

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 921 224**

21 Número de solicitud: 202290051

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

18.12.2020

30 Prioridad:

20.12.2019 EP 19383174.0

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.08.2022

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

12.05.2023

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

29.12.2024

Fecha de concesión:

04.02.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.02.2025

73 Titular/es:

GERENCIA REGIONAL DE SALUD DE CASTILLA Y LEÓN (62.50%)

Paseo de Zorrilla, 1

47007 Valladolid (Valladolid) ES y

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (37.50%)

72 Inventor/es:

TAMAYO GÓMEZ, Eduardo;

GARCÍA MORÁN, Emilio;

HEREDIA RODRÍGUEZ, María;

GÓMEZ SÁNCHEZ, Esther y

MARTÍNEZ DE PAZ, Pedro José

74 Agente/Representante:

MARTÍNEZ, Miguel Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **MÉTODO *IN VITRO* PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE PACIENTES CON SHOCK SÉPTICO Y NO SÉPTICO**

57 Resumen:

Método *in vitro* para el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y no séptico. La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y no séptico o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que padece shock séptico. Además, la presente invención también incluye kits adaptados para el diagnóstico diferencial entre shock séptico y no séptico, o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que padece shock séptico.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 921 224 B2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO *IN VITRO* PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE PACIENTES CON SHOCK SÉPTICO Y NO SÉPTICO

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al ámbito médico. En particular, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y no séptico o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que padece shock séptico. Además, la presente invención también incluye kits adaptados para el diagnóstico diferencial entre shock séptico y no séptico, o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que
10 padece shock séptico.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La septicemia se define como una disfunción orgánica provocada por una respuesta desregulada del huésped a la infección. En la actualidad, esta afección es uno de los principales problemas sanitarios en la unidad de cuidados intensivos, alcanzando hasta 300-480 casos por cada 100.000
15 personas de incidencia y liderando la causa de mortalidad (20-30%) en la UCI de los países desarrollados. En comparación con otras enfermedades, la incidencia de la septicemia sigue siendo mayor a la del accidente cerebrovascular (76-119 por 100.000), el infarto agudo de miocardio (8%) y otras patologías con importante impacto social, tales como el cáncer de mama (25,9-94,2 por 100.000) o el sida (24 por 100.000). Además, la septicemia es la primera causa de
20 mortalidad en las UCI no coronarias, alcanzando el 30-50% de mortalidad en la septicemia grave y el 50-60% en el shock séptico.

Al igual que otras enfermedades tales como el ictus, la cardiopatía isquémica o los traumatismos graves, la septicemia es una enfermedad que depende del tiempo, por lo que es importante obtener un diagnóstico rápido y preciso de esta afección. El inicio de un tratamiento
25 antimicrobiano eficaz dentro de la primera hora tras el inicio de la hipotensión relacionada con el shock séptico se asoció con una supervivencia del 79,9% y, además, por cada hora adicional hasta el inicio efectivo del antibiótico en las primeras 6 horas después del inicio de la hipotensión, la supervivencia disminuyó un 7,6%. Recientemente, se ha informado de que la muerte aumentó en un 20% en los pacientes sépticos por cada aumento de una hora en el tiempo
30 de puerta a antibiótico. Sin embargo, no existe un método de referencia rápido y preciso para el diagnóstico de septicemia que permita diferenciar esta afección en pacientes con shock séptico y

no séptico después de una cirugía, ya que los pacientes con ambas afecciones muestran signos y síntomas similares. Por ello, el médico usa indistintamente antibióticos en ambas afecciones de manera preventiva para evitar el mortal desenlace de los pacientes con shock séptico. En este sentido, obtener un diagnóstico rápido y preciso del shock séptico permite un tratamiento inmediato y específico para esta afección y evita el uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro para minimizar el desarrollo de resistencias antimicrobianas, infecciones secundarias y el aumento de los costes sanitarios. Además, el aumento de bacterias multirresistentes supone un gran problema sanitario mundial.

En la actualidad, la procalcitonina (PCT) y la proteína C-reactiva (CRP) son los biomarcadores más usados para el diagnóstico y la evolución del shock séptico porque son más sensibles y específicos que otros biomarcadores, tales como el lactato o los leucocitos. Sin embargo, los niveles de procalcitonina pueden estar elevados por estados patológicos comórbidos, lo que dificulta el diagnóstico de shock séptico. Además, la PCT es un biomarcador fiable en pacientes médicos con shock séptico, pero no en pacientes quirúrgicos con shock séptico. En el caso de la CRP, este biomarcador se considera sensible pero no específico para esta afección y, además, sus niveles también pueden aumentar en respuesta a otras afecciones, tales como traumatismos, isquemia, quemaduras y otras afecciones inflamatorias. Además, otro biomarcador clásico usado para el diagnóstico de la septicemia son los leucocitos, sin embargo se ha descrito finalmente que su recuento no era un biomarcador válido para predecir la infección postoperatoria. Por tanto, en los pacientes quirúrgicos con septicemia, los niveles de PCT, CRP y leucocitos son el resultado de un efecto sinérgico al mismo tiempo de la respuesta inflamatoria producida por el daño quirúrgico y las bacterias. Por este motivo, estos biomarcadores no son los mejores para diferenciar entre pacientes con shock séptico y no séptico tras una intervención quirúrgica, por lo que identificar correctamente a los pacientes puede ser un reto para los médicos.

Actualmente, uno de los métodos usados para el diseño de biomarcadores clínicos es el análisis de los niveles de expresión génica, que permiten identificar aquellos genes que se activan durante un estado patológico específico. Sin embargo, esta aproximación metodológica en los estudios de septicemia es escasa, aunque en los últimos años han aumentado las referencias sobre la búsqueda de biomarcadores en la septicemia. No obstante, estos informes sólo analizan los niveles transcriptómicos en la septicemia médica.

Así pues, en resumen, hoy en día existe una necesidad médica insatisfecha de encontrar biomarcadores potentes que puedan usarse para realizar un diagnóstico diferencial fiable entre

pacientes con shock séptico y no séptico. Por tanto, la presente invención se centra en resolver los problemas mencionados y se proporciona en el presente documento un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y no séptico o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que padece shock séptico. A partir de esta invención, puede conseguirse una identificación rápida y precisa de los pacientes con shock séptico, y su diferenciación de los pacientes que padecen shock no séptico. Esto ayudaría a los médicos a proporcionar un tratamiento antibiótico específico a los pacientes que padecen shock séptico, evitando el uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro, principalmente en aquellos pacientes que padecen shock no séptico.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

En la actualidad, no existe un método de referencia capaz de diferenciar a los pacientes posquirúrgicos que padecen shock séptico de los que padecen shock no séptico (es decir, un shock de origen no infeccioso). De hecho, ambos tipos de pacientes muestran signos y síntomas similares. Por consiguiente, los médicos se ven obligados a usar indiscriminadamente antibióticos cuando se enfrentan a este tipo de pacientes, sin saber exactamente si el shock tiene un origen infeccioso o no infeccioso. El uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro da lugar al desarrollo de resistencia a los antibióticos (que hoy en día es un problema sanitario mundial), a infecciones secundarias y a un aumento de los costes sanitarios.

