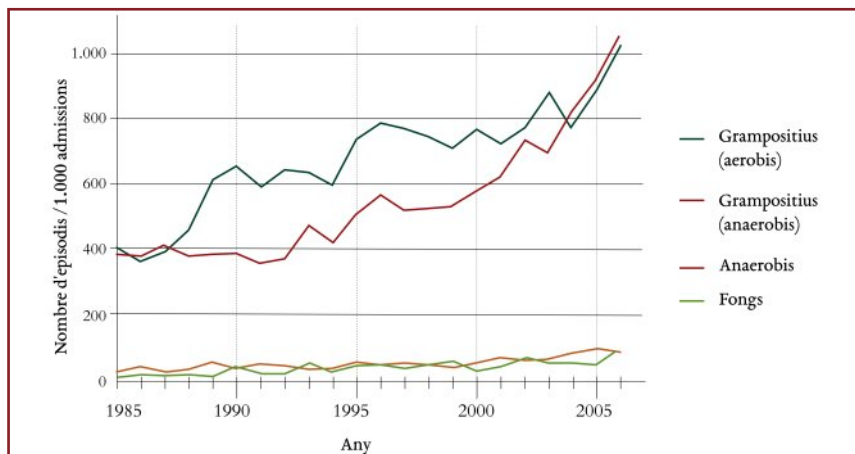


Figura 5. Evolució del nombre d'episodis per cada 1.000 admissions segons el tipus de microorganisme en el període comprès entre els anys 1985 i 2006 (Modificat de [23]).

Per altra banda, en la **Figura 6**, es poden observar les dades en cru (nombre total d'hemocultius) del Servei de Microbiologia de l'HUGTiP des de l'any 2001 fins a l'any 2014. En aquests últims anys, s'observa un ressorgiment dels bacteris gramnegatius com a microorganismes causants de sèpsia. Aquest fet es podria explicar per una banda, per l'augment de casos de sèpsia causada per bacteris gramnegatius mutiresistents i per altra banda, per una disminució de sèpsia d'origen en el catèter, degut a diferents intervencions per part de l'Equip d'Infecció Nosocomial, que a partir de 2010 va aconseguir una reducció del 70 % d'aquest tipus de bacterièmies.

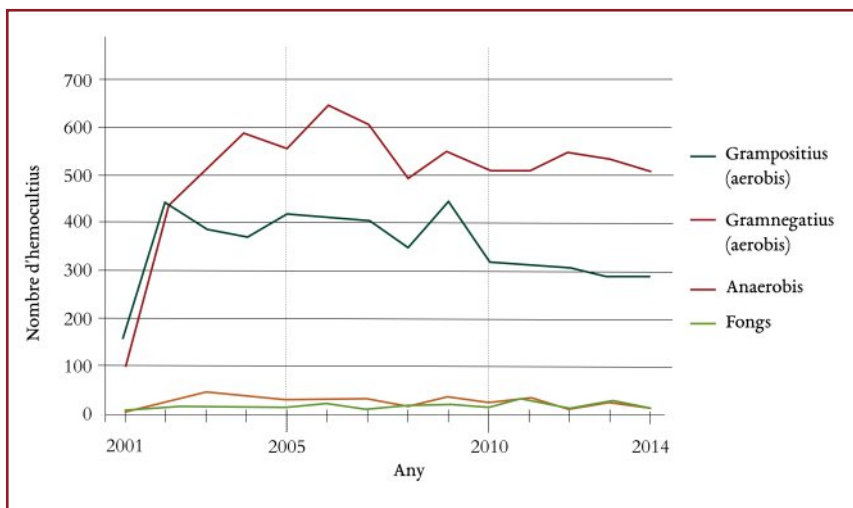


Figura 6. Evolució dels diferents tipus de microorganismes aïllats a l'HUGTiP des de 2001 fins a 2014.

4. Immunologia de la sèpsia

4.1. Interacció hoste-patogen

La sèpsia, com hem definit abans, és la resposta del sistema immunitari enfront d'una infecció. La seva progressió fins a sèpsia severa, xoc sèptic o disfunció multiorgànica (MODS) és causada per un descoordinació entre la intensitat de la resposta de l'hoste i la intensitat de l'estímul del patogen [4]. La interacció entre l'hoste i el patogen és molt complexa i hi intervenen molts factors per ambdues parts. De part de l'hoste poden intervenir factors com l'edat, la genètica, l'ambient, comorbiditats i patologies de base i medicació rebuda. Per part del patogen, poden intervenir factors com la càrrega microbiana, el tipus de microorganisme i els seus factors de virulència [12]. El primer esdeveniment necessari és la invasió per part del patogen de fluids inicialment estèrils. Aquesta invasió, pot donar lloc a un procés infecció autolimitat o, per contra, a una resposta desmesurada que pot provocar el desenvolupament de sèpsia severa o xoc sèptic. La capacitat d'activar la resposta immunitària de l'hoste la tenen tant bacteris, com fongs i virus, encara que els bacteris són les més comuns i constitueixen el camp on estan més estudiats els factors de virulència i patogenicitat [4, 38].

4.2. El rol del patogen: factors de virulència i mecanismes d'evasió de la immunitat

Per tal d'establir una infecció, els patògens han d'adherir-se als diferents teixits de l'hoste i travessar les superfícies mucoses. Posteriorment, en el procés d'infecció entra en joc tant la capacitat dels patògens de multiplicar-se i disseminar-se com l'habilitat de l'hoste per a segrestar-los i eliminar-los abans que això passi. La capacitat d'un patogen d'envair els teixits de l'hoste depèn de la quantitat i qualitat dels factors de virulència que expressa. La resposta immune de l'hoste és molt heterogènia i varia al llarg del temps, fent-se més específica; per tant el patogen necessita poder expressar diferents tipus de factors de virulència i poder mantenir-

los per tal de poder evadir-la i així sustentar la infecció [4, 38]. Per tal d'aconseguir el seu objectiu, els microorganismes disposen d'un variat arsenal de determinants de virulència i de mecanismes d'evasió de la resposta immunitària [38 – 41]. Alguns dels mecanismes més importants és detallen a continuació.

4.2.1. Mecanismes d'adherència i invasió tissular

Existeixen diversos mecanismes a través dels quals els bacteris poden adherir-se a les superfícies epitelials, permetent la seva posterior entrada dins les cèl·lules de l'hoste.

Adhesines. Són proteïnes secretades o integrals de membrana que permeten la unió dels patògens a elements tissulars de l'hoste, com per exemple les fibres de col·lagen.

Flagels, fimbries i pilis. Són apèndixs bacterians que permeten l'adhesió a les cèl·lules de l'hoste i als components de la matriu extracel·lular.

Mimetisme de lligands. Mitjançant la producció de proteïnes similars a les proteïnes de l'hoste, els bacteris es poden adherir a receptors rellevants.

Sistemes de secreció Tipus I, II, III i IV. Aquests sistemes funcionen com un conducte molecular, per on els bacteris poden introduir proteïnes pròpies dins de la matriu extracel·lular (I i II) o intracel·lular (III i IV) de l'hoste per tal d'alterar-ne la funció i facilitar la infecció.

Vacuoles lipídiques. Els bacteris patogènics eviten la zona apical de les cèl·lules, zona generalment exposada als bacteris comensals. Per contra, s'uneixen a la zona baso-lateral de les

cèl·lules, zona rica en colesterol i receptors que utilitzen per crear un embolcall lipídic que els permet evadir l'endocitosi lisosomal.

4.2.2. Factors de virulència

Toxines. Existeixen una gran varietat de toxines que contribueixen al dany tissular de l'hoste, tant per la toxina *per se* com per la resposta immune enfront d'aquesta.

Toxines Tipus I. Aquestes toxines són capaces de generar dany sense entrar dins de les cèl·lules de l'hoste. Un exemple són les toxines generades per *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*.

Superantígens. Aquestes toxines tipus I no actuen directament sobre les cèl·lules, però produeixen una estimulació general del sistema immune de l'hoste per a produir dany en aquest mitjançant l'activació de les cèl·lules T. Els produeixen virus i bacteris com *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus* spp. El superantígen s'uneix a una proporció molt elevada de limfòcits T (entre el 5% i el 25%), el que provoca una gran alliberació de citocines, produint una inflamació sistèmica. Per posar exemples, el superantígen produït per *S. aureus* és la toxina responsable del síndrome del xoc tòxic i *Streptococcus pyogenes* produeix la toxina eritogènica responsable de l'escarlatina.

Toxines Tipus II. Aquestes toxines danyen les membranes de les cèl·lules de l'hoste i permeten als patògens accedir al contingut intracel·lular i a la vegada, afecten la resposta de l'hoste enfront l'agressió. Un exemple són les hemolisines o les fosfolipases produïdes per una gran varietat de microorganismes.

Toxines Tipus III. Aquest tipus de toxines estan formades per dues subunitats (A/B). El component B és el motiu d'unió mentre que el component A és l'enzim actiu. Aquestes toxines es coordinen amb les defenses de dany cel·lular, permetent la invasió i disseminació del patogen. Exemples d'aquest tipus de toxines són la toxina del còlera o de l'àntrax.

Lipopolisacàrid i endotoxines. Són les toxines més importants en la patogènesi de la sèpsia. El lipopolisacàrid és el principal component estructural de la membrana externa dels bacteris gramnegatius, necessari per a la seva viabilitat. Tot i que no té propietats tòxiques per ell mateix, genera una resposta immune molt potent. Aquesta toxina forma part de la paret cel·lular i s'allibera en grans quantitats quan les parets es lisen. Moltes vegades, aquests dos termes (endotoxina i lipopolisacàrid) s'empren indistintament. Les endotoxines generen una varietat d'efectes fisiològics, com per exemple febre, disminució en el nombre de les cèl·lules efectores del sistema immune i incrementen la mortalitat per xoc hemorràgic i necrosi tissular.

Illes de patogenicitat. Les soques patogèniques es diferencien de les soques comensals per l'expressió de clústers específics de virulència. A més, els factors de virulència solen trobar-se junts en zones concretes del cromosoma, anomenades illes de patogenicitat. En aquestes illes també es poden trobar gens que inhibeixen mecanismes de defensa de l'hoste o que codifiquen molècules per a l'adhesió del patogen a cèl·lules de l'hoste. Algunes illes de patogenicitat també contenen integrons, que són seqüències de DNA que permeten l'intercanvi de gens de virulència o gens de resistència a antibiòtics. Els integrons permeten adquirir ràpidament gens favorables augmentant la capacitat patogènica del microorganisme.

Quorum sensing. Recentment, s'ha vist que els bacteris tenen la capacitat de detectar la densitat poblacional bacteriana mitjançant l'alliberació al medi d'unes petites molècules difusibles, anomenades autoinductors. Quan la concentració d'aquestes molècules passa d'un determinat llindar, són captades per les cèl·lules, activant la transcripció de determinats gens (de virulència, formació de biofilms, etc.) a totes les cèl·lules, permetent un atac coordinat. Aquest fenomen s'anomena *quorum sensing* i s'ha vist que té molta importància en la invasió tissular per part dels patògens [4, 38]. A més, existeixen vies de comunicació més complexes entre microorganismes i cèl·lules de l'hoste. P. Boontham *et al.* [42] van demostrar que els autoinductors inhibien l'activació de cèl·lules dendrítiques, les cèl·lules T i altres cèl·lules del sistema immunitari. A més, mitjançant un biosensor van ser capaços de detectar autoinductors en el sèrum de malalts amb sèpsia, mentre que no el van detectar en el sèrum de voluntaris sans.

4.2.3. Mecanismes d'evasió

Evasió de la fagocitosi. Els patògens tenen diferents mecanismes per a evitar ser fagocitats pels neutròfils, com per exemple, inhibir la opsonització mitjançant l'encapsulació, variació dels antígens de membrana per tal d'evitar el seu reconeixement com a patògens o induir l'apoptosis de les cèl·lules efectores del sistema immune mitjançant exotoxines.

Evasió del sistema del complement. Els microorganismes tenen diferents sistemes per a evitar el sistema del complement (conjunt de molècules plasmàtiques que potencien la inflamació i formen part de la primera línia de defensa contra els microorganismes). Per exemple, mitjançant la formació de càpsules on el complement no es pot unir de forma estable.

Alguns microorganismes expressen proteïnes a la seva superfície que degraden aquestes molècules. El fet de generar càpsules o, en el cas dels bacteris grampositius, el tenir una paret gruixuda evita la inserció del complex lític del complement a la paret bacteriana.

Evasió dels macròfags. Alguns enterobacteris poden induir l'apoptosi del macròfag mitjançant l'activació de caspases. També provoquen una alliberació massiva de la citocina pro-inflamatòria IL-1 i aprofiten la migració de neutròfils per introduir-se amb ells cap a la llum intestinal. Una altra manera és evitar la unió del lisosoma amb les vesícules fagocítiques. Aquesta última estratègia també s'observa en alguns patògens intracel·lulars.

Formació de biofilms. Un biofilm és una matriu de polisacàrids que encapsula colònies senceres de bacteris evitant la seva fagocitosi. A més, aquesta matriu les protegeix de l'efecte dels antibiòtics.

4.3. Mecanismes de defensa de l'hoste enfront el patògen

La primera barrera amb què es troben els microorganismes és l'epiteli. La majoria de patògens no poden sobreviure a la pell durant molt de temps, ja que en aquesta superfície s'hi troben substàncies inhibidores del creixement com l'àcid làctic i àcids grassos de les secrecions sudorípares i sebàcies i el pH àcid que aquestes secrecions generen [40]. A més, en aquest teixit trobem unes petites molècules anomenades defensines o pèptids antimicrobians que tenen la capacitat d'atacar a tot tipus de microorganismes (bacteris, fongs i virus) [43, 44]. Aquest tipus de molècules s'han trobat en bacteris, insectes i també en mamífers i humans i proporcionen la primera línia de defensa enfront agressions externes. Un altre factor defensiu generat per l'hoste són les secrecions de

les glàndules mucoses de les superfícies internes, on els patògens queden enganxats i seran eliminats posteriorment per moviments mecànics com tos o esternuts. La microbiota comensal també juga un paper molt important, ja que suprimeix el creixement dels microorganismes patògens mitjançant la competència pels nutrients.