20

Para resolver dichos problemas, los inventores de la presente invención han desarrollado un método para diferenciar a los pacientes que padecen shock séptico de los que padecen shock no séptico (es decir, un shock de origen no infeccioso).

A este respecto, se remite a las figuras y ejemplos de la presente solicitud de patente en los que se muestra una comparación entre los niveles de expresión de los genes *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* en sujetos sanos de control, pacientes con shock séptico y pacientes con shock no séptico con sus valores estadísticos. Cada uno de los genes *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* ofrece un nivel de expresión diferente en los pacientes con shock séptico en comparación con los pacientes con shock no séptico y los sujetos sanos de control. Así pues, cualquiera de los genes *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2*, o cualquier combinación

30

de los mismos, puede usarse para el diagnóstico de shock séptico o para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.

En particular, existe una desviación (un aumento o una disminución) del nivel de expresión de los genes mencionados en los pacientes con shock séptico en comparación con los pacientes

5 sanos o los pacientes con shock no séptico:

- El nivel de expresión de *IGHG1* es menor en pacientes que padecen shock séptico en comparación con sujetos sanos de control. Por consiguiente, *IGHG1* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico de shock séptico. Además, el nivel de expresión de *IGHG1* es más alto en pacientes que padecen shock séptico, en comparación con el nivel
10 medido en pacientes con shock no séptico. Por consiguiente, *IGHG1* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.
- El nivel de expresión de *IL1R2* es mayor en pacientes que padecen shock séptico en comparación con sujetos sanos de control. Por consiguiente, *IL1R2* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico de shock séptico. Además, el nivel de expresión de
15 *IL1R2* es mayor en pacientes que padecen shock séptico, en comparación con el nivel medido en pacientes con shock no séptico. Por consiguiente, *IL1R2* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.
- El nivel de expresión de *LCN2* es mayor en pacientes que padecen shock séptico en comparación con sujetos sanos de control. Por consiguiente, *LCN2* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico de shock séptico. Además, el nivel de expresión de
20 *LCN2* es mayor en pacientes que padecen shock séptico, en comparación con el nivel medido en pacientes con shock no séptico. Por consiguiente, *LCN2* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.
- El nivel de expresión de *LTF* es mayor en pacientes que padecen shock séptico en comparación con sujetos sanos de control. Por consiguiente, *LTF* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico de shock séptico. Además, el nivel de expresión de *LTF*
25 es mayor en pacientes que padecen shock séptico, en comparación con el nivel medido en pacientes con shock no séptico. Por consiguiente, *LTF* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.
- El nivel de expresión de *MMP8* es mayor en pacientes que padecen shock séptico en comparación con sujetos sanos de control. Por consiguiente, *MMP8* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico de shock séptico. Además, el nivel de expresión de
30 *MMP8* es mayor en pacientes que padecen shock séptico, en comparación con el nivel

medido en pacientes con shock no séptico. Por consiguiente, *MMP8* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.

- El nivel de expresión de *OLFM4* es mayor en pacientes que padecen shock séptico en comparación con sujetos sanos de control. Por consiguiente, *OLFM4* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico de shock séptico. Además, el nivel de expresión de *OLFM4* es mayor en pacientes que padecen shock séptico, en comparación con el nivel medido en pacientes con shock no séptico. Por consiguiente, *OLFM4* puede usarse como biomarcador para el diagnóstico diferencial de shock séptico frente a shock no séptico.

En una realización preferida, según los resultados proporcionados por los inventores, el uso combinado de seis genes específicos (*IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*) da lugar a un modelo de regresión multivariante con un AUC de 0,841, mostrando así una muy buena precisión en la diferenciación de los pacientes que padecen shock séptico de los que padecen shock no séptico. De hecho, cuando los seis genes citados anteriormente se combinan con biomarcadores no genéticos (NGB) como: sexo, edad, cirugía de urgencia, neutrófilos y bilirrubina, el AUC es aún mayor (0,892), mostrando así una mayor precisión en la diferenciación de los pacientes que padecen shock séptico de los que padecen shock no séptico.

El rendimiento específico de cada gen, o combinaciones de los mismos, en la diferenciación de los pacientes que padecen shock séptico de los que padecen shock no séptico se muestra en la **tabla 1** a continuación:

20

Tabla 1

Gen individual	AUC
<i>IGHG1</i>	0,797
<i>LTF</i>	0,719
<i>OLFM4</i>	0,698
<i>LCN2</i>	0,677
<i>MMP8</i>	0,637
<i>IL1R2</i>	0,632
Gen individual + NGB¹	
<i>IGHG1</i>	0,861
<i>LTF</i>	0,787

<i>LCN2</i>	0,776
<i>MMP8</i>	0,770
<i>OLFM4</i>	0,758
<i>IL1R2</i>	0,745
Combinación de dos genes	
<i>IGHG1+MMP8</i>	0,840
<i>IGHG1+LCN2</i>	0,834
<i>IGHG1+LTF</i>	0,833
<i>IGHG1+OLFM4</i>	0,826
<i>IGHG1+IL1R2</i>	0,808
<i>LTF+LCN2</i>	0,710
<i>LTF+MMP8</i>	0,707
<i>LCN2+MMP8</i>	0,679
Combinación de tres genes	
<i>IGHG1+MMP8+LTF</i>	0,841
<i>IGHG1+MMP8+LCN2</i>	0,841
<i>IGHG1+LTF+LCN2</i>	0,834
Combinación de seis genes	
<i>IGHG1+LTF+OLFM4+LCN2+MMP8+IL1R2</i>	0,841
Combinación de seis genes+NGB1	
<i>IGHG1+LTF+OLFM4+LCN2+MMP8+IL1R2</i>	0,892

NGB¹ (biomarcadores no genéticos): sexo+edad+cirugía de urgencia+neutrófilos+bilirrubina.