4.4. Reconeixement del patogen i activació de la resposta immune

Una vegada el patogen aconsegueix adherir-se a l'epiteli i entrar dins del citoplasma, s'activa la resposta immune innata. L'hoste ha de poder diferenciar entre les estructures pròpies i innòcues i les estructures presentades pels patògens. Els components de la immunitat innata són capaços de distingir estructures característiques dels patògens microbians que no estan presents a les cèl·lules de l'hoste. Aquestes estructures són conservades i solen ser estructures fonamentals per a la supervivència del patogen, la qual cosa és un clar avantatge, ja que aquests no poden generar mutacions i variar aquestes estructures per tal d'evitar el reconeixement per part de les cèl·lules de la immunitat innata [37]. Aquestes estructures s'anomenen patrons moleculars associats a patògens o PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*). Aquestes estructures són reconegudes per uns receptors específics anomenats receptors per al reconeixement o PRP (*pattern-recognition receptors*). Existeixen diferents tipus de receptors PRP que, al seu torn, es poden classificar segons la seva localització a la cèl·lula [45]. Els més importants i ubics són els receptors tipus Toll (TLR per les seves sigles en anglès *Toll-Like receptors*). Són receptors transmembrana que controlen els compartiments extracel·lulars i endosomals de la majoria de cèl·lules (incloent-hi tant les cèl·lules epitelials com les cèl·lules efectores del sistema immune) [45, 46]. A banda dels TLR, existeixen altres tipus de receptors, com els receptors RLR (*retinoic acid inducible gene 1-like receptors*) i els receptors NLR (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*). Aquests dos receptors controlen el compartiment citoplasmàtic i reconeixen estructures de la paret microbiana com per exemple el peptidoglicà. Finalment, els receptors

Introducció

CLR (*C-type lectin receptors*), estan situats a la membrana plasmàtica dels fagocits i reconeixen les mannoses de la paret cel·lular microbiana i algunes estructures de la paret dels fongs, com els glucans [37].

La unió dels PRP als seus lligands sobreactiva la transcripció de gens d'inflamació, la producció de citocines i altres molècules inflamatòries per tal de reclutar leucòcits cap al lloc d'infecció i iniciar la immunitat innata (Figura 7). A més, durant el procés d'inflamació les cèl·lules malmeses alliberen molècules endògenes. Aquestes molècules s'anomenen alarmines o DAMPs (*danger associated molecular patterns*) i també s'uneixen i activen els diferents PRP, perpetuant així la cascada inflamatòria [4,12].

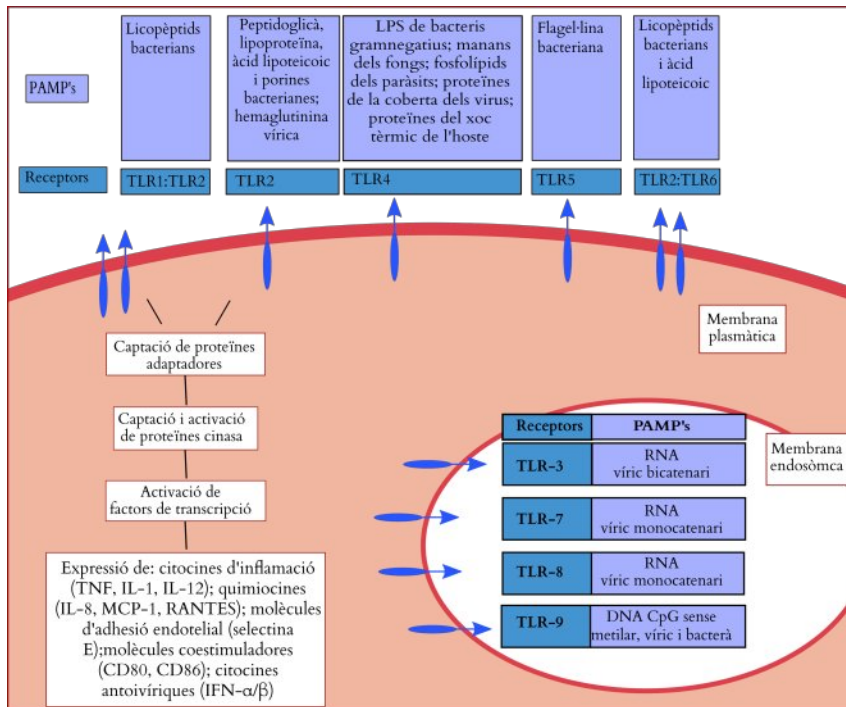


Fig. 7. Els diferents TLR en humans i els seus lligands com a exemple de l'activació de la resposta immune mitjançant els PRP. Modificat de la referència [37].

La resposta immune enfront d'una agressió consta de tres elements: un **element barrera** que té l'objectiu d'impedir inicialment la invasió de teixits estèrils per part dels patògens mitjançant una barrera estructural mucosa i la seva microbiota autòctona; la **resposta immune innata**, la qual proporciona la resposta primerenca enfront l'agressió, essent les seves principals funcions l'activació del complement, la fagocitosi i l'activació de la resposta inflamatòria, i la **resposta immune adaptativa**, la qual proporciona una resposta tardana i específica a l'agressió mitjançant el reconeixement d'antígens.

Tot i això, és la **immunitat innata** la que té un paper més important en la patogènia de la sèpsia, ja que una de les seves principals funcions és l'activació de la cascada inflamatòria mitjançant les citocines. Les citocines són unes proteïnes que poden ser pro-inflamatòries o anti-inflamatòries. L'objectiu final de l'alliberació i interacció d'aquestes molècules és controlar la càrrega microbiana i eliminar el patogen mitjançant la fagocitosi. En una situació favorable, la infecció induïx una resposta immune que a la vegada està fortament regulada i controlada, de manera que s'activa tant una cascada pro-inflamatòria com una anti-inflamatòria per tal d'evitar un dany excessiu a l'hoste [45]:

Cascada pro-inflamatòria: Les citocines pro-inflamatòries TNF- α i IL-1 β induïxen alteracions hemodinàmiques que promouen vessaments a través de l'endoteli vascular [47]. Paral·lelament, la IL-6 induïx la síntesi de proteïnes de fase aguda al fetge. Les citocines IL-8 i IL-17 promouen la quimiotaxi dels neutròfils al lloc d'infecció. L'IFN- γ és necessari per a activar la fagocitosi del patogen pels neutròfils.

Cascada anti-inflamatòria: Les citocines anti-inflamatòries són la IL-10 i receptors de citocines solubles, principalment els receptors de TNF p55 i p75 i el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra). La funció d'aquestes molècules és frenar l'excés d'inflamació i restaurar l'homeòstasi per tal de no danyar a l'hoste.

Per tant, la resposta coordinada d'aquests tres elements (elements barreira, immunitat innata i immunitat adaptativa) aconseguix el reconeixement i l'eliminació del patògen amb el mínim dany tissular o disfunció de processos fisiològics. La cadena d'esdeveniments seria la següent: després del reconeixement del patògen, hi ha una activació de cascades pro-inflamatòries seguida d'una activació anti-inflamatòria per a restaurar la homeòstasi del sistema immune (**Figura 8, apartat B**).

4.5. Fisiopatologia de la sèpsia

Una vegada s'estableix la infecció, l'hoste intentarà per tots els mitjans evitar la disseminació dels patògens. Els esdeveniments que s'inicien una vegada els TLR han reconegut el patògen promouen la vasodilatació, l'augment de la permeabilitat, el reclutament de neutròfils i monòcits i una coagulopatia local [39]. Com ja s'ha comentat, aquests processos pro-inflamatoris inicials són necessaris per poder eliminar el patògen i a més estan fortament controlats per tal de no perjudicar l'hoste. La magnitud d'aquesta resposta inflamatòria pot variar, depenent de diferents factors. Per exemple, la càrrega o la virulència del patògen o factors relacionats amb l'hoste que poden modular aquesta resposta, com per exemple les comorbiditats o la seva predisposició genètica [48]. Tot i que la resposta és molt diferent per a cada pacient, durant la primera fase de la sèpsia predomina una resposta pro-inflamatòria.

Quan la producció d'aquestes citocines pro-inflamatòries es descontrola, la cascada pro-inflamatòria és tant intensa que no pot ser controlada per les molècules anti-inflamatòries [45] (**Figura 8, apartat A**). Aquesta amplificació nociva de la inflamació es pot explicar per diferents causes. Els microorganismes poden activar diferents cascades mitjançant la interacció amb diferents PRPs. L'alliberament de factor tissular (TF) activa cascades extrínseques que condueixen a la formació de microtrombina, la qual provoca una coagulació intravascular disseminada que amplifica la cascada pro-inflamatòria (activant la producció de citocines i complement) i a més, pot provocar la fallida d'òrgans. A més, les

cèl·lules inflamatòries danyades alliberen al medi alarmines, perpetuant el procés inflamatori [39, 45, 48]. En la **Figura 9** s'observen els diferents esdeveniments del reconeixement dels PAMPs, les molècules efectores i mediadores i els efectes sobre els diferents òrgans de la resposta inflamatòria.

Tot i això, de vegades, la fase inicial pro-inflamatòria és ràpidament controlada i el que s'observa en molts pacients sèptics és una marcada immunosupressió provocada per una sobre-activació i una llarga durada de les cascades anti-inflamatòries (**Figura 8, apartat C**). Aquest fet provoca una disfunció del sistema immune de l'hoste que s'anomena immunoparàlisi. Aquest estat d'immunosupressió, que pot arribar a durar fins a setmanes, té com a conseqüència una més gran susceptibilitat per a infeccions secundàries per patògens oportunistes o una reactivació de la infecció primària que no ha estat degudament controlada [12, 48].

La conseqüència més greu de la sèpsia és la fallada multiòrganica, ja que aquesta és la principal causa de mort dels malalts sèptics. El procés d'aquesta disfunció no és encara ben conegut, però sembla ser que la hiperperfusió dels teixits i la hipòxia juguen un paper important. Els mecanismes de disfunció inclouen una disminució de la microperfusió, reducció en la deformabilitat de les cèl·lules vermelles, una mala distribució de la sang, edema de teixits causat per un augment de la permeabilitat dels capil·lars i una disminució en la pressió de la perfusió. A més, sembla que les cèl·lules no serien capaces d'utilitzar correctament l'oxigen disponible per disfuncions en el sistema respiratori mitocondrial. Finalment, infiltrats cel·lulars, principalment de neutròfils, podrien danyar els teixits directament mitjançant l'alliberació d'enzims lisosomals i radicals lliures [45].

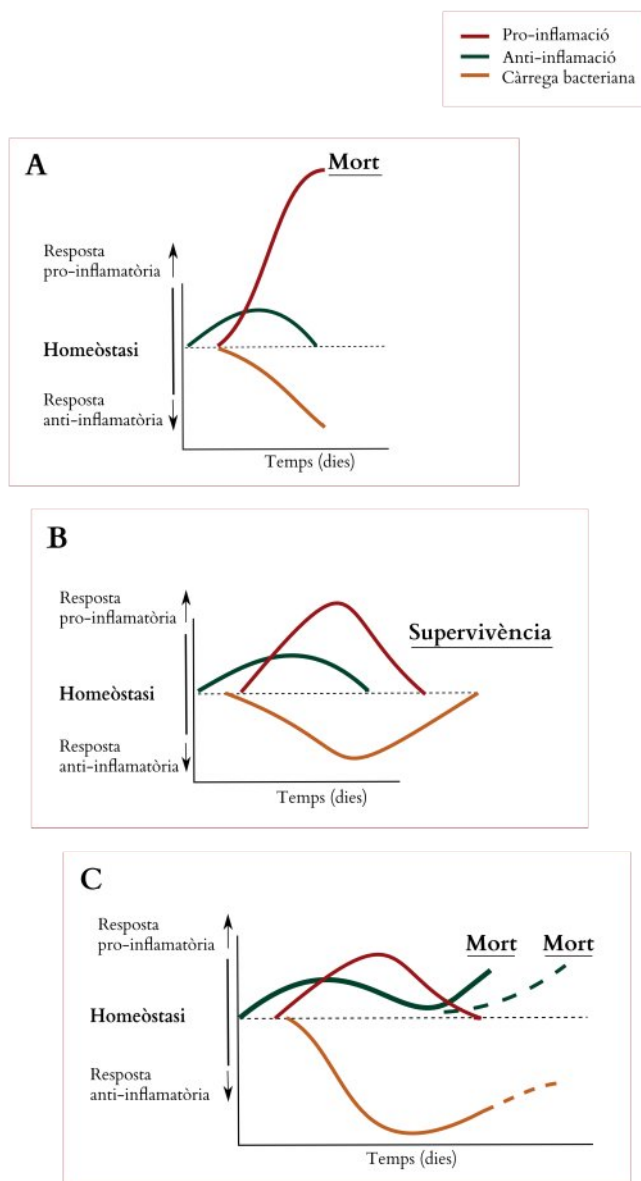


Figura 8. Representació de les diferents respostes immunològiques en els pacients amb sèpsia [48].

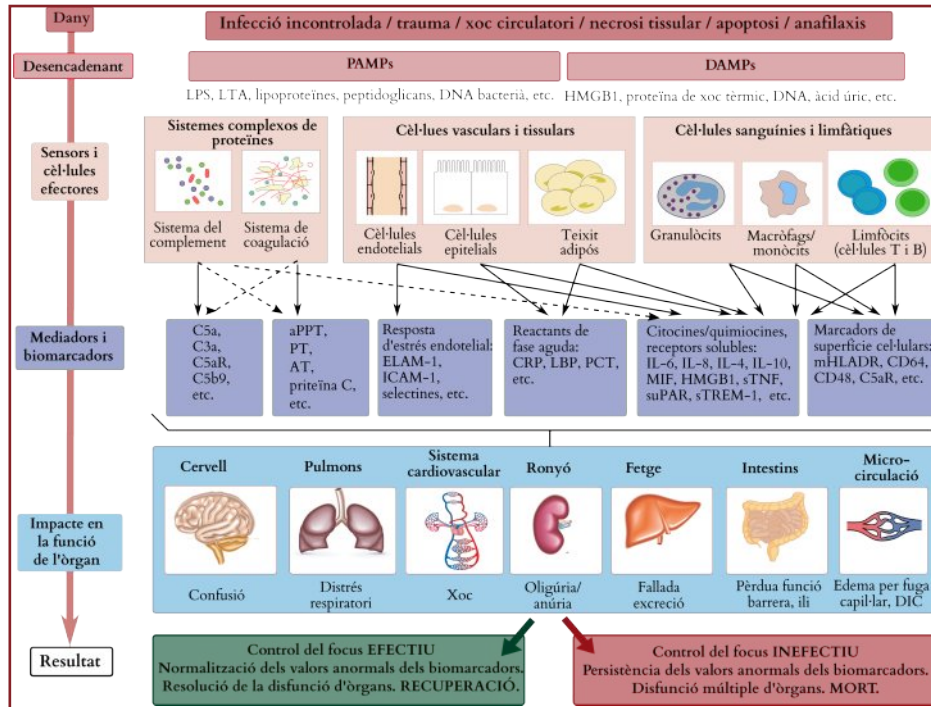


Figura 9. Representació simplificada de la resposta inflamatòria sistèmica. Modificat de [5].