Por tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y no séptico que comprende: a) medir el nivel de expresión de al menos el gen *IGHG1* en una muestra biológica obtenida del paciente, y b) en el que la identificación de una desviación del nivel de expresión, preferiblemente la identificación de un nivel de expresión aumentado de al menos el gen *IGHG1* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en los pacientes de control con shock no séptico usado como referencia, es una indicación de que el paciente padece shock séptico.

La segunda realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que padece shock séptico que comprende a) medir el nivel de expresión de al menos el gen *IGHG1* en una muestra biológica obtenida del paciente, y b) en el que la identificación de una desviación del nivel de expresión, preferiblemente la
5 identificación de un nivel de expresión más alto de al menos el gen *IGHG1* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en pacientes con shock no séptico usado como referencia, es indicativa de que el paciente padece shock séptico y se recomienda un tratamiento antiséptico.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar pacientes que padecen shock séptico para recibir un tratamiento antiséptico, que comprende: a)
10 medir el nivel de expresión de al menos el gen *IGHG1* en una muestra biológica obtenida del paciente, y b) en el que la identificación de un nivel de expresión más alto de al menos el gen *IGHG1* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en pacientes con shock no séptico, el paciente se elige para recibir un tratamiento antiséptico.

El tratamiento de la septicemia se basa en la terapia fisiopatológica y el tratamiento de soporte
15 vital. La terapia fisiopatológica busca diferentes estrategias que puedan modular la batería de mediadores activados. Además, sustancias como los anticuerpos contra la endotoxina, los anticuerpos anti-TNF alfa, el receptor soluble del TNF-alfa o la proteína C activada, pueden usarse para conferir beneficios en los pacientes sépticos. En la actualidad, el tratamiento realmente eficaz se basa en el tratamiento de soporte vital: diagnóstico temprano de la
20 septicemia, control de la infección temprana, tratamiento antibiótico adecuado, reanimación hemodinámica por objetivos, estrategias de ventilación pulmonar protectora y, por último, asistencia al paciente con un aporte nutricional adecuado.

En una realización preferida, el método citado anteriormente, comprende además: medir el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que comprende: a) *LTF*, *OLFM4*,
25 *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* en una muestra biológica obtenida del paciente, y b) en el que la identificación de una desviación (preferiblemente un aumento) del nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que comprende: *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en pacientes de control con choque no séptico, es indicativa de que el paciente padece shock séptico.

30 En una realización preferida, el método citado anteriormente comprende: a) medir el nivel de expresión de al menos todos los genes siguientes: *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2* en una muestra biológica obtenida del paciente, b) procesar los valores del nivel de expresión

para obtener un valor de puntuación de riesgo, y c) en el que si se identifica una desviación o variación del valor de puntuación de riesgo obtenido en la etapa b), en comparación con un valor de puntuación de riesgo de referencia medido en pacientes de control con choque no séptico, es indicativa de que el paciente padece shock séptico.

- 5 En una realización preferida, la muestra biológica es sangre, plasma o suero.

La cuarta realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de al menos el gen *IGHG1* para el diagnóstico diferencial entre shock séptico y no séptico, o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente con shock séptico. En una realización preferida, la presente invención también se refiere al uso de al menos un gen seleccionado del grupo que comprende: *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2*, preferiblemente el uso de los seis genes en combinación: *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*.

10

La quinta realización de la presente invención se refiere a un kit adaptado para el diagnóstico diferencial entre shock séptico y no séptico, o para decidir o recomendar un tratamiento a un paciente que padece shock séptico que comprende:

- 15 a. herramientas o reactivos para obtener muestras de sangre del paciente, y
 b. herramientas o reactivos para medir el nivel de expresión de al menos el gen *IGHG1*.

En una realización preferida, el kit comprende además herramientas o reactivos para medir el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que comprende: *LTF*, *OLFM4*,
 20 *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2*.

En una realización preferida, el kit comprende además herramientas o reactivos para medir el nivel de expresión de al menos todos los genes siguientes: *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*.

La última realización de la presente invención se refiere a una terapia antiséptica para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen shock séptico que han sido diagnosticados previamente según cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Alternativamente, esta realización se refiere a un método para el tratamiento de pacientes con shock séptico previamente diagnosticados con cualquiera de los métodos citados anteriormente. Una vez que se determina que el paciente padece shock séptico, el tratamiento de la septicemia se basa en una terapia
 25 fisiopatológica y en un tratamiento de soporte vital. La terapia fisiopatológica busca diferentes
 30

estrategias que puedan modular la batería de mediadores activados. Sin embargo, ninguna sustancia activa, tales como los anticuerpos contra la endotoxina, los anticuerpos anti-TNF alfa, el receptor soluble del TNF-alfa o la proteína C activada, aporta beneficios inequívocos en los pacientes sépticos. En la actualidad, el tratamiento realmente eficaz se basa en el tratamiento de
5 soporte vital: diagnóstico temprano de la septicemia, control de la infección temprana, tratamiento antibiótico adecuado, reanimación hemodinámica por objetivos, estrategias de ventilación pulmonar protectora y, por último, asistencia al paciente con un aporte nutricional adecuado.

Para el propósito de la presente invención, a continuación se ofrecen las siguientes definiciones:

- 10 • La expresión “paciente de control” o “sujeto de control” se refiere a un “valor de referencia” del nivel de expresión de los genes. Si se identifica una desviación (aumento o disminución) de los niveles de expresión de los genes, en comparación con el nivel de expresión en dicho “paciente de control” o “sujeto de control” que se usa como “valor de referencia”, esto es una indicación de que el paciente padece shock séptico.
- 15 • Un “valor de referencia” puede ser un valor umbral o un valor de corte. Normalmente, un “valor umbral” o “valor de corte” puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como reconocería un experto en la técnica. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y la especificidad
20 óptimas según la función de la prueba y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de los falsos positivos y los falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar los niveles (o puntuaciones) de biomarcadores obtenidos según el método de la invención con un valor umbral definido. Normalmente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por tanto, el valor umbral) pueden determinarse mediante una
25 curva ROC (curva de rendimiento diagnóstico) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles de los biomarcadores en un grupo de referencia, puede usarse un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de los biomarcadores en las muestras biológicas que van a analizarse, y así obtener un criterio de clasificación que tenga importancia para la
30 clasificación de las muestras. El nombre completo de la curva ROC es curva de rendimiento diagnóstico, que también se conoce como curva de eficacia diagnóstica. Se usa principalmente para las pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva ROC es un indicador completo que refleja las variables continuas de la tasa de verdaderos

positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de la imagen. Una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados normales y anómalos de la prueba diagnóstica) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. A continuación, se usa la sensibilidad como coordenada vertical y la especificidad como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores altos tanto de sensibilidad como de especificidad. El valor AUC de la curva ROC se sitúa entre 1,0 y 0,5. Cuando el $AUC > 0,5$, el resultado del diagnóstico es cada vez mejor a medida que el AUC se acerca a 1. Cuando el AUC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando el AUC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es buena. Cuando el AUC es mayor de 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Para el trazado de la curva ROC pueden usarse programas o sistemas existentes en la técnica, tales como por ejemplo MedCalc 9.2.0.1 software estadístico médico, SPSS 9.0.