PAMPs: Pathogen-associated molecular pattern; **DAMPs:** Danger associated molecular patterns; **LPS:** Lipopolisacàrid (part de la membrana externa dels gramnegatius); **LTA:** Àcid lipoteicoic part de la membrana externa dels grampositius; **HMGB-1:** High-mobility group box 1 protein; **C(3a/5a/5b-9):** proteïnes del sistema del complement; **C5aR:** Receptor de la proteïna C5a; **aPPT:** activated partial thromboplastin time; **PT:** prothrombin time; **AT:** antithrombin; **ELAM-1:** endothelial leukocyte adhesion molecule 1; **ICAM-1:** intercellular adhesion molecule 1; **CRP:** Proteïna C reactiva; **LBP:** LPS-binding protein; **PCT:** Procalcitonina; **IL:** Interleuquina; **MIF:** macrophage migration inhibitory factor; **sTNF:** soluble tumor necrosis factor; **suPAR:** soluble urokinase-type plasminogen activator receptor; **STREM-1:** soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1; **mHLADR:** monocytic human leukocyte antigen DR; **CD(64/48):** Clúster de diferenciació 48 o 64; **DIC:** disseminated intravascular coagulation.

5. Biomarcadors

Els biomarcadors es defineixen com “una característica que es pot mesurar objectivament i es pot avaluar com a indicador d’un procés biològic normal, un procés patogènic o com una resposta farmacològica a una intervenció terapèutica” [49].

En el cas de la sèpsia, degut a que la simptomatologia de SIRS pot ser donada per moltes altres causes (traumatismes, cremades, etc.) i que les manifestacions clíniques d’infecció poden ser inespecífiques i variades, fa més difícil el reconeixement precoç d’aquests malalts. Fa molt de temps que es cerca un biomarcador d’infecció que sigui el màxim sensible i específic per poder diferenciar entre el malalt amb sèpsia o aquells que tenen SIRS per altres causes. D’aquesta manera, es podria tractar de manera ràpida al malalt sèptic i no seria necessari l’administració d’antibiòtics a aquells malalts que no presentin infecció, ja que l’abús d’antibiòtics contribueix a l’aparició de resistències [49, 50].

Les principals utilitats i característiques desitjables en un biomarcador són les següents [50]:

- Distinció entre SIRS no infeccions i sèpsia
- Distinció entre infecció bacteriana i vírica
- Distinció entre infecció bacteriana localitzada i sistèmica
- Detecció precoç del malalt amb infecció greu (sèpsia, sèpsia severa i xoc sèptic)
- Predicció de bacterièmia i indicació d’obtenció d’hemocultius o altres proves microbiològiques
- Estratificació de risc de mala evolució i progressió a sèpsia severa i xoc sèptic
- Indicació d’administració d’antibiòtics
- Monitorització del tractament antibiòtic: mantenir-lo, aturar-lo o canviar de pauta

Per definició, els biomarcadors de sèpsia haurien de reflectir els canvis bioquímics característics d'aquest síndrome degut a la resposta inflammatòria de l'hoste a la infecció [5]. La cerca de biomarcadors es centra principalment en canvis bioquímics a nivell plasmàtic (sistema del complement o de coagulació) i indicadors de l'activació o inhibició de cèl·lules efectores (neutròfils, monòcits, macròfags i cèl·lules endotelials), les quals poden alliberar diferents mediadors d'inflamació (com les citocines, quimocines o proteïnes de fase aguda).

S'han descrit més de 180 molècules amb potencial per a ser un marcador biològic de sèpsia, tot i que només se n'han avaluat per al seu ús diagnòstic al voltant d'un 20 % [51, 52]. Donat que una revisió exhaustiva de tots els biomarcadors disponibles queda més enllà de l'abast d'aquesta tesi doctoral, és farà una breu revisió dels més extensament utilitzats (Proteïna C reactiva i Procalcitonina) així com de l'índex d'expressió del CD64 (clúster de diferenciació 64) dels neutròfils, ja que aquest últim ha atret l'atenció degut als elevats valors de sensibilitat i especificitat obtinguts. Per a més informació, C.E. Ventetuolo *et al.* [49], C. Pierrakos *et al.* [53], K. Reinhart *et al.* [5] i A. Julián-Jiménez *et al.* [50] han publicat revisions exhaustives sobre aquest tema.

Proteïna C reactiva (PCR)

La PCR és una proteïna de fase aguda que es sintetitza a l'inici de la inflamació, principalment als hepatòcits tot i que també es pot produir al macròfags alveolars [5, 49].

Durant la inflamació, la PCR té efectes pro- i anti-inflamatoris. Aquesta molècula s'adhereix als patògens i a les cèl·lules danyades i intervé en la seva eliminació interaccionant amb cèl·lules i mediadors d'inflamació. Tot i que s'han vist elevacions dels nivells plasmàtics de PCR en sèrum en diversos estats no infecciosos (com per exemple després d'una cirurgia), s'utilitza com a biomarcador en sèpsia degut a la seva concentració en sèrum s'eleva en resposta a una inflamació. A més, l'assaig és barat i

molt senzill [49]. Algunes característiques de la PCR, segons estudis publicats, serien les següents [5]:

- Avaluat la presència d'infecció i sèpsia
- La seva utilització en malalts amb càncer no es veu afectada per la neutropènia
- Diferència malalts amb pneumònia d'aquells amb infeccions endotraqueals
- En pacients crítics, concentracions elevades de PCR es correlacionen amb elevat risc de fallada multiorgànica i mort
- En pacients crítics, només és capaç de diferenciar entre els diferents estadis de sèpsia durant els primers 2 dies

Tot i això, el fet que tarda de 20 a 24 hores en elevar els seus nivells plasmàtics, que aquests poden romandre elevats durant alguns dies (inclús havent tractat la infecció) i que les concentracions de PCR també s'eleven en infeccions víriques fan que la seva utilització com a biomarcador diagnòstic de sèpsia no sigui tant clara [54]. Tot i això, la seva capacitat diagnòstica i pronòstica segueix essent superior a símptomes com la febre o la leucocitosi [50] i és un biomarcador molt utilitzat.

Procalcitonina (PCT)

La PCT és el precursor polipeptídic de la calcitonina, una proteïna sintetitzada en la glàndula tiroides i en les cèl·lules neuroendocrines del pulmó [50].

Aquesta proteïna s'expressa de forma ubíqua com a part de la resposta inflamatòria de l'hoste enfront diferents danys [5, 49]. La seva concentració en plasma es relaciona amb la càrrega bacteriana durant els processos infecciosos [50]. La PCT presenta una cinètica més apropiada, ja que la seva concentració en plasma s'eleva entre les 4h i les 12h des de l'inici de la infecció i, a més, els nivells es redueixen a la meitat quan la infecció és controlada pel sistema immune o la teràpia antibiòtica.

Algunes característiques de la PCT, segons estudis publicats, serien les següents [5]:

- Potencial per a discriminar entre SIRS estèril i sèpsia
- Els nivells de PCT es correlacionen amb la severitat de la infecció i la càrrega bacteriana
- Potencial per diferenciar entre infeccions bacterianes i víriques
- Utilitat per guiar el tractament antibiòtic

A l'HUGTiP es va desenvolupar un model predictiu utilitzant aquest biomarcador per tal de delimitar el pacients amb baix risc de bacterièmia que arriben al Servei d'Urgències i el potencial de la PCT per a ajudar a prendre decisions sobre la iniciació i/o duració del tractament antibiòtic que resulta molt interessant [55]. Tot i això, aquest biomarcador també presenta algunes limitacions, ja que els nivells de PCT es poden elevar en absència d'infecció com a conseqüència d'un estrès massiu (traumatisme, cremades, etc.). A més, el seu valor diagnòstic per a infeccions fúngiques és pobre. Tot i això, la PCT és un dels biomarcadors més prometedors i ja és àmpliament utilitzat.

Índex d'expressió del CD64

Recentment, l'índex d'expressió del CD64 als neutròfils ha atret l'atenció degut als seus elevats valors de sensibilitat i especificitat obtinguts.

El CD64 és un receptor integral de membrana (tipus Fc γ -I) que reconeix anticossos tipus IgG. Encara que en els monòcits s'expressa de manera constitutiva, en els neutròfils l'expressió augmenta només quan aquests han estat activats per l'interferó gamma i factors estimuladors dels granulòcits, els quals es produeixen en resposta a una infecció [56]. Els avantatges d'aquest marcador es llisten tot seguit [57,58]:

- Dóna un reflex directe dels efectes fisiològics de la presència de microorganismes a la sang.

- Una vegada activats, l'expressió del CD64 pels neutròfils augmenta de 5 a 10 ordres de magnitud, de manera que hi ha una bona discriminació entre malalts i sans.
- Es pot correlacionar amb la severitat de la sèpsia i el grau de fallada orgànica.
- Té bona sensibilitat en neonats i en nens.
- S'ha demostrat que és una bona eina per a diferenciar la infecció de la malaltia inflamatòria autoimmunitària.

Una de les limitacions més importants seria que aquest biomarcador no permet discriminar entre infeccions víriques i bacterianes. Tot i això, es tracta d'un biomarcador relativament nou, i falta encara una estandarització dels mètodes analítics, així com més estudis que demostrin la seva utilitat diagnòstica.

Comparació dels tres biomarcadors

En la **Taula 6** es detallen els valors de sensibilitat i especificitat d'aquests biomarcadors per al diagnòstic de les infeccions.

Taula 6. Comparació dels diferents biomarcadors

| | Diagnòstic d'infecció bacteriana enfront SIRS estèril | | Discriminació entre infecció bacteriana enfront vírica | | Referències |
|------|---|-------------------------|--|-------------------------|-------------|
| | Sensibilitat (IC 95 %) | Especificitat (IC 95 %) | Sensibilitat (IC 95 %) | Especificitat (IC 95 %) | |
| PCR | 78 % (70 - 85 %) | 60 % (38 - 79 %) | 73 % (62 - 82 %) | 81 % (55 - 93 %) | [50] |
| PCT | 85 % (76 - 91 %) | 83 % (68 - 92 %) | 82 % (65 - 92 %) | 88 % (50 - 98 %) | [50] |
| CD64 | 85 - 95 % (-) | 77 - 100 % (-) | - | - | [57] |

Donades les diferències entre els biomarcadors existents (aquests tres i d'altres que es troben a la literatura), l'estratègia que es proposa és la utilització de panels on es combinen diversos marcadors, tenint en compte els avantatges i limitacions que presenten cadascun. En un futur, s'esperen més estudis avaluant diferents combinacions de biomarcadors, on s'haurà de tenir en compte que aquestes molècules poden tenir cinètiques diferents en relació a l'edat, la patologia de base i el context clínic en que es troba el pacient [59]. A més, també són necessaris estudis de cost-eficàcia de la utilització d'aquestes combinacions. Tot i això, és tracta d'una eina força útil a l'hora d'estratificar els pacients sèptics i també a l'hora d'aplicar tècniques alternatives de diagnòstic, com les tècniques moleculars [60].

6. Maneig del pacient amb sèpsia

6.1. Diagnòstic clínic

La sèpsia es diagnostica mitjançant l'estudi dels símptomes i signes del malalt i per la detecció d'alteracions fisiològiques [5]. Tot i això, però, els símptomes clínics poden ser molt inespecífics i inclouen símptomes molt generals, com per exemple anormalitat en la temperatura corporal, metabolisme de la glucosa, confusió mental, etc [61]. El diagnòstic també es corrobora per altres dades analítiques obtingudes al laboratori, com el recompte de leucòcits o els resultats dels cultius [5, 62], els quals es van incloure en la definició acceptada durant la conferència internacional per a definir la sèpsia celebrada l'any 2001 (**Taula 2**) [12].

També s'ha de tenir en compte que en determinats tipus de pacients, com per exemple en els malalts immunodeprimits, els símptomes de la sèpsia poden resultar més subtils de per si degut a la immunosupressió o poden estar emmascarats per la utilització de glucocorticoides [63]. Degut a aquesta gran variabilitat dels símptomes i la complexitat fisiopatològica de la sèpsia, el reconeixement clínic d'aquest síndrome i l'avaluació de la seva severitat és complicada [61].

6.2. Maneig inicial del pacient

Per al correcte maneig del pacient sèptic, és de vital importància la ràpida detecció dels símptomes. Des de l'any 2002, existeix una iniciativa anomenada *Surviving Sepsis Campaign* que inclou diferents societats d'arreu del món. Aquesta iniciativa ha treballat per a estandarditzar els criteris de maneig de la sèpsia i des de llavors, s'han publicat guies i paquets de mesures (*bundles*) que recullen les recomanacions bàsiques per al maneig d'aquests pacients. Les accions principals per al correcte maneig del pacient sèptic són les següents [64 – 66]:

Reanimació inicial i suport hemodinàmic

L'objectiu de la reanimació i la intervenció hemodinàmica és millorar la perfusió i l'oxigenació dels teixits. Cal iniciar la reanimació immediatament en pacients que presenten hipotensió o el lactat en sèrum elevat (>4 mmol/L). Si cal, el pacient ha de ser admès immediatament a la Unitat de Medicina Intensiva sense que aquest fet retardi l'inici de les mesures de reanimació. Els objectius són els següents: pressió venosa central de 9 a 12 mm Hg, pressió arterial mitjana de ≥ 65 mm Hg, producció d'orina $< 0,5$ mL/kg/h, saturació d'oxigen venós central ≥ 70 %.

Identificació i control del focus

És molt important establir el focus anatòmic d'infecció el més ràpidament possible. A més, s'han de prendre les mesures adequades per tal d'eliminar-lo, ja sigui mitjançant el drenatge de l'abscess, desbridant el teixit necròtic, practicant la cura de les ferides, retirant qualsevol dispositiu intravenós infectat o duent a terme un control quirúrgic del focus d'infecció. Una vegada identificat, és important obtenir un cultiu del focus d'infecció per tal d'ajudar a dirigir el tractament antibiòtic. Les mesures de control del focus s'han de realitzar simultàniament amb la reanimació i l'administració d'antibiòtics. Sense un control del focus adequat, el pacient tindrà més dificultats per combatre la infecció, i per tant, tots els esforços per a reanimar i mantenir estable al pacient poden resultar infructuosos.

Tractament antibiòtic

Cal iniciar el tractament antibiòtic empíric intravenós durant la primera hora de reconeixement dels símptomes de sèpsia o xoc sèptic després d'obtenir els cultius necessaris. L'elecció de l'antibiòtic vindrà definida principalment pel focus de la infecció, l'estat immunològic del pacient, si la infecció és comunitària o nosocomial i el coneixement previ dels

patrons de susceptibilitat locals. Els antibiòtics d'ampli espectre han de cobrir els possibles agents causals (bacteris/fongs) i han de penetrar correctament al focus d'infecció sospitat.

En un estudi realitzat per A. Kumar *et al.* [67], van demostrar que el risc de mortalitat augmentava progressivament a mesura que augmentava el temps d'iniciar el tractament antibiòtic després de reconèixer els símptomes. A més, van observar una reducció de la supervivència amb cada hora de retard d'instaurar el tractament durant les primeres 6 hores.

Cal monitoritzar el tractament a diari per tal d'ajustar la dosi, optimitzar eficàcia, evitar toxicitats i quan el microorganisme causal sigui identificat i aïllat, reduir l'espectre quan sigui possible per tal d'evitar l'aparició de resistències. Els antibiòtics, en la majoria dels casos, s'han d'administrar durant un màxim de 7–10 dies. Si no existeix millora, cal plantejar-se la possibilitat de la presència d'un focus d'infecció no drenat, l'existència de complicacions com metàstasis sèptiques a distància, endocarditis o una deficiència immunològica.

Per altra banda, moltes vegades resulta complicat determinar quan aturar el tractament antibiòtic. Els clínics es poden trobar amb la incertesa de continuar amb el tractament antibiòtic en un pacient que va millorant, però que no hi ha proves definitives d'infecció o aturar-lo per tal d'evitar resistències, sobreinfeccions i despeses innecessàries. Cal tenir en compte que els hemocultius poden ser negatius fins en un 50 % dels casos, depenent del focus d'infecció i de si existeix tractament antibiòtic previ. Si es confirmés que la simptomatologia del pacient no correspon a una infecció, cal aturar el tractament antibiòtic.

Diagnòstic microbiològic

És de vital importància l'obtenció de cultius apropiats abans d'administrar el tractament antibiòtic per tal d'augmentar al màxim la probabilitat de confirmar la sèpsia microbiològicament. Es recomana extraure dos o més hemocultius (mínim 30 mL de sang) de forma percutània. A més, cal fer cultius d'altres llocs anatòmics, si està indicat clínicament i proves d'imatge per a confirmar possibles focus d'infecció.

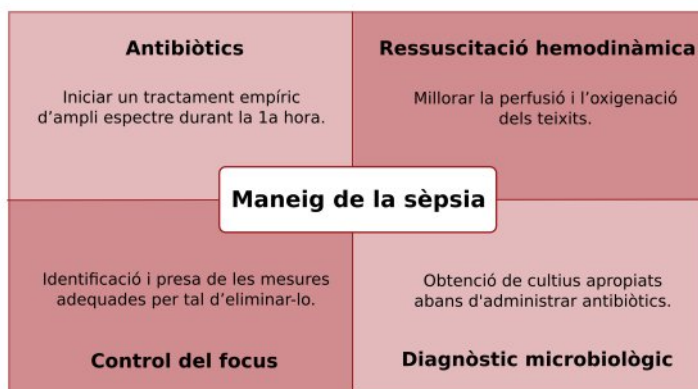


Figura 10. Esquema resum del maneig del malat sèptic.

7. Diagnòstic microbiològic de la sèpsia

7.1. Importància del diagnòstic microbiològic en el maneig de la sèpsia

L'elecció del tractament antibiòtic que se li administrerà al pacient ve definit principalment pel focus de la infecció, l'estat immunològic del pacient, si la infecció és comunitària o nosocomial i el coneixement previ dels patrons de susceptibilitat locals. Per tant, la informació que s'obté al Laboratori de Microbiologia mitjançant els cultius és essencial per tal de guiar al clínic en l'elecció del tractament més adequat.

Està demostrat que l'administració del tractament antibiòtic apropiat està associada a un augment de la supervivència del pacient [19, 67, 68], però per altra banda, un retard en el diagnòstic microbiològic pot comportar una administració perllongada d'antibiòtics d'ampli espectre que, a mig i llarg termini, afavorirà l'aparició de soques resistents [69]. Tot i això, fins el 40 % de pacients amb sèpsia reben un tractament antimicrobià inadequat fins la primera notificació d'un hemocultiu positiu, generalment basada en el resultat de la tinció de Gram. En aquest punt, un 12 – 20 % dels pacients encara no hauran rebut tractament antibiòtic i per al 30 – 45 % de pacients es modificarà el tractament antibiòtic basant-se en el resultat del Gram [19, 51].

La comunicació entre el clínic i el microbiòleg és bàsica per al correcte maneig del pacient, ja que informar activament dels resultats microbiològics comporta un canvi a un tractament antibiòtic adequat. E. Bouza *et al.* [51] van realitzar un estudi on s'avaluava l'impacte positiu en el maneig del pacient segons el procediment per al qual s'informava dels resultats microbiològics: A) informar telefònicament del resultat del Gram i donar un informe complet una vegada la identificació i la sensibilitat estaven disponibles; B) igual que A, però escrivint directament a la història clínica del pacient una opinió basada en la història clínica del pacient i incloent recomanacions terapèutiques; C) aquest grup incloïa

les accions dels grups A i B i a més, s'informava personalment al clínic responsable. En aquells grups on es va informar per escrit o personalment (grups B o C) es va millorar el tractament antibiòtic.

Al Servei de Microbiologia de l'HUGTiP es duu a terme una informació verbal i personalitzada dels resultats de la tinció de Gram i dels resultats d'altres cultius. Aquesta informació precoç permet orientar de forma ràpida i adequada el tractament antibiòtic [70].

En la **Figura 11** s'observa l'evolució de l'actitud del clínic després de la informació verbal per part del microbiòleg dels resultats obtinguts en el període comprès entre l'any 2002 i l'any 2014. Les actituds del clínic es van classificar de la següent forma: tractament inicial correcte, canvi al tractament d'elecció (ampliar/reduir l'espectre), canvi a un tractament efectiu, inici del tractament antibiòtic i cap seguiment de les recomanacions.

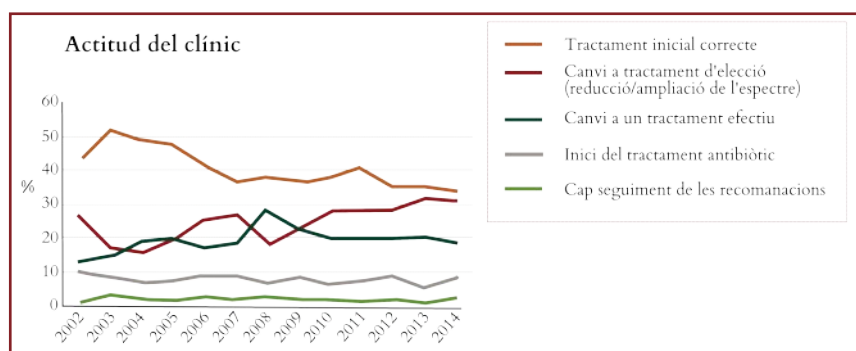


Figura 11. Evolució de l'actitud del clínic després de la informació verbal per part del microbiòleg des de l'any 2002 al 2014. Dades del Servei de Microbiologia de l'HUGTiP.

Com es pot observar en la **Figura 11** en la majoria de pacients el tractament inicial era correcte. Des de l'any 2002 al 2005, aquest percentatge es situava entre el 40 i el 50% tot i que a partir de 2005, el percentatge de tractament inicial correcte disminueix lleugerament fins a situar-se entre el 30–40%. Aquest fet es pot explicar per l'augment

d'infeccions causades per microorganismes resistents, les quals compliquen l'elecció del tractament. S'observa clarament un augment del percentatge de pacients que van haver de canviar a un tractament efectiu a partir del 2005. El més destacable d'aquesta gràfica és la proporció de pacients (al voltant del 50 %) en què, el fet d'informar el resultat microbiològic, permet ajustar el tractament antibiòtic inicial, ja sigui reduint o ampliant l'espectre.

Finalment, també cal comentar que el percentatge de pacients que no duien antibiòtic es manté constant al voltant del 10 % i que en un percentatge molt baix de pacients (al voltant del 2 %), els clínics no van seguir les recomanacions del microbiòleg, probablement per la reticència del clínic a modificar el tractament quan el pacient evoluciona favorablement [70].

Per tant, l'obtenció d'una identificació del patògen el més aviat possible, juntament amb la informació verbal d'aquesta, permet un millor maneig del pacient amb sèpsia.

7.2. Mètodes convencionals de diagnòstic microbiològic

Actualment, la tècnica de referència per al diagnòstic de la sèpsia es basa en l'hemocultiu, seguit de mètodes convencionals d'identificació i antibiograma. Per a realitzar aquesta tècnica, s'utilitzen un flascons amb un brou de cultiu ric. Per exemple, el sistema BACTEC (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) utilitza un medi de soja-casseïna. Tot i que poden existir diferents medis de cultiu, els més utilitzats són el medi aerobi, el qual conté CO_2 , i el medi anaerobi, que conté CO_2 reduït per a generar l'anaerobiosi. Aquests medis es troben dins d'uns flascons que, a més, contenen unes resines amb l'objectiu de quelar els antibiòtics que hi puguin haver a la mostra de sang.

7.2.1. Procediment

És molt important inocular l'hemocultiu abans d'iniciar la teràpia anti-biòtica [64], ja que aquesta podria interferir en la prova, donant un resultat fals negatiu. A més, cal realitzar l'extracció de l'hemocultiu correctament, per tal d'augmentar el seu valor diagnòstic. El moment recomanat per a realitzar l'extracció és el més proper al pic febril i l'inici dels calfreds [70, 71]. Per tal d'augmentar l'especificitat d'aquesta prova, és molt important realitzar l'extracció mitjançant una tècnica asèptica per tal d'evitar que es contami el flascó amb microorganismes de la microbiota de la pell. Els hemocultius contaminats compliquen la interpretació, especialment en malalts amb patologia de base onco-hematològica o amb dispositius endovenosos. A més, poden provocar ingressos innecessaris, retràs en el diagnòstic degut a errors d'interpretació clínica, administració d'antibiòtics i l'extracció de nous hemocultius o altres proves, que encareixen l'assistència sanitària [72].

L'altre factor determinant és el volum de sang cultivat, ja que d'aquest depèn la sensibilitat de la prova. Es defineix com a extracció d'un hemocultiu a la sang extreta d'una única venopunció, independentment dels flascons inoculats. Dos o tres extraccions es considera el nombre òptim per a aconseguir una màxima sensibilitat i que la tècnica segueixi sent cost/efectiva [73].

Al nostre centre, se'n realitzen 2: una extracció que inclou un flascó aerobi i un d'anaerobi, i una segona extracció a l'altre braç, amb un flascó aerobi, tots ells emplenats amb 10 mL de sang cadascun. Un cop al laboratori, els flascons s'introdueixen en un aparell incubador que monitoritza de manera automàtica cada 10 minuts la concentració de CO₂ del medi, el qual és producte del creixement bacterià. Quan aquesta concentració de CO₂ sobrepasa una certa concentració llindar, l'aparell detecta el flascó com a positiu. L'hemocultiu s'incuba fins a 5 dies abans de donar-lo com a negatiu.

7.2.2. Identificació i antibiograma

En general, es tarda una mitja de 15 – 17 h per a detectar un hemocultiu com a positiu, tot i que depèn del microorganisme [74]. Una vegada l'hemocultiu és positiu, el primer pas és realitzar una tinció de Gram, la qual cosa permet, per una banda, seleccionar en quins medis es realitzarà el subcultiu i per l'altra, permet informar al clínic de quin tipus de microorganisme es tracta i es pot, per tant, orientar el tractament empíric.

Una vegada s'obté el cultiu pur al dia següent, es realitzen diferents proves bioquímiques per a la identificació i s'enfronta el microorganisme a una bateria d'antibiòtics per veure la seva sensibilitat. En concret, al nostre Servei s'utilitza el sistema Viteck2Compact, de bioMérieux (Marcy l'Etoile, França), el qual permet realitzar la identificació dels microorganismes i obtenir l'antibiograma paral·lelament. Per a microorganismes amb requeriments especials (per exemple, els estreptococs que necessiten complementar el medi de l'antibiograma amb sang), l'antibiograma es realitza utilitzant el sistema Sensititre (ThermoScientific, Oakwood Village, OH, EEUU).

Tot aquest procés pot arribar a tardar fins a 48 – 60 hores. Tot i això, depenent de l'organització de cada laboratori, aquests temps es poden escurçar. Al nostre Servei es va posar a punt un protocol el qual permet inocular les targetes d'identificació (grampositius, gramnegatius, anaerobis, microorganismes fastidiosos i llevats) i antibiograma amb l'inòcul microbià obtingut directament de l'hemocultiu positiu, de manera que amb unes 6 – 9 hores s'obté la identificació i l'antibiograma [75, 76].

Per a optimitzar al màxim els beneficis d'aquest protocol ràpid d'identificació i antibiograma, caldria disposar d'atenció microbiològica continuada durant les 24 hores. A la **Figura 12** s'observa la línia temporal dels mètodes convencionals de diagnòstic, incloent el protocol optimitzat que utilitzem al nostre Servei.

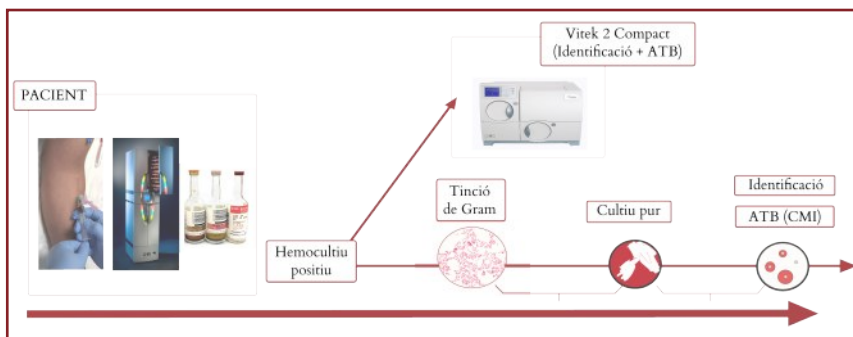


Figura 12. Línea temporal dels procediments convencionals i els adaptats al nostre Servei d'identificació i antibiograma.