- El término “shock” se refiere a una afección potencialmente mortal y que se produce cuando el cuerpo no recibe suficiente flujo sanguíneo. La falta de flujo sanguíneo significa que las células y los órganos no reciben suficiente oxígeno y nutrientes para funcionar correctamente. Muchos órganos pueden resultar dañados. El shock requiere tratamiento inmediato y puede empeorar muy rápidamente. Los principales tipos de shock son shock cardiogénico (debido a problemas del corazón), shock hipovolémico (provocado por un volumen de sangre demasiado bajo), shock anafiláctico (provocado por una reacción alérgica), shock séptico (debido a infecciones) y shock neurogénico (provocado por daños en el sistema nervioso).
- El término “shock no séptico” se refiere a una afección potencialmente mortal y que se produce cuando el cuerpo no recibe suficiente flujo sanguíneo, pero no es provocado por una infección. La falta de flujo sanguíneo significa que las células y los órganos no reciben suficiente oxígeno y nutrientes para funcionar correctamente. Muchos órganos pueden resultar dañados. El shock requiere un tratamiento inmediato y puede empeorar muy rápidamente. Los principales tipos de shock no séptico son shock cardiogénico (debido a problemas del corazón), shock hipovolémico (provocado por un volumen de

sangre demasiado bajo), shock anafiláctico (provocado por una reacción alérgica) y shock neurogénico (provocado por daños en el sistema nervioso).

- La expresión “puntuación de riesgo” se refiere a un valor de riesgo obtenido después de procesar uno o más niveles de expresión en un único valor (o valor de riesgo), que representa la probabilidad de enfermedad para el individuo. Este valor de riesgo se comparará con un valor de referencia para evaluar si el paciente puede padecer shock séptico.
- Por “que comprende” se entiende que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar o no presentes.
- Por “que consiste en” se entiende “que incluye, y se limita a”, lo que sigue a la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. (A) Diagrama de dispersión de los 2 primeros componentes principales (PC1 y PC2) obtenidos a partir del análisis de componentes principales realizado sobre los 335 transcritos de expresión diferencial (DE). El gráfico de PCA revela tres grupos distintos de pacientes. (B) Diagrama de volcán. (C) Mapa de calor de los genes de interés (*LCN2*, *IGHG3*, *IGHG2*, *LTF*, *OLFM4*, *IGHA1*, *IGHA2*, *MMP8* e *IL1R2*). La fila representa el valor de expresión del gen y la columna representa la muestra. Las convenciones de color son las siguientes: el verde representa transcripciones sobreexpresadas y el rojo indica transcripciones infraexpresadas; los pacientes con shock séptico están representados en azul claro y los pacientes con shock no séptico en azul oscuro. (D) Funciones biológicas enriquecidas.

Figura 2. Niveles relativos de ARNm de *IGHG1* (A), *IL1R2* (B), *LCN2* (C), *LTF* (D), *MMP8* (E) y *OLFM4* (F) en pacientes con shock no séptico y con shock séptico medidos mediante qRT-PCR con cebadores y genes de referencia tal como se indica en Materiales y métodos. La línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes indican los valores más altos y más bajos.

Figura 3. (A) Análisis del AUC de ROC de la expresión génica. (B) Comparación del AUC de ROC entre el modelo de regresión de la expresión génica, PCT, RCP y neutrófilos.

Figura 4. (A) Análisis del AUC de ROC del modelo de regresión de expresión génica que incluye el sexo, la edad, la cirugía de urgencia, los neutrófilos y la bilirrubina como variables de ajuste. **(B)** Análisis del AUC de ROC del modelo de regresión multivariante que incluye toda la expresión génica y el sexo, la edad, la cirugía de urgencia, los neutrófilos y la bilirrubina como variables de ajuste.

Figura 5. Muestra cómo el nuevo modelo de regresión multivariante mejoró el valor del AUC hasta 0,922 (0,874-0,970).

Figura 6. Muestra el modelo de regresión para cada gen incluyendo nuevas variables de ajuste.

Figura 7. Comparación entre los niveles de expresión de los genes *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* en sujetos sanos de control, pacientes con shock séptico y pacientes con shock no séptico se identifican con sus valores estadísticos. * indican el valor de *p* entre el control y el shock no séptico; # indican el valor de *p* entre el control y el shock séptico. Diferencias entre 96 h y 24 h, superíndices ap < 0,05; bp < 0,01; cp < 0,001.

Descripción detallada de la invención

15 Ejemplo 1. Materiales y métodos.

Ejemplo 1.1. Selección de pacientes y datos clínicos.

El presente trabajo se realizó en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España) con un estudio de cohorte de pacientes adultos tras una cirugía entre enero de 2014 y diciembre de 2018. Para la cohorte de descubrimiento, se reclutaron un total de 133 pacientes sometidos a cirugía y diagnosticados con shock séptico (n=80) y shock no séptico (n=33) para realizar el análisis de micromatrices. En el caso de la cohorte de validación, se reclutó a un conjunto de 167 pacientes también sometidos a cirugía y diagnosticados con shock séptico (n=107) y shock no séptico (n=55) para realizar la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. Para la normalización de los datos de expresión génica se reclutaron 15 voluntarios sanos de edades similares a las de los pacientes. El diagnóstico de shock séptico se estableció según la definición del Tercer Consenso Internacional de Definiciones para la Septicemia y el Shock Séptico (definición de septicemia-3) y el criterio de diagnóstico de shock no séptico fue igual al del shock séptico sin infección. Todas las investigaciones con participantes humanos fueron aprobadas por el Comité Científico de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y el paciente o su representante legal dieron su

consentimiento informado por escrito antes del reclutamiento. Este estudio siguió el código ético de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki).

Para recoger los datos clínicos, se empleó una encuesta que incluye los antecedentes médicos, la exploración física y las investigaciones hematológicas, bioquímicas, radiológicas y microbiológicas. Las características clínicas y su comparación entre los pacientes del SS y del SNS se presentan en la **tabla 2**.

Tabla 2. Características de los pacientes postquirúrgicos

	Cohorte de descubrimiento			Cohorte de validación		
	SS (n=80)	SNS (n=33)	p	SS (n=107)	SNS (n=55)	p
Características						
Edad	70,68	65,52	0,056	69,15	66,09	0,155
Hombres [% (n)]	58,75 (47)	48,48 (16)	0,318	57,94 (62)	67,27 (37)	0,249
Comorbilidades, % (n)						
Presión arterial alta	66,25 (53)	60,61 (20)	0,568	62,62 (67)	58,18 (32)	0,583
Enfermedad cardiovascular crónica	51,25 (41)	57,57 (19)	0,540	33,64 (36)	23,63 (13)	0,189
Enfermedad respiratoria crónica	15,00 (12)	9,09 (3)	0,400	18,69 (20)	16,36 (9)	0,714
Insuficiencia renal crónica	11,25 (9)	6,06 (2)	0,397	6,54 (7)	9,09 (5)	0,557
Insuficiencia hepática crónica	1,25 (1)	0,00 (0)	0,519	1,87 (2)	1,81 (1)	0,982
Diabetes mellitus	23,75 (19)	15,15 (5)	0,310	23,36 (25)	12,73 (7)	0,107
Cáncer	28,75 (23)	12,12 (4)	0,059	26,17 (28)	14,55 (8)	0,092
Inmunosupresión	7,50 (6)	0,00 (0)	0,271	5,61 (6)	3,64 (2)	0,583
Evolución temporal y desenlace						
Duración de la estancia hospitalaria	33,60	23,36	0,025	31,05	21,55	0,020
Duración de la estancia en la UCI	12,24	7,30	0,350	10,34	7,89	0,149
Mortalidad [% (7 días)]	13,58 (11)	15,15 (5)	0,706	11,21 (12)	20,00 (11)	0,129
Mortalidad [% (28 días)]	30,86 (25)	30,30 (10)	0,869	28,04 (30)	32,73 (18)	0,536
Mortalidad [% (90 días)]	45,68 (37)	30,30 (10)	0,184	36,45 (39)	34,55 (19)	0,811
Fuente de infección, % (n)						
Vías respiratorias	40,00 (32)	18,19 (6)	0,026	29,91 (32)	14,55 (8)	0,032
Abdomen	31,25 (25)	0,00 (0)	0,000	29,91 (32)	0,00 (0)	0,000
Vías urinarias	21,25 (17)	6,06 (2)	0,050	17,76 (19)	7,27 (4)	0,070
Sitio quirúrgico	35,00 (28)	18,18 (6)	0,076	35,51 (38)	10,91 (6)	0,001
Bacteriemia	46,25 (37)	3,03 (1)	0,000	37,38 (40)	7,27 (4)	0,000
Microbiología, % (n)						
Gram +	65,00 (52)	21,21 (7)	0,000	62,62 (67)	20,00 (11)	0,000
Gram -	76,25 (61)	27,27 (9)	0,000	64,49 (69)	18,18 (10)	0,000
Hongos	28,75 (23)	12,12 (4)	0,059	28,04 (30)	10,91 (6)	0,013
Mediciones en el diagnóstico, [mediana (IQR)]						
Puntuación de SOFA	9,00 (4)	9,00 (3)	0,957	8,00 (3)	9,00 (3)	0,188
Puntuación de APACHE	14,00 (6)	10,00 (6)	0,002	14,00 (7)	12,50 (5)	0,042
Bilirrubina total (mg/dl)	0,80 (1,43)	0,82 (1,80)	0,987	0,80 (1,21)	1,10 (1,37)	0,101
Glucosa (mg/dl)	157 (70)	166 (87)	0,113	160 (75)	178 (97)	0,025
Recuento de plaquetas (células/mm ³)	148500 (173250)	100000 (75000)	0,000	180000 (188000)	144000 (86000)	0,002
INR	1,34 (0,24)	1,32 (0,35)	0,834	1,35 (0,32)	1,32 (0,32)	0,791
ScvO ₂ (%)	70,90 (12,30)	68,70 (21,90)	0,031	72,30 (13,00)	61,90 (17,65)	0,000
CRP (mg/L)	220,95 (198,58)	90,60 (158,85)	0,000	231,30 (183,00)	106,00 (184,00)	0,000
Procalcitonina (ng/ml)	5,99 (20,61)	1,42 (3,99)	0,000	4,03 (21,40)	2,49 (4,18)	0,000
Lactato (mg/dl)	25,50 (18,00)	32,00 (36,00)	0,156	23,00 (19,00)	33,00 (39,00)	0,018

Glóbulos blancos (células/mm ³)	16575 (11997)	13620 (4580)	0,070	16330 (12507)	13880 (7500)	0,100
Neutrófilos (células/mm ³)	15540 (11345)	11288 (5185)	0,026	14468 (12851)	11184 (6976)	0,010

Ejemplo 1.2. Diagnóstico microbiano.

Cuando se sospechaba la existencia de una infección, las muestras se sometían a tinción de Gram y se cultivaban en medios de uso general (agar con sangre, agar con sangre cocida y los medios diferenciales agar McConkey y agar Chapman) en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España). Para las infecciones fúngicas, las muestras de esputo se cultivaron en agar Sabouraud con cloranfenicol. El aislamiento de microorganismos o la sospecha clínica de infección, sin administración de antibióticos, no se consideró como infección.

10 Ejemplo 1.3. Recogida de muestras y extracción de ARN.

Se recogieron 2,5 ml de muestras de sangre completa de controles sanos y de pacientes con SS y SNS usando tubos de recogida de sangre venosa a vacío PaxGene (Becton Dickinson, EE.UU.). Las muestras de sangre se obtuvieron en pacientes con SS y SNS en el plazo de 24 horas después del ingreso en la UCI.

15 El ARN total se extrajo y se purificó de las muestras de sangre usando el sistema de ARN en sangre PAXgene (PreAnalytix, Suiza) y el mini kit RNeasy (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad del ARN total se evaluó mediante el bioanalizador RNA Experion (BioRad, EE.UU.) y la cantidad se evaluó mediante la absorbencia de un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.). Se concentraron hasta
20 1750 ng de cada muestra de ARN con el kit de limpieza RNeasy MinElute (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se eluyeron en un volumen final de 10 µl según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ARN purificado se almacenó a -80°C.