7.2.3. Limitacions de l'hemocultiu

L'hemocultiu és la tècnica de referència i permet aïllar i identificar l'agent etiològic de la sèpsia. Això permet determinar la seva sensibilitat als antibiòtics i per tant, optimitzar el tractament empíric que rep el pacient. També dona informació del focus d'infecció i ajuda a determinar si calen accions complementaries per al seu control, com per exemple drenatge, retirada d'un catèter infectat, etc. [73].

L'hemocultiu permet detectar fins a una unitat formadora de colònia per mil·lilitre de sang (UFC/mL) [77]. Tot i això, aquest mètode presenta algunes limitacions: a banda dels factors de manipulació que poden limitar la seva sensibilitat, com no inocular el volum adequat o que hi hagi un retard important des de la inoculació del flascó fins la seva introducció a l'instrument d'incubació, existeixen altres característiques inherents a aquesta tècnica que afecten el seu valor diagnòstic.

Per una banda, la major limitació és el temps que es tarda fins a poder donar una identificació, ja que existeix un retard fins que l'instrument detecta l'hemocultiu com a positiu. Per altra banda, l'hemocultiu presenta una sensibilitat limitada quan es tracta de microorganismes que no creixen en medis artificials o microorganismes de creixement lent (com

per exemple fongs). Finalment, la sensibilitat de l'hemocultiu també es veu afectada si el pacient duu alguna dosi d'antibiòtic prèvia a l'extracció de sang [77 – 79].

Aquests factors són els principals responsables de que el percentatge d'hemocultius positius sigui baix [80, 81]. Al nostre centre, són positius al voltant del 10 % dels hemocultius practicats.

7.3. Diagnòstic molecular de la sèpsia

Des de fa alguns anys, s'estan desenvolupant diferents mètodes que busquen cobrir les limitacions de l'hemocultiu, oferint més rapidesa en l'obtenció de la identificació i la possibilitat de detectar microorganismes que no creixen bé a l'hemocultiu, ja sigui per l'administració prèvia d'antibiòtics o per característiques inherents del patògen [77, 78]. Aquests mètodes es basen en la detecció de molècules concretes d'un microorganisme (material genètic o proteïnes de la paret cel·lular) per a poder identificar-lo. Les característiques ideals que hauria de tenir una tècnica molecular per a implementar-la com a eina diagnòstica a un laboratori serien les següents :

- Detecció d' un ampli rang de patògens
- Detecció de resistències als antibiòtics
- Elevada sensibilitat i especificitat
- Automatització
- Rapidesa
- Cost assequible

Es pot realitzar el diagnòstic molecular de la sèpsia a partir de dos tipus de mostres: hemocultiu positiu i sang total. Tot i que l'estratègia conceptualment és la mateixa, poden existir diferències en el procés, segons el tipus de mostra. Per tant, en aquest apartat es revisaran els diferents mètodes comercialitzats fins l'actualitat per al diagnòstic molecular de la sèpsia, tant a partir d'hemocultiu positiu com a partir de sang total. En la

Figura 13 s'esquematitzen aquests mètodes i s'inclou la tècnica avaluada durant aquesta tesi doctoral.

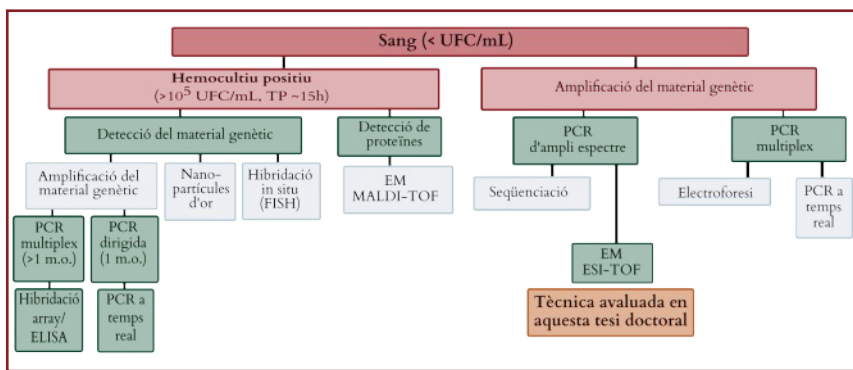


Figura 13. Esquema de les diferents estratègies comercialitzades i avaluades per al diagnòstic molecular de la sèpsia.

UCF: unitat formadora de colònia; TP: temps positivat; EM: espectrometria de masses; PCR: reacció en cadena de la polimerasa; MALDI: Matrix assisted laser desorption/ionization; ESI: Electrospray ionization; TOF: time of flight; FISH: Fluorescent in situ hybridization; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; m.o.: microorganisme

7.3.1. Diagnòstic molecular a partir de l'hemocultiu

7.3.1.1. Detecció del material genètic

A. Sense amplificació prèvia dels àcids nucleics

I. Hibridació fluorescent in situ. En aquesta tècnica, s'utilitzen sondes d'oligonucleòtids marcades amb fluorescència que hibridaran amb gens del microorganisme a identificar, generalment el 16S rRNA. La preparació de la mostra és molt simple. Primer, es fixa una gota d'hemocultiu positiu a un portaobjectes i se li afegeix la sonda. Seguidament, es desnatura el DNA (90 minuts a 55 °C) per a permetre la hibridació amb la sonda específica del microorganisme. Després d'una breu incubació i un rentat, s'observarà fluorescència al microscopi indicant la presència del microorganisme buscat [78]. Aquest tipus de tècnica requereix una elevada concentració de DNA. Una versió millorada d'aquesta tècnica utilitza unes sondes anomenades *peptide nucleic acid* (PNA). L'avantatge

que ofereixen és que tenen una càrrega neutra i permeten hibridacions més robustes. Aquesta tècnica, comercialitzada per **AdvanDX** (Woburn, MA, USA), ofereix la identificació a partir d'hemocultiu positiu dels següents microorganismes: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, bacils gramnegatius (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) i *Candida albicans*. Les sensibilitats i especificitats són elevades (> 95 %) [82, 83]. Al nostre Servei, es va realitzar un estudi per avaluar aquest sistema per a la detecció de *Staphylococcus aureus*, i es va obtenir una sensibilitat i especificitat del 100 % i 99,4 % respectivament [84].

II. Detecció per nanopartícules d'or. Recentment s'ha comercialitzat la tecnologia **Verigene Blood culture Nucleic Acid Test** (Nanosphere, Northbrook, IL, USA). En aquest assaig, la detecció es realitza mitjançant unes sondes específiques per a cada patògen immobilitzades en un portaobjectes de vidre. Els àcids nucleics extrets de l'hemocultiu positiu s'incuben en presència d'aquestes sondes que hibridaran si el microorganisme està present. Un segon grup de sondes, conjugades a nanopartícules d'or i complementàries a la seqüència diana s'afegeix, creant un sandvitx. Aquestes nanopartícules d'or permeten amplificar el senyal, ja que són de 2 a 3 vegades més sensibles que els assajos immunològics i permet eliminar el pas previ d'amplificació. A més, com que cal que hibridin les dues sondes per tal de produir el senyal, es tracta d'una tècnica molt específica. A més, és un sistema ràpid (3 hores) i no requereix manipulació, ja que l'extracció dels àcids nucleics i la detecció es realitza dins d'un cartutx tancat. Actualment, existeix un assaig per a grampositius ja comercialitzat i un per a gramnegatius en desenvolupament [72, 85]. En l'**Apèndix I (Taula 1)** es poden observar els microorganismes detectats pels dos assajos de Verigene. La sensibilitat i especificitat d'aquest assaig és molt elevada, entre el 97 – 100 %.

B. Amb amplificació prèvia dels àcids nucleics.

III. PCR dirigida (1 microorganisme). La utilitat diagnòstica d'aquest tipus de PCR és limitada, ja que un elevat nombre de microorganismes poden estar implicats en la sèpsia. Tot i això, existeixen assajos que per-

meten identificar *Staphylococcus aureus* i detectar, simultàniament, la resistència a la meticil·lina. Aquesta tècnica resulta de gran utilitat per a poder confirmar la presència d'aquest patògen quan a la tinció de Gram s'observen cocs grampositius en forma de raïm, indicadors del gènere *Staphylococcus* [78]. Actualment, existeixen algunes plataformes, com per exemple el **GeneXpert** (Cepheid, Sunyvale, CA, EEUU) o **GenomEra** (Abacus Diagnostica, Turku, Finlàndia) que han desenvolupat assajos completament automatitzats, on, breument, la mostra s'afegeix a un cartutx que conté tots els reactius necessaris tant per a l'extracció del DNA com per a l'amplificació dels àcids nucleics i la detecció dels mateixos. Es tracta de tècniques ràpides (menys d'una hora) que no requereixen de personal format en tècniques de biologia molecular [72, 86]. Aquestes tècniques presenten sensibilitats i especificitats molt elevades (superiors al 95 % en ambdós casos).

IV. PCR multiplex (diversos microorganismes). Una estratègia molt emprada en el diagnòstic molecular de les malalties infeccioses i per tant, també en la sèpsia, és la PCR múltiple, la qual permet identificar un nombre més o menys elevat de patògens de forma simultània. Hi ha diversos assajos comercialitzats que utilitzen aquesta aproximació. Cal remarcar que a la literatura es poden trobar diferents assajos in house que utilitzen diferents sistemes, com per exemple, la piroseqüenciació, per tal d'identificar els microorganismes presents a l'hemocultiu. Un dels primers assajos en ser comercialitzats van ser el **Prove-it Sepsis** (Mobi-diag, Helsinki, Finlàndia), que detecta fins a 50 microorganismes, la resistència a cloxacil·lina mitjançant el *mecA* (**Apèndix I, Taula 1**) i realitza la detecció mitjançant hibridació de sondes específiques en format de microarray [72]. Aquest assaig requereix prou de temps manual i calen 3,5 h per a obtenir el resultat. Els valors de sensibilitat i especificitat d'aquesta tècnica són elevats (> 95 %). Recentment, s'ha comercialitzat un nou assaig, el **FilmArray Blood Culture Identification** (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Aquest sistema detecta 15 microorganismes a nivell de gènere, 11 a nivell d'espècie i alguns gens de resistència. Aquest sistema també té l'extracció de DNA, l'amplificació i la detecció

(en format PCR a temps real) integrada en un únic cartutx. La PCR múltiplex és niuada, per tal d'augmentar la sensibilitat de l'assaig. La detecció es realitza en 1h i tan sols cal introduir una alíquota de l'hemocultiu al cartutx. La sensibilitat és del 83 – 88 % i l'especificitat > 98 %.

En la **Taula 7** s'observa un resum dels assajos moleculars abans esmentats.

Taula 7. Comparació dels diferents assajos comercialitzats per a la detecció de microorganismes a partir d'hemocultiu positiu.

| | GeneXpert (Cepheid) | GenomEra (Abacus Diagnostics) | Prove-it Sepsis (Mobdiag) | FilmArray (BioFire Diagnostics) | Verigene (Nanosphere Technology) |
|--------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---|--|
| Principi assaig | PCR a temps real | PCR homogènia + sonda fluorescent | PCR multiplex + microarray | PCR multiplex a temps real | Hibridació en microarray |
| Espècies identificades | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | 60 bacteris + 13 fongs | 24 espècies / gèneres de bacteris + 5 fongs | GN: 9 espècies / gèneres GP: 13 espècies / gèneres |
| Detecció de resistències | <i>mecA</i> | <i>mecA</i> | <i>mecA</i> , <i>van A/B</i> | <i>mecA</i> , <i>van A/B</i> i <i>bla_{KPC}</i> | CTX-M (BLEA), 5 carbapenemases <i>mecA</i> , <i>vanA/B</i> |
| Temps fins al resultat | 1 h | 55 minuts | 3 h | 1 h | 2,5 h |
| Sensibilitat (%) | 100 | 100 | 95 | 88 - 100 | 81 - 100 |
| Especificitat (%) | 99 - 100 | 99,8 - 100 | 99 | 91 - 98 | 98 - 100 |
| Referències | [72, 85] | [86] | [72, 85] | [72, 85] | [86] |

GN: gramnegatiu; GP: grampositiu

7.3.1.2. Detecció de proteïnes

A. Espectrometria de masses

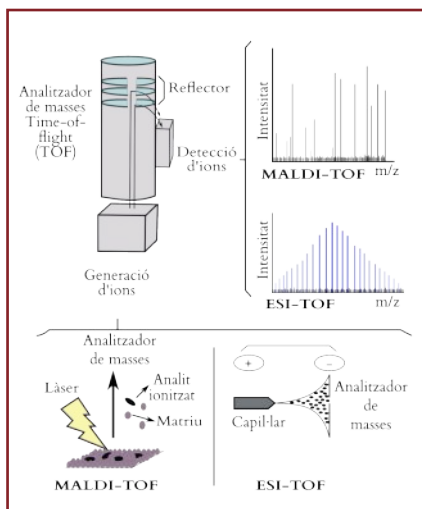
Tot i que aquesta tecnologia ha estat disponible durant molts anys, ha estat recentment quan s'ha introduït de forma massiva als laboratoris de Microbiologia, al desenvolupar-se plataformes senzilles dirigides al laboratori de diagnòstic. Aquesta tecnologia per tant, ofereix una alternativa ràpida i fiable per a la identificació de microorganismes, basant-se en el seu perfil proteic [87]. El tipus d'espectrometria de masses (EM) que s'utilitza per a aquesta aproximació és l'anomenat MALDI-TOF, que ve de les sigles en anglès per *matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight*.

Tot i això, existeixen altres estratègies d'espectrometria de masses amb les quals es poden analitzar àcids nucleics, com per exemple, l'anomenada ESI-TOF, per les seves sigles en anglès d'*electrospray ionization time-of-flight*. Donat que aquesta última aproximació ha estat avaluada en aquesta tesi doctoral, s'explicaran els fonaments de les dues aproximacions per a, tot seguit, profunditzar en l'aplicació del MALDI-TOF per a la identificació de microorganismes a partir de l'hemocultiu positiu.

B. Fonaments de l'espectrometria de masses

Un espectròmetre de masses produeix, separa i detecta ions en fase gasosa. El primer pas per tant, és aplicar una font d'ionització sobre una molècula, a la qual se li afegiran o extrauran electrons, de manera que aquesta molècula tindrà una càrrega elèctrica.

En el cas del MALDI-TOF, la mostra es recobreix d'una matriu orgànica i es diposita sobre una targeta de material conductor. L'energia del làser causa una desestructuració de la matriu, generant un núvol de partícules. Els ions s'extrauen quan són sotmesos a un camp elèctric, on seran accelerats en funció de la seva càrrega i s'introduiran a l'analitzador de masses. En el cas de l'ESI-TOF, la mostra es troba dissolta en un solvent orgànic que s'injecta a través d'un capil·lar. La diferència de po-



tencial necessària per a generar els ions s'aconsegueix mitjançant un camp elèctric generat per dos elèctrodes, de forma que es genera un aerosol de petites gotes carregades que entraran a l'analtzador de masses (Figura 14).

Figura 14. Esquema del funcionament d'un espectròmetre de masses.

L'analtzador de masses és el component principal de l'espectròmetre, ja que és on es separen els ions. Tot i que n'hi ha de diferents tipus, el més utilitzat és el tipus *time-of-flight* (temps de vol). L'estructura delimita una zona de vol a través de la qual els ions són accelerats, adquirint una elevada energia cinètica. Durant aquest trajecte, els ions es separaran segons la seva relació massa/càrrega (m/z). Al final de la zona de vol, els ions impacten contra un detector. El temps que tarden en arribar al detector, anomenat temps de vol, depèn d'aquesta relació m/z . També es pot trobar un quart element, el reflector, que permet augmentar la resolució [87].

A partir de la informació recollida pel detector, es genera un espectre de masses. En l'eix de les ordenades, es representen els diferents valors m/z , mentre que en l'eix de les abscisses, es representa la intensitat, és a dir, el nombre d'ions d'una determinada m/z que ha impactat contra el detector.

En el cas del MALDI-TOF, els ions generats tenen una sola càrrega ($z = 1$), de manera que la relació m/z equival a la massa de l'analt, per això a l'espectre s'observa un pic predominant. En canvi, en el cas de

l'ESI-TOF, a l'espectre es representen tots els ions generats a partir dels analits en les seves diferents intensitats, de forma que s'observen diferents pics. En aquest cas, el pes molecular de l'analit s'obté calculant la mitja de totes les masses moleculars relatives de cada ió obtingut.

C. MALDI-TOF per a la identificació de microorganismes.

La identificació de microorganismes mitjançant la tècnica de MALDI-TOF es basa en la detecció del perfil proteic d'aquests. Actualment, hi ha dos plataformes comercialitzades: el MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanya) i Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) i són tècnicament molt similars. La identificació s'aconsegueix comparant el perfil proteic generat per l'espectròmetre de masses amb la base de dades que ofereix la casa comercial, on es troben representades una elevada varietat de microorganismes. A més a més, aquestes bases de dades són parcialment obertes, de manera que permeten introduir nous perfils d'aïllats locals [88]. Una vegada comparat el patró obtingut amb la base de dades, s'ofereixen les diferents identificacions obtingudes amb un valor que indica la fiabilitat d'aquestes. A més, aquesta fiabilitat de la identificació es classifica segons el següent rang de valors: ≥ 2 , identificació fiable a nivell d'espècie; entre 1,7 i 2, identificació fiable a nivell de gènere; $< 1,7$ identificació poc fiable.

Cal tenir en consideració que aquesta tècnica requereix un mínim de $10^5 - 10^7$ UFC/mL per tal d'obtenir un patró proteic fiable. La identificació es pot realitzar a partir de cèl·lules intactes (colònies en cultiu pur o pellet d'un cultiu líquid) o mitjançant una extracció prèvia de proteïnes (utilitzant una solució d'alcohol-àcid fòrmic), la qual permet millorar la identificació d'alguns microorganismes concrets, com per exemple bacteris grampositius, gramnegatius no fermentadores o llevats.

Per al diagnòstic de la sèpsia, l'aproximació més utilitzada és la identificació a partir d'un pellet d'hemocultiu positiu [87, 88]. Com que la puresa de la mostra pot influenciar en la fiabilitat de la identificació, es recomana realitzar una extracció prèvia, ja que aquesta permet eliminar

substàncies, com per exemple la sang o medi de cultiu, que poden interferir en el procés d'anàlisi [72]. S'ha vist que el MALDI-TOF, en general, identifica millor els bacteris gramnegatius que els grampositius. En la **Taula 8** s'observa un resum de les publicacions més rellevants on s'experimenta la identificació amb el BioTyper (Bruker) a partir d'hemocultiu positiu. De forma general, el percentatge d'identificacions correctes de bacteris gramnegatius en la majoria d'estudis publicats és de 90 – 99 % i entre 60 – 70 % per als bacteris grampositius [72].

7.3.1.3. Avantatges i desavantatges del diagnòstic molecular de la sèpsia a partir d'hemocultiu positiu

Treballar amb l'hemocultiu positiu com a mostra inicial ofereix l'avantatge que la concentració de patògens és molt elevada ($> 10^5$ UFC/mL). Per tant, sigui quina sigui l'aproximació (detecció de material genètic o proteïnes), hi ha una quantitat suficient com per a obtenir deteccions molt sensibles i específiques. Aquestes tècniques permeten identificar els patògens abans que amb els mètodes convencionals a partir de subcultius. Per contra, utilitzar aquest tipus de mostra implica compartir les limitacions de l'hemocultiu: necessitat de 15 – 17 hores fins que l'hemocultiu es detecti com a positiu, baixa sensibilitat per a detectar microorganismes que no creixen en medis artificials o quan el pacient està tractat amb antibiòtics.

Introducció

Taula 8. Identificació de bacteris i llevats a partir de hemocultius positius mitjançant la plataforma MALDI Biotyer (Bruker Daltonics). Sistema d'hemocultiu: BACTEC 9240 (Becton Dickinson). Extracció prèvia mitjançant etanol/àcid fòrmic.

| N i tipus de mostra analitzada | Identificació a nivell d'espècie | Identificació a nivell gènere | Mostres polimicrobianes | Comentaris | Referència |
|--------------------------------------|--|--|---|--|------------|
| 240 hemocultius (bacteris) | Global: 76 % GP: 64 % GN: 87 % | Global: 76 % | N = 22 ID espècie més abundant: 82 % | Dificultat ID grup <i>Streptococcus viridans</i> i <i>Streptococcus</i> spp. | [89] |
| 179 hemocultius (bacteris) | Global: 80 % GP: 70 % GN: 87 % | Global: 80 % | N = 10 ID espècie més abundant: 81 % | Dificultat ID <i>Streptococcus mitis</i> (8 identificats com <i>S. pneumoniae</i> , amb una fiabilitat > 1,9). Dificultat ID <i>P. acnes</i> | [90] |
| 277 hemocultius (bacteris) | Global: 94 % GP: 93 % GN: 98 % | Global: 95 % | N = 16 ID espècie més abundant: 81 % | La concentració de microorganismes és un factor crític per a una bona identificació, s'estableix 10 ⁷ cèl·lules com a concentració mínima. | [91] |
| 318 hemocultius (bacteris i llevats) | Global: 42 % GP: 32 % GN: 85 % Llevats: cap | Global: 72 % GP: 65 % GN: 98 % Llevats: 5 % | No | Dificultat de ID <i>Candida</i> spp. En bacteris GP, valors entre 1,5 - 1,7 van oferir la mateixa ID a nivell de gènere que els mètodes convencionals. | [92] |
| 503 hemocultius (532 bacteris) | Global: 90 % GP: 89 % GN: 91 % | Global: 90 % | N = 21 ID espècie més abundant: 81 % | Dificultat ID <i>Streptococcus mitis</i> (identificat com a <i>S. pneumoniae</i>). | [93] |
| 126 hemocultius positius (bacteris) | Global: 78 % GP: 73 % GN: 90 % | Global: 79 % | No | Dificultat ID grup <i>Streptococcus mitis</i> o espècies molt properes d' <i>Streptococcus</i> spp. Dificultat ID bacteris GP o bacteris encapsulats | [94] |
| 507 hemocultius (bacteris) | Global: 59 % GP: 46 % GN: 80 % | Global: 74 % GP: 68 % GN: 87 % | N = 31 ID espècie més abundant: 65 % | Dificultat ID <i>Streptococcus mitis</i> (identificat com a <i>S. pneumoniae</i>) i anaerobis | [95] |

GP: bacteris grampositius; **GN:** bacteris gramnegatiu; **ID:** identificació; **Valors fiabilitat:** 2, identificació fiable a nivell d'espècie; entre 1,7 i 2, identificació fiable a nivell de gènere; <1,7 identificació poc fiable.

7.3.2. Diagnòstic molecular a partir de sang total

7.3.2.1. Tècniques comercialitzades

A. PCR d'ampli espectre

I. SepsiTest (Molzym, Bremen, Alemanya)

Aquest assaig es basa en una PCR universal en temps real, amplificant els gens ribosomals 16S i 18S, seguida de la seqüenciació del producte amplificat. Aquest sistema utilitza un protocol d'extracció de DNA innovador, ja que permet realitzar una degradació selectiva del DNA humà abans del pas de la lisi cel·lular bacteriana [96]. Aquest sistema utilitza 1 mL de sang. En la primera versió de l'assaig, l'extracció del DNA es realitzava de forma manual mitjançant un sistema de columnes, tot i que actualment, existeix la possibilitat de realitzar l'extracció de manera automatitzada mitjançant un extractor. S'han publicat diversos estudis que utilitzen aquest mètode per al diagnòstic de sèpsia. A l'estudi de N. Wellinghausen *et al.* [96], que inclou el major número de mostres ($N = 342$), es va obtenir una sensibilitat i especificitat del 87 % i 85,8 % respectivament. S'han publicat alguns estudis més petits, en els quals els valors de sensibilitat obtinguts són més baixos. Per una banda, l'estudi de J. Schreiber *et al.* [97], va incloure 50 mostres, amb una sensibilitat del 46 % i una especificitat del 100 %. E. Leitner *et al.* [98] van fer un estudi incloent 57 mostres amb un 37,5 % de sensibilitat i 86,6 % d'especificitat. A.J. Loonen *et al.* [99], van incloure 125 mostres i van obtenir amb una sensibilitat i especificitat del 37 % i 96 % respectivament, comparant amb l'hemocultiu.

Al nostre Servei, es van fer diverses proves amb la primera versió d'aquest assaig de juny a setembre de 2008, però els resultats no van resultar satisfactoris. Es van analitzar un total de 12 mostres de sang total de pacients amb sospita de sèpsia confirmada per hemocultiu positiu i, d'aquestes, no es va detectar el microorganisme aïllat a l'hemocultiu en cap cas. Al nostre Servei, l'amplificació es va realitzar mitjançant el

SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, EEUU) i vam observar una manca de reproductibilitat de l'assaig en intentar repetir la PCR de mostres on s'observava una temperatura de melting del DNA corresponent a una detecció positiva. Per altra banda, la utilització d'un mètode manual d'extracció basat en columnes, juntament amb el fet d'haver de seqüenciar per tal d'obtenir la identificació, ens va fer descartar aquesta metodologia per introduir-la a la pràctica clínica.

B. PCR multiplex

II. SeptiFAST (Roche, Manheim, Alemanya)

Aquesta tècnica es defineix com a una PCR múltiplex a temps real, tot i que, estrictament parlant, aquesta definició no seria correcta, ja que es basa en l'amplificació d'un gen universalment conservat, l'ITS (*internal transcribed spacer* o transcrit espaiador intern), que es troba localitzat entre els gens ribosomals 16S i 23S per als bacteris i 18S i 5.8S per als fongs. La posterior identificació dels microorganismes es realitza mitjançant diverses sondes fluorescents específiques per a cada microorganisme, utilitzant l'instrument LightCycler 2.0 (Roche, Manheim, Alemanya). L'assaig detecta 25 patògens, incloent cinc espècies de *Candida* spp. i *Aspergillus fumigatus* [100]. La detecció del gen de resistència *mecA* es realitza mitjançant un assaig complementari. El volum inicial de sang utilitzat és de 3 mL (utilitzant el protocol d'extracció de DNA manual, es processen dues alíquotes de 1,5 mL en paral·lel) o 1,5 mL (utilitzant l'extracció de DNA automatitzada, mitjançant l'instrument MagnaPure) [101] i el temps fins a l'obtenció del resultat és de 4,5–6 hores. Aquest assaig ha estat àmpliament avaluat en l'entorn clínic; no obstant això, els resultats publicats són discrepants entre les diferents publicacions. Recentment, dos grups han realitzat un meta-anàlisi d'aquest sistema. S.S. Chang *et al.* [102], va incloure dades de 34 estudis analitzant un total de 6.012 pacients. La sensibilitat total calculada del SeptiFast en comparació amb l'hemocultiu va ser del 75 % (interval de confiança al 95 %, 65–83 %), i l'especificitat va ser del 92 % (interval de confiança al 95 %, 90–95 %). Per altra banda, P. Dark *et al.* [103] va

incloure dades de 41 estudis analitzant un total de 10.497 pacients. En aquest cas, la sensibilitat total calculada del SeptiFast en comparació amb l'hemocultiu va ser del 68 % (interval de confiança del 95 %, 63 – 73 %), i l'especificitat va ser del 86 % (interval de confiança al 95 %, 84 – 89 %). La diferència entre els valors obtinguts es podria explicar pel tipus d'estudis inclosos (P. Dark *et al.* va incloure resums i comunicacions, a banda d'articles mentre que S. S. Chang *et al.* només va incloure articles) o la cerca realitzada (l'estratègia de cerca utilitzada per P. Dark és molt més completa [104] que la utilitzada per S. S. Chang). El que si que s'observa en ambdós estudis és que el rendiment de la prova varia clarament en funció del grup de pacients analitzat.

III. VYOO (SIRS-Lab, Jena, Alemanya)

L'assaig VYOO es basa en una PCR múltiplex que detecta 34 patògens (incloent sis espècies de *Candida* spp. i *Aspergillus fumigatus*), així com diversos gens de resistència a antibiòtics (gen de resistència a la meticil·lina *mecA*, gens de resistència a la vancomicina *vanA* i *vanB* i gens de resistència a β -lactàmics (*bla*_{SHV} i *bla*_{CTX-M}). Els productes amplificats es visualitzen mitjançant una electroforesi en gel convencional i el temps fins a la obtenció del resultat és de 8 hores. Per a aquest assaig, s'utilitza un volum de sang de 5 mL i el DNA microbià s'enriqueix mitjançant una columna de cromatografia d'afinitat que s'uneix específicament al DNA microbià (LOOXTER®) [105]. A més, el DNA humà s'elimina durant l'etapa d'extracció. S'han publicat diversos estudis, tot i que amb un nombre de mostres limitat. La sensibilitat observada varia entre el 38 % i el 60 % [97, 106, 107].