Ejemplo 1.4. Procesamiento de micromatrices y análisis de datos.

25 Se usaron 100 µg de ARN total para producir ARNc marcado con cianina 3-CTP usando el kit de marcaje Quick Amp (Agilent, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Siguiendo el protocolo de análisis de expresión génica basado en micromatrices de un color, versión 5.7 (Agilent, EE.UU.), se hibridaron 3 µg de ARNc marcado con el kit Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent, EE.UU.) que contiene 41.000 genes y transcritos humanos únicos. Las matrices se escanearon en un sistema de escáner de micromatrices Agilent G2565BA

(Agilent, EE.UU.) según el protocolo del fabricante, y los datos se extrajeron usando el software de extracción Agilent Feature 9.5.3 siguiendo el protocolo Agilent GE1-v5_95_Feb07 y el conjunto de métricas de control de calidad GE1_QCMT_Jan08. Los archivos de datos sin procesar se importaron al entorno de programación R-Bioconductor usando read.maimages del paquete limma. Las sondas de repetición se agregaron por su valor mediano. El preprocesamiento se continuó con la corrección de fondo. Se usó el método normexp (*'saddle'*) con un valor de compensación de 50. La normalización entre las matrices se realizó mediante el método de cuantiles. La matriz de expresión se resumió para su análisis adicional mediante la selección del decil superior de sondas en la varianza. El análisis de expresión diferencial se continuó usando la función lmFit del paquete limma para obtener los cambios logFold entre los grupos con SS y SNS. El enriquecimiento funcional de los genes más relevantes se realizó usando la ontología GO-BP. El conjunto de datos de micromatrices se ha depositado en el Gene Expression Omnibus del NCBI y puede consultarse a través del número de registro de la serie GEO GSE131761.

15 **Ejemplo 1.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).**

Para validar la fiabilidad de los datos obtenidos mediante el análisis de micromatrices, se seleccionaron seis genes en función de los cambios en veces y el valor de p de las micromatrices y se evaluaron sus niveles de expresión mediante qRT-PCR en la cohorte de validación. Para obtener el ADNc, se realizó la transcripción inversa con el kit de síntesis de ADNc iScript Advanced (Bio-Rad) usando el ARN aislado de los pacientes. El ADNc se usó como molde para la qRT-PCR con el fin de evaluar el perfil de expresión del ARNm de los genes representativos *IGHG1*, *IL1R2*, *LCN2*, *LTF*, *MMP8* y *OLFM4* de los pacientes de control, con SS y SNS. La qRT-PCR se realizó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad) usando la mezcla maestra de expresión génica PrimeTime® y las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s; hibridación y elongación a 62°C durante 15 s. En cada caso, los patrones de expresión génica de los pacientes con SS se compararon con los observados en los pacientes con SNS después de la normalización con el gen de *actina*, que se empleó como genes de referencia. Las secuencias de los cebadores para los genes seleccionados se enumeran en la **tabla 3**. En el caso de los genes *IGHG3*, *IGHG2*, *IGHA1* e *IGHA2*, se diseñó un par de cebadores para amplificar todas las clases de IgG.

La eficiencia de amplificación mediante PCR se estableció usando curvas de calibración. Para cada gen, se elaboró por triplicado una curva de calibración basada en cinco diluciones de una mezcla equimolar de muestras de ADNc para verificar la eficacia de la amplificación. Cada

muestra se ejecutó en pocillos por triplicado. Los valores de umbral de ciclo (Ct) se obtuvieron con el software Bio-Rad CFX Maestro y se convirtieron en niveles de expresión génica relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 3

Cebadores usados para la RT-PCR en tiempo real de genes de humanos

Gen	Directos (5'-3')	Inversos (5'-3')	Eficiencia
<i>Actina</i>	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	87,2%
<i>IGHG1</i>	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	96,9%
<i>IL1R2</i>	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	96,9%
<i>LCN2</i>	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	97,2%
<i>LTF</i>	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	94,3%
<i>MMP8</i>	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	94,5%
<i>OLFM4</i>	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	92,2%

5 Ejemplo 1.6. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando la versión 24 de SPSS Statistics (IBM, EE.UU.) y el paquete estadístico R versión 3.4.1 (The R Foundation, Austria). Las variables categóricas se evaluaron mediante la prueba χ^2 de Pearson y las variables continuas se analizaron mediante la prueba de la t de Student para encontrar la significación estadística cualitativa entre los pacientes con SS y SNS. La distribución normal y la homogeneidad de la varianza de los datos se evaluaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Se realizó un análisis de curva de rendimiento diagnóstico (ROC) con el área bajo la curva (AUC) para cuantificar la sensibilidad y la especificidad de los niveles de expresión génica, PCT, CRP y neutrófilos. Se usó un proceso de modelo logístico multivariante directo para añadir al modelo los parámetros clínicos con mejor rendimiento. En todos los casos, se consideró que un valor de $p \leq 0,05$ indicaba significación estadística.

Ejemplo 2. Resultados.

Ejemplo 2.1. Características del paciente.

Las características de los pacientes posquirúrgicos incluidos en este estudio se describen en la **tabla 2**.

Los pacientes con shock séptico y no séptico de la cohorte de descubrimiento y de la cohorte de validación fueron muy similares en cuanto a demografía y comorbilidades. La duración de la estancia hospitalaria fue significativamente diferente entre ambos grupos en la cohorte de descubrimiento y la cohorte de validación, sin embargo, la mortalidad no difirió entre ellos.

En el grupo con septicemia, la sangre fue el lugar más común de infección (37% para la cohorte de descubrimiento y 41% para la cohorte de validación), seguido de las vías respiratorias (32% y 33%), el abdomen (25% y 33%) y las vías urinarias (17% y 19%). Por otro lado, el microorganismo más comúnmente aislado fue la bacteria Gram-negativa (76% y 67%), seguida por la Gram-positiva (65% y 62%) y los hongos (29% y 27%).

Ejemplo 2.2. Identificación de genes biomarcadores que discriminan a los pacientes con shock séptico de los pacientes con shock no séptico.