IV. Magicplex Sepsis Real-Time Test (Seegene, Seül, Corea)

En aquest assaig, es necessiten tres reaccions de PCR per tal d'arribar a la identificació a nivell d'espècie del patogen. En primer lloc, es realitza una primera amplificació per PCR convencional. En aquest pas, es detecten fins a 91 microorganismes (85 bacteris i 6 fongs) i a més, s'inclouen tres gens de resistència (gen de resistència a la meticil·lina *mecA*, i

els gens de resistència a vancomicina *vanA* i *vanB*). En un segon pas, es realitza una PCR a temps real que permet detectar els microorganismes presents a nivell de gènere. Finalment, es realitza una tercera PCR a temps real per aconseguir la identificació a nivell d'espècie, la qual inclou un total de 21 bacteris, cinc espècies de *Candida* spp. i *Aspergillus fumigatus*. Per a l'extracció de DNA s'utilitza el protocol desenvolupat per Molzym a partir d'1 mL de sang però utilitzant un extractor automatitzat. El temps fins a l'obtenció dels resultats d'aquest assaig és de 6 hores. Fins on sabem, només s'han publicat dos estudis que utilitzen aquest sistema per al diagnòstic molecular de la sèpsia. Per una banda, L. Carrara *et al.* [108] van analitzar 267 mostres amb una sensibilitat i especificitat de 65 % i 92 % respectivament. Per altra banda, A.J. Loonen *et al.* van analitzar 125 mostres amb una sensibilitat i especificitat de 37 % i 77 % respectivament [99]. Tot i això, sembla que de moment aquest assaig s'ha retirat del mercat a l'espera de millorar el procediment (comunicació personal durant el *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ECCMID), Copenhagen, 2015).

Al nostre Servei, es van fer diverses proves amb la primera versió d'aquest assaig de juny a setembre de 2008, el qual utilitzava dues amplificacions per PCR convencional i la detecció del productes amplificats es feia mitjançant un gel d'electroforesi. Es van analitzar un total de 20 mostres de sang total de pacients amb sospita de sèpsia confirmada per hemocultiu positiu i, d'aquestes, es va detectar el microorganisme aïllat a l'hemocultiu en 2 casos a nivell de gènere. A banda dels pobres resultats obtinguts, el fet de necessitar dues PCR diferents abans de poder obtenir la identificació a nivell d'espècie també va ser determinant per no continuar amb la avaluació d'aquest assaig, ja que aquest fet dificultava la seva implementació al laboratori, degut a la separació d'àrees del laboratori de biologia molecular. A la **Taula 9** es pot observar un resum de les diferents tècniques moleculars a partir de sang total comentades.

Taula 9. Comparació dels diferents assajos comercialitzats per a la detecció de microorganismes a partir de sang total.

| | SeptiFAST (Roche) | SepsiTest (Molzym) | Vyoo (SIRS-Lab) | Magicplex (Seegene) |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| Principi assaig | PCR <i>multiplex</i> en temps real | PCR universal + seqüenciació | PCR <i>multiplex</i> + electroforesis | 3 PCR <i>multiplex</i> (1 convencional i 2 en temps real) |
| Espècies identificades | 25 | > 300 | 34 | 27 |
| Detecció de resistències | Sí (1 gen, assaig separat) | No | Sí (5 gens) | Sí (3 gens) |
| Volum de sang | 1,5 mL | 2 mL | 5 mL | 1 mL |
| Degradació hDNA | No | Sí | Sí | Sí |
| Temps fins al resultat | 4,5 - 6 h | 8 - 12 h | 8 h | 6 h |
| Sensibilitat / Especificitat | S: 68 - 75 % E: 86 - 92 % | S: 37 - 87 % E: 85,5 - 100 % | S: 38 - 60 % | S: 37 - 65 % E: 77 - 92 % |
| Referències | [102, 103] | [96 - 99] | [97, 106, 107] | [99, 108] |

hDNA: DNA humà

7.3.2.2. Avantatges i desavantatges del diagnòstic molecular de la sèpsia a partir de sang total

Com ja s'ha comentat abans, l'administració del tractament antibiòtic correcte és essencial per a la supervivència i bona evolució del pacient. Idealment, aquest s'hauria d'administrar durant la primera hora des de que es reconeixen els símptomes [64]. Per tant, poder identificar el microorganisme causant de la sèpsia en poques hores beneficiaria el maneig dels pacients amb sèpsia [109]. El principal avantatge de treballar directament amb la mostra de sang és poder obtenir un resultat en 6-8 hores, sense haver d'esperar a que el microorganisme creixi per cultiu, ja que el que es detectarà seran els seus àcids nucleics mitjançant amplificació genètica. Aquest mateix fet també permet poder detectar microorganismes no cultivables en medis artificials, microorganismes de

creixement lent o quan el pacient està en tractament antibiòtic en el moment de l'extracció de sang. Malgrat això, existeixen diverses consideracions que cal tenir en compte.

La sang és una matriu molt complexa i que conté, *per se*, molts components que poden inhibir la PCR (com per exemple, hemoglobina, ferro, albúmina i altres proteïnes, etc.) [109]. Per tant, el primer punt crític amb el que ens enfrontem és el pas d'extracció del DNA, ja que de la obtenció d'un DNA pur depèn que l'amplificació d'aquest material genètic funcioni correctament [78]. El sistema d'extracció ideal hauria de ser sensible i reproduïble, rendible, automatitzat i ser capaç d'extreure el DNA de diferents microorganismes com bacteris, llevats o fongs filamentosos i per tant, assegurar una correcta lisi dels diferents tipus de parets cel·lulars.

Un altre factor que pot interferir durant l'amplificació, és la presència de DNA humà, molt més abundant que el bacterià. La majoria d'aquest ve donat pels leucòcits circulants. Generalment, la concentració de leucòcits es troba entre $4 - 12 \times 10^6$ leucòcits/mL [110], tot i que en malalts amb sèpsia aquests valors poden estar alterats, presentant leucocitosi o leucopènia (major o menor concentració de leucòcits respectivament). Una elevada concentració de DNA humà pot interferir en l'amplificació del DNA microbià i, per tant, restar sensibilitat a la seva detecció. Per tal de pal·liar aquest fet, s'han desenvolupat maneres d'eliminar el DNA humà de la mostra de sang, amb l'objectiu d'enriquir d'aquesta forma el DNA microbià i millorar la seva amplificació [112].

Una altra limitació d'utilitzar sang com a mostra inicial és la baixa concentració de microorganismes circulants presents durant la infecció ($1 - 10$ UCF/mL) [113]. En aquest punt, entra en joc el volum de sang a analitzar. La presència de possibles inhibidors i DNA humà fa que, per a les tècniques moleculars, s'utilitzin volums entre 1 i 5 mL. Tenint en compte que l'hemocultiu analitza un mínim de 30 mL de sang i que és capaç de detectar fins a 1 UCF/mL [77], aquesta diferència de volum

analitzat pot donar lloc a falsos negatius si la quantitat de microorganisme és insuficient com per a ser amplificada. Tot i això, però, cal tenir en compte que aquesta determinació s'ha fet en base a microorganismes viables i cultivables. A banda del provinent dels microorganismes vius, a la sang també es pot trobar DNA bacterià provinent de microorganismes fagocitats, morts o DNA translocat de llocs anatòmics infectats [109, 113], per tant, la concentració de DNA en sang pot ser major. En un treball recent, A. Baconi *et al.* [114] van estimar que durant una bacterièmia, a la sang poden arribar a trobar-se concentracions d'entre 10^3 i 10^4 còpies de genoma/mL. Això es converteix en un avantatge ja que, en estar dirigides a la detecció d'àcids nucleics, les tècniques moleculars a partir de sang total permeten identificar microorganismes no cultivables en medis artificials o de creixement lent i també quan el pacient duu alguna dosi prèvia d'antibiòtic. Aquestes situacions no podrien ser diagnosticades mitjançant l'hemocultiu i això podria explicar la detecció de microorganismes per aquestes tècniques quan l'hemocultiu és negatiu [107, 113, 115]. Aquest avantatge, però, també pot convertir-se en una limitació, ja que, degut a l'elevada sensibilitat de les tècniques d'amplificació, es poden detectar contaminants (per DNA de l'ambient, reactius, manipulació de la mostra, etc.) que no són detectats per l'hemocultiu [109]. Aquest fet implica, per una banda, que sol ser necessari personal format en biologia molecular per poder realitzar aquestes tècniques per tal d'evitar contaminacions i, en segon lloc, que els resultats obtinguts per mètodes moleculars sense l'evidència clara d'un cultiu positiu han de ser acuradament revisats pel microbiòleg juntament amb el clínic que tracta el pacient, tal i com es revisen els resultats dels hemocultius positius, on també es poden detectar contaminacions no relacionades amb un episodi infecció (per una incorrecta desinfecció de la pell en inocular l'hemocultiu).

Una limitació important de les tècniques moleculars, és que al no tenir el microorganisme aïllat, no es pot determinar el seu patró de resistència als diferents antibiòtics. Tot i això, existeixen sistemes moleculars que ofereixen la detecció d'algunes resistències, com per exemple la

Introducció

resistència a meticil·lina d'*Staphylococcus aureus*, determinada pel gen *mecA*. En la **Taula 10** es resumeixen els avantatges i inconvenients de la detecció de microorganismes a partir de sang total [77, 78, 109].

Taula 10. Avantatges i inconvenients del diagnòstic molecular a partir de sang total.

| Avantatges | Inconvenients |
|--|---|
| Detecció de microorganismes no cultivables (per antibiòtic previ o de creixement lent) | No pot substituir l'hemocultiu; necessitat d'aïllar el microorganisme per a testar la seva sensibilitat <i>in vitro</i> . |
| Rapidesa (6 - 8 h) | No estandardització del volum de sang a analitzar |
| Pot oferir resultats quantitius | Més risc de detectar contaminacions |
| Detecció d'alguns mecanismes de resistència | Necessitat de personal format en tècniques moleculars |
| Elevada sensibilitat | Calen estudis per determinar el flux de treball amb aquestes tècniques i la seva incorporació a la rutina assistencial |

7.3.2.3. Descripció i metodologia de la tècnica PCR/ESI-MS (Ibis Biosciences-Abbott Molecular, Carlsbad, CA, EEUU)

A. Principis de la tecnologia

Breument, la tècnica PCR/ESI-MS utilitza múltiples parells d'encebadors per a amplificar regions concretes del genoma dels microorganismes. Després de l'amplificació, es duu a terme un anàlisi per ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*). L'espectròmetre de masses mesura acuradament els amplicons de manera que pot deduir la composició de bases de cada un d'ells. Aquesta composició de bases és comparada amb una base de dades derivada de les seqüències de microorganismes coneguts per a determinar la identificació dels microorganismes presents en la mostra. A més, és capaç d'identificar i quantificar tots els bacteris coneguts, els grups de fongs patogènics i les famílies víriques més importants [116]. La tecnologia es basa en el principi de que, tot i l'enorme

diversitat de microorganismes que existeixen, totes les formes de vida de la Terra comparteixen característiques essencials comuns codificades en el genoma. Els bacteris, per exemple, tenen seqüències molt conservades en els gens que codifiquen pels RNA ribosòmics i motius conservats en gens *housekeeping*. Aquestes seqüències són les utilitzades com a motlle per al disseny d'encebadors d'ampli espectre que, durant la PCR (reacció en cadena de la polimerasa), permeten amplificar el material genètic de tots els microorganismes presents en una mostra (**Figura 15**).

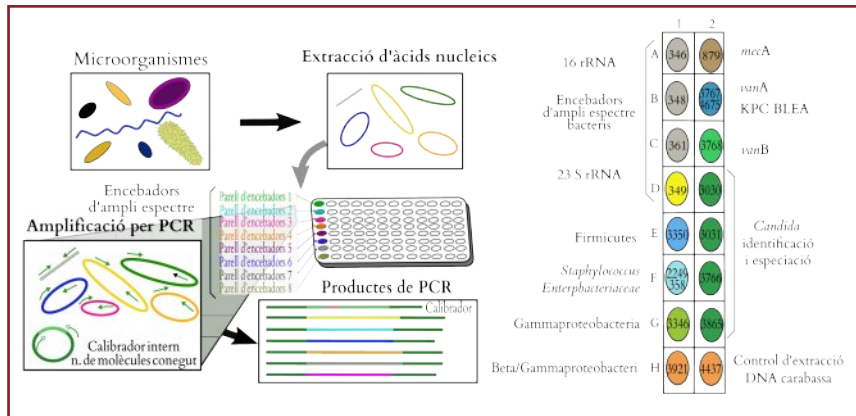


Figura 15. Esquema dels processos inicials de la tècnica PCR/ESI-MS: extracció dels àcids nucleics, dispensació a la placa de PCR i distribució dels encebadors amb els quals s'amplificarà la mostra [117].

B. Disseny dels encebadors i amplificació

L'amplificació universal es basa en la presència de seqüències molt conservades en regions universalment preservades del rRNA i en altres RNA no codificants, a més de motius conservats en gens *housekeeping*. Aquestes seqüències són les utilitzades com a motlle pels encebadors d'ampli espectre que generen amplicons per a tots els microorganismes presents en una mostra. L'elecció d'encebadors es fa basant-se en la seva capacitat de donar la màxima informació possible utilitzant la composició de bases com a mètrica. Per exemple, en el cas dels bacteris, per a escollir els encebadors utilitzats per a la seva amplificació, es van utilitzar

els genomes complets d'uns 225 microorganismes per tal de generar l'alineament del gens essencials que estan àmpliament conservats en tots els organismes o en membres de grups filogenètics específics o relacionats i es va observar que existeixen uns 160 gens *housekeeping* que estan presents en quasi totes les divisions més importants [117]. Degut a què els encebadors universals no s'uniran a la perfecció en tots els bacteris, els primers cicles de la PCR tenen condicions més permissives, de manera que s'assegura la hibridació de nucleòtids parcialment complementaris, però sí que es té molt de compte en el disseny de l'extrem 3', ja que és la part més sensible per a la iniciació de la PCR. El producte de la PCR resultant serà una mescla més o menys complexa segons els microorganismes presents en la mostra. Per exemple, l'assaig utilitzat per al diagnòstic de la sèpsia, permet identificar més de 600 bacteris, *Candida* spp. i a més, permet la detecció de quatre gens de resistència: *mecA* (meticil·lina), *vanA* i *vanB* (vancomicina) i *bla_{kpc}* (carbapenem) [116, 118].