En primer lugar, con el fin de analizar si los pacientes con SS y SNS pueden separarse en grupos distintos en función de sus perfiles de expresión génica, se realizó un análisis exploratorio de datos usando los datos de expresión génica de las micromatrices. Tal como se muestra en la **figura 1A**, en el gráfico del análisis de componentes principales (PCA), los pacientes parecen agruparse en tres áreas claramente distinguibles según el control, el shock séptico y el shock no séptico. Además, para definir los genes específicos de expresión diferencial (DEG) entre los pacientes con shock séptico y shock no séptico, se ejecutó el gráfico de volcán (**figura 1B**). Basándose en las diferencias de cambio en veces entre los dos grupos de pacientes y con un valor de p significativo, se generó una clasificación con los genes más regulados por incremento en el grupo con shock séptico. De esta clasificación, se seleccionaron los primeros nueve genes, que pueden considerarse como los DEG más significativos entre los grupos con shock séptico y no séptico: *LCN2*, *IGHG3*, *IGHG2*, *LTF*, *OLFM4*, *IGHA1*, *IGHA2*, *MMP8* e *IL1R2*. Además, los datos sin procesar de la micromatriz para los genes seleccionados se presentan como un gráfico de mapa de calor. Este gráfico muestra claramente el diferente patrón de expresión génica entre los pacientes con shock séptico y no séptico (**figura 1C**). Por último, también se investigaron las funciones biológicas enriquecidas. Los resultados revelan que los procesos biológicos más representativos están relacionados con el sistema inmunitario, incluyendo la respuesta inmunitaria humoral, la respuesta de defensa a la bacteria, la activación del complemento o la regulación positiva de la activación de células B (**figura 1D**).

Ejemplo 2.3. Validación de los genes biomarcadores en una cohorte de validación.

Para evaluar la robustez de los genes seleccionados como biomarcadores candidatos, se sometieron a prueba mediante qRT-PCR en una cohorte de estudio independiente (cohorte de validación). En concordancia con los datos de la micromatriz de la cohorte de descubrimiento, la actividad transcripcional de *LCN2*, *IGHG3*, *IGHG2*, *LTF*, *OLFM4*, *IGHA1*, *IGHA2*, *MMP8* e *IL1R2* en los pacientes con shock séptico estaba significativamente aumentada en comparación con los pacientes con shock no séptico (**figura 2**).

Ejemplo 2.4. Validación de los genes biomarcadores en una cohorte de validación.

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con los biomarcadores más usados para el diagnóstico y la evolución del shock séptico, se evaluó la capacidad de los niveles de expresión génica, PCT, CRP y neutrófilos para discriminar los casos entre shock séptico y no séptico. Los valores de los parámetros clínicos se restringieron en el momento de la extracción de sangre para los ensayos de expresión génica. En una primera etapa, estos biomarcadores se evaluaron mediante un análisis de curva ROC en la cohorte de validación, con AUC para cuantificar su precisión. Tal como se muestra en la **figura 3A**, el AUC más alto fue el del gen *IGHG1* (0,797; 0,727-0,867), seguido de *LTF* (0,719; 0,634-0,803), *OLFM4* (0,698; 0,611-0,786), *LCN2* (0,677; 0,590-0,764), *MMP8* (0,637; 0,548-0,726) e *ILIR2* (0,632; 0,540-0,725). Por otro lado, se realizó un modelo de regresión multivariante incluyendo todos los genes evaluados, mejorando el AUC hasta 0,841 (**figura 4B**). En el caso de los biomarcadores clásicos, las AUC no fueron tan buenas como se esperaba para diferenciar las dos categorías de pacientes: 0,598 (0,505-0,690) para PCT, 0,692 (0,598-0,786) para RCP y 0,613 (0,519-0,707) para neutrófilos (**figura 3B**). En un esfuerzo por mejorar adicionalmente el AUC, se realizó un modelo de regresión multivariante incluyendo en el análisis las variables sexo, edad, cirugía de urgencia, neutrófilos y bilirrubina. Las AUC fueron mejores que las presentadas anteriormente para todos los biomarcadores analizados (**figura 4**). El modelo de regresión multivariante para la expresión génica tuvo una muy buena precisión en los pacientes estudiados, con $AUC = 0,892$.

Ejemplo 2.5 Resultados mejorados basados en un nuevo modelo de regresión.

En un análisis adicional, se diseñó un nuevo modelo de regresión multivariante que incluye los genes evaluados y la bilirrubina, la CRP, la glucosa y los neutrófilos como variables de ajuste, en lugar del sexo, la edad, la cirugía de urgencia, los neutrófilos y la bilirrubina. Las nuevas variables de ajuste seleccionadas añadieron al modelo los parámetros clínicos de mejor rendimiento. El nuevo modelo de regresión multivariante mejoró el valor del AUC hasta 0,922 (0,874-0,970) (**figura 5**). Por otro lado, para asegurar el potencial de los genes seleccionados como posibles biomarcadores, se realizó un modelo de regresión para cada uno de los genes con estas nuevas variables de ajuste. Por tanto, los valores de cada gen son los siguientes: *IGHG1* (0,909; 0,856-0,962), *LTF* (0,839; 0,768-0,910), *LCN2* (0,837; 0,764-0,910), *OLFM4* (0,823; 0,745-0,902), *MMP8* (0,819; 0,740-0,898) e *ILIR2* (0,814; 0,733-0,896) (**figura 6**).

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y shock no séptico tras una cirugía que comprende:
 - 5 a. medir el nivel de expresión del gen *IGHG1* en una muestra biológica obtenida del paciente, y
 - b. en el que la identificación de un nivel de expresión aumentado del gen *IGHG1* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en pacientes con shock no séptico usado como referencia, es una indicación de que el paciente padece shock séptico.
- 10 2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende, además:
 - a. medir el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo que comprende:
 - a) *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* en una muestra biológica obtenida del paciente, y
 - 15 b. en el que la identificación de un nivel de expresión aumentado de un gen seleccionado del grupo que comprende: *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en pacientes con shock no séptico usado como referencia, es una indicación de que el paciente padece shock séptico.
- 20 3. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - a. medir el nivel de expresión de una de las combinaciones de genes siguientes: *IGHG1* y *MMP8*; *IGHG1* y *LCN2*; *IGHG1* y *LTF*; *IGHG1* y *OLFM4*; *IGHG1* y *IL1R2*; *IGHG1*, *MMP8* y *LTF*; *IGHG1*, *MMP8* y *LCN2*; *IGHG1*, *LTF* y *LCN2*; o *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*, en una muestra biológica obtenida del paciente,
 - 25 b. en el que la identificación de un nivel de expresión aumentado de una de las combinaciones de genes siguientes: *IGHG1* y *MMP8*; *IGHG1* y *LCN2*; *IGHG1* y *LTF*; *IGHG1* y *OLFM4*; *IGHG1* y *IL1R2*; *IGHG1*, *MMP8* y *LTF*; *IGHG1*, *MMP8* y *LCN2*; *IGHG1*, *LTF* y *LCN2*; o *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2* en el paciente con respecto al nivel de expresión medido en pacientes con shock no séptico usado como referencia, es una indicación de que el
 - 30 paciente padece shock séptico.
4. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