A més del 16S, existeixen altres gens que també són diana per a aquests encebadors d'ampli espectre, augmentant així per una banda la redundància de detecció i classificació mentre que per l'altra, minimitzen la pèrdua de detecció. Molts d'aquests gens estan relacionats amb el processament de la informació genètica, com per exemple, gens implicats en la maquinària transcripcional (factors d'elongació, proteïnes ribosomals, etc.), també gens codificants com per exemple RNA polimerases, gens implicats en la replicació del DNA com per exemple la DNA girasa i la DNA polimerasa (**Figura 16**).

Utilitzar múltiples reaccions de PCR que van dirigides a diferents regions del genoma proporciona una redundància inherent que impedeix de que cap microorganisme es perdi pel camí degut als desaparellaments d'un únic parell de primers. A més, també permet augmentar el límit de detecció; durant l'amplificació, els microorganismes competeixen pels recursos de la PCR (dNTPs, encebadors, polimerasa). Si els microorganismes es troben en una diferència de ràtio de més de 100 a 1 i el seu

genoma s'amplifica pels mateixos encebadors, existeix el risc de que el genoma dels microorganismes menys abundants no sigui amplificat. Per contra, quan dos microorganismes són amplificats de manera individual per dos encebadors d'ampli espectre dirigits a grups de microorganismes diferents, no competeixen perquè seran amplificats en diferents reaccions de PCR.

Amb aquesta tècnica es permet la identificació de qualsevol bacteri del que existeix informació disponible (**Figura 17**). Un altre avantatge és que si els primers es dissenyen per amplificar tots els membres coneguts dins d'un grup diana, probablement també detectaran membres d'aquest grup que encara no han estat caracteritzats.

| # Encebador | Gen diana | Bacteries detectades | Especificitat de l'encebador | |
|--------------------|--|---|---|--------------------------|
| 346, 347, 348, 361 | 16S rDNA | TOTES | Gens ribosomals conservats universalment | |
| 349, 360 | 23S rDNA | | | |
| 354 | RNA polimerasa, subunitat β' (<i>rpoC</i>) | <i>Bacteroidetes, Fusobacteria, Spirochaetes, Proteobacteria, Bacilli</i> | Gens <i>housekeeping</i> conservats a totes les divisions | |
| 358 | Valil-tRNA sintetasa (<i>valS</i>) | <i>Proteobacteria</i> (γ : <i>Enterobacteria</i>) | | |
| 359 | RNA polimerasa, subunitat β (<i>rpoB</i>) | <i>Proteobacteria</i> (γ : <i>Enterobacteria</i>) | | |
| 362 | RNA polimerasa, subunitat β (<i>rpoB</i>) | <i>Proteobacteria</i> (α, β) | | |
| 363 | RNA polimerasa, subunitat β' (<i>rpoC</i>) | <i>Proteobacteria</i> (β, γ) | | |
| 367 | Factor d'elongació EF-Tu (<i>tuB</i>) | <i>Proteobacteria</i> (β) | | |
| 356, 449 | Proteïna ribosomal L2 (<i>rpL2</i>) | <i>Clostridia, Fusobacteria, Bacilli, Proteobacteria</i> (ϵ) | | |
| 352 | Factor iniciador de síntesi de proteïnes (<i>infB</i>) | <i>Bacilli</i> | | |
| 355 | Proteïna d'esporejació (<i>sspE</i>) | Clade de <i>Bacillus cereus</i> | | Gens específics de clade |

Figura 16. Cobertura dels encebadors en bacteris [117].

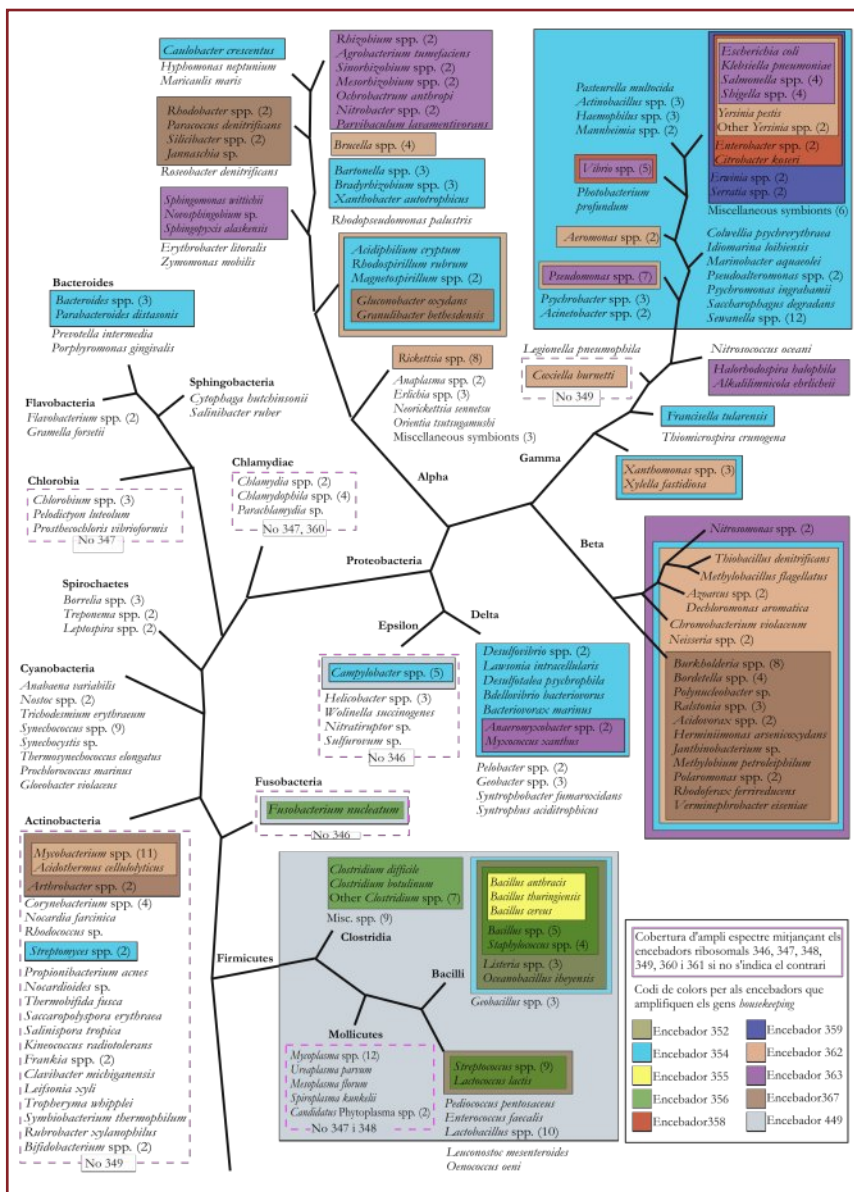


Figura 17. Arbre de classificació de bacteris. El encebadors utilitzats cobreixen - 61 - tot l'arbre filogenètic [116].

C. Anàlisi per EM i obtenció de la identificació

Després de la PCR, es fa un pas de purificació per eliminar les restes de sal i altres components que puguin interferir en l'espectrometria de masses (**Figura 18**). El producte purificat es dissol en un solvent orgànic i s'injecta a través d'un capil·lar, en el qual s'aplica una diferència de potencial. Al ser injectada a través d'aquest capil·lar, la mostra s'ionitza i genera un aerosol de petites gotes carregades que entraran a l'analitzador de masses, on es separaran segons el seu ràtio m/z i seran detectades pel detector, el qual generarà l'espectre de masses.

En el cas de l'ESI-TOF, a l'espectre es representen tots els ions generats a partir dels analits en les seves diferents intensitats, de forma que s'observen diferents pics. En aquest cas, el pes molecular dels amplicons presents s'obté calculant la mitjana de totes les masses moleculars relatives de cada ió obtingut. Com que aquest procés no trenca les molècules de DNA, s'observen dos pics, corresponents a la massa molecular de les dues cadenes de DNA.

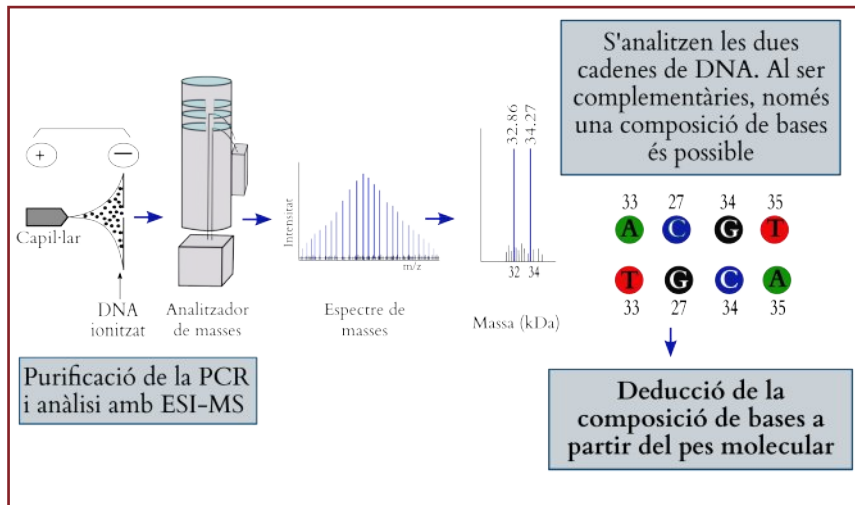


Figura 18. Esquema del procediment d'anàlisi per ESI-MS.

Introducció

Mitjançant aquesta tècnica, es determina la massa amb una exactitud tan acurada que calcula la composició exacta de bases de cada amplicó present en la mostra, és a dir, quantes A, C, G i T estan presents en aquell fragment. L'anàlisi de les dues cadenes complementàries permet determinar la composició exacta del producte amplificat, el qual es correspon amb un únic microorganisme. La composició de bases és una eina molt útil per a la identificació de microorganismes patògens. Aquesta composició és única per a cada gen i específica de cada organisme.

L'algorisme utilitzat per a la detecció busca en una base de dades que relaciona cada microorganisme amb aquesta composició específica. Si representem aquesta composició de bases en un espai pseudo-tridimensional, s'observa com els diferents microorganismes es diferencien clarament (**Figura 19**). Amb una correcta elecció dels encebadors, la composició de bases de múltiples regions del genoma microbià conté informació més que suficient per a identificar espècies concretes.

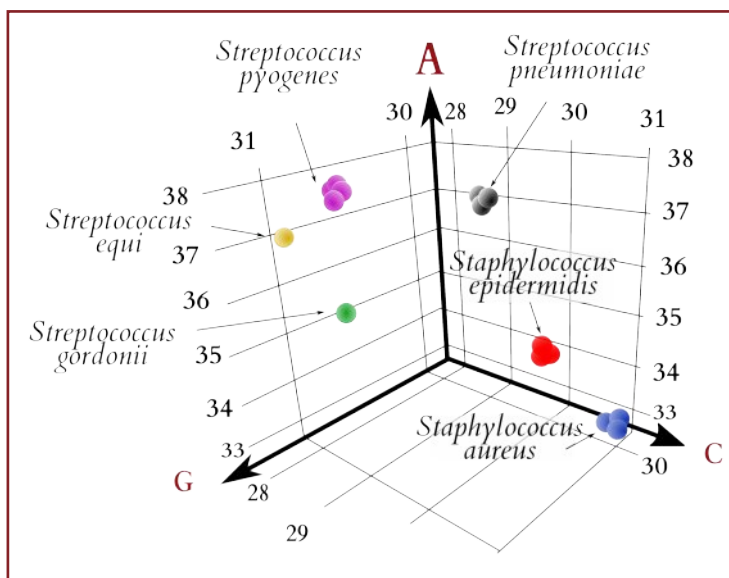


Figura 19. Núvol de composició de bases generat en un espai pseudotridimensional a partir de l'amplificació del gen *rplB*, que permet la identificació de diferents espècies [119].

La informació de l'espectrometria de masses provinent de diferents reaccions s'utilitza per triangular les identitats dels organismes presents. Utilitzant l'estratègia de la triangulació, cap primer és dissenyat de manera específica per a un sol microorganisme, però en lloc d'això els encebadors es dissenyen per a cobrir tot l'arbre de la vida bacteriana utilitzant una cobertura redundant. Utilitzant la informació integrada dels múltiples encebadors d'ampli espectre, es poden identificar virtualment tots els microorganismes presents a la mostra [117, 119].

D. Quantificació

Un punt molt important d'aquest sistema és que té la capacitat de mesurar els nivells de material genòmic present a la mostra, mitjançant un estàndard intern o calibrador que consisteix en una seqüència dissenyada específicament per a cada parell d'encebadors que s'utilitzen i insertada en un plasmidi, i serà semblant a les seqüències que potencialment s'amplificaran en aquella reacció. El calibrador té una deleció interna de 2 a 5 parells de bases que farà que en l'espectròmetre de masses es pugui identificar molt clarament i sense dubtes. Aquest estàndard intern amplificarà amb una eficiència similar a les dianes de la mostra. Cada reacció conté una quantitat coneguda del calibrador, sense que aquest emmascari el senyal dels microorganismes menys representats.

L'abundància relativa dels productes es mesura per l'altura de pics que s'obté en l'anàlisi per l'espectròmetre de masses, i, com que sabem la concentració inicial de l'estàndard, podrem saber en quina quantitat es trobaven els diferents microorganismes identificats en la mostra inicial gràcies a una extrapolació de valors. A més, l'estàndard també serveix com a control intern, ja que sempre ha d'amplificar. Si no es detecta, indica la presència d'inhibidors de la PCR o que hi ha hagut algun problema durant el procés [117, 119].

La única situació on no es detectaria l'estàndard seria en mostres on hi ha un elevat nombre de microorganismes, donat que competiran per part dels recursos de la PCR. En aquest cas, una identificació positiva

Introducció

ens assegura que la reacció ha funcionat correctament, però cal tenir en compte que la quantificació tan sols es pot donar quan la concentració de la mostra és de 100 – 1.000 vegades més elevada que l'estàndard.