- a. medir el nivel de expresión de todos los genes siguientes: *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2* en una muestra biológica obtenida del paciente,
- b. en el que la identificación de un nivel de expresión aumentado de todos los genes siguientes: *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2* en el paciente
- 5 con respecto al nivel de expresión medido en pacientes con shock no séptico usado como referencia, es una indicación de que el paciente padece shock séptico.
5. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es sangre.
- 10 6. Uso *in vitro* del nivel de expresión del gen *IGHG1* para el diagnóstico diferencial entre shock séptico y shock no séptico.
7. Uso *in vitro*, según la reivindicación 6, que comprende además medir el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que comprende: *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2*.
- 15 8. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, que comprende medir el nivel de expresión de una de las combinaciones de genes siguientes: *IGHG1* y *MMP8*; *IGHG1* y *LCN2*; *IGHG1* y *LTF*; *IGHG1* y *OLFM4*; *IGHG1* y *IL1R2*; *IGHG1*, *MMP8* y *LTF*; *IGHG1*, *MMP8* y *LCN2*; *IGHG1*, *LTF* y *LCN2*; o *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*.
- 20 9. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende medir el nivel de expresión de los genes *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*.
10. Uso de un kit que comprende:
- a. Reactivos o herramientas para obtener muestras de sangre del paciente, y
- b. reactivos para medir el nivel de expresión del gen *IGHG1*,
- 25 para el diagnóstico diferencial entre shock séptico y shock no séptico.
11. Uso de un kit, según la reivindicación 10, que comprende además reactivos para medir el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo que comprende: *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* o *IL1R2*.
12. Uso de un kit, según las reivindicaciones 10 o 11, que comprende reactivos para medir
- 30 el nivel de expresión de una de las combinaciones de genes siguientes: *IGHG1* y *MMP8*; *IGHG1* y *LCN2*; *IGHG1* y *LTF*; *IGHG1* y *OLFM4*; *IGHG1* y *IL1R2*; *IGHG1*, *MMP8* y *LTF*; *IGHG1*, *MMP8* y *LCN2*; *IGHG1*, *LTF* y *LCN2*; o *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*.

13. Uso de un kit, según las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además reactivos para medir el nivel de expresión de los genes siguientes: *IGHG1*, *LTF*, *OLFM4*, *LCN2*, *MMP8* e *IL1R2*.

Figura 1

A

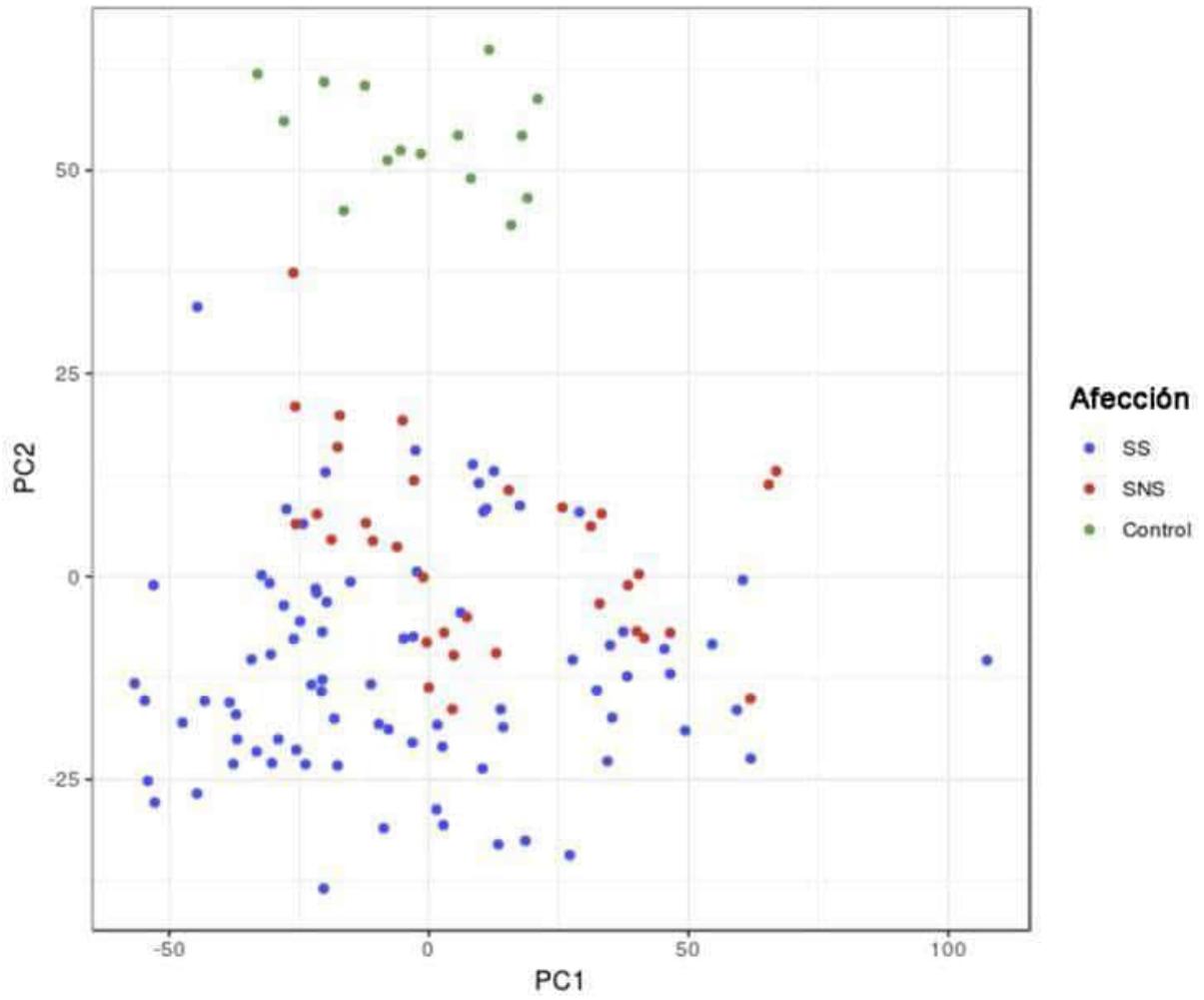


Figura 1 (cont.)

B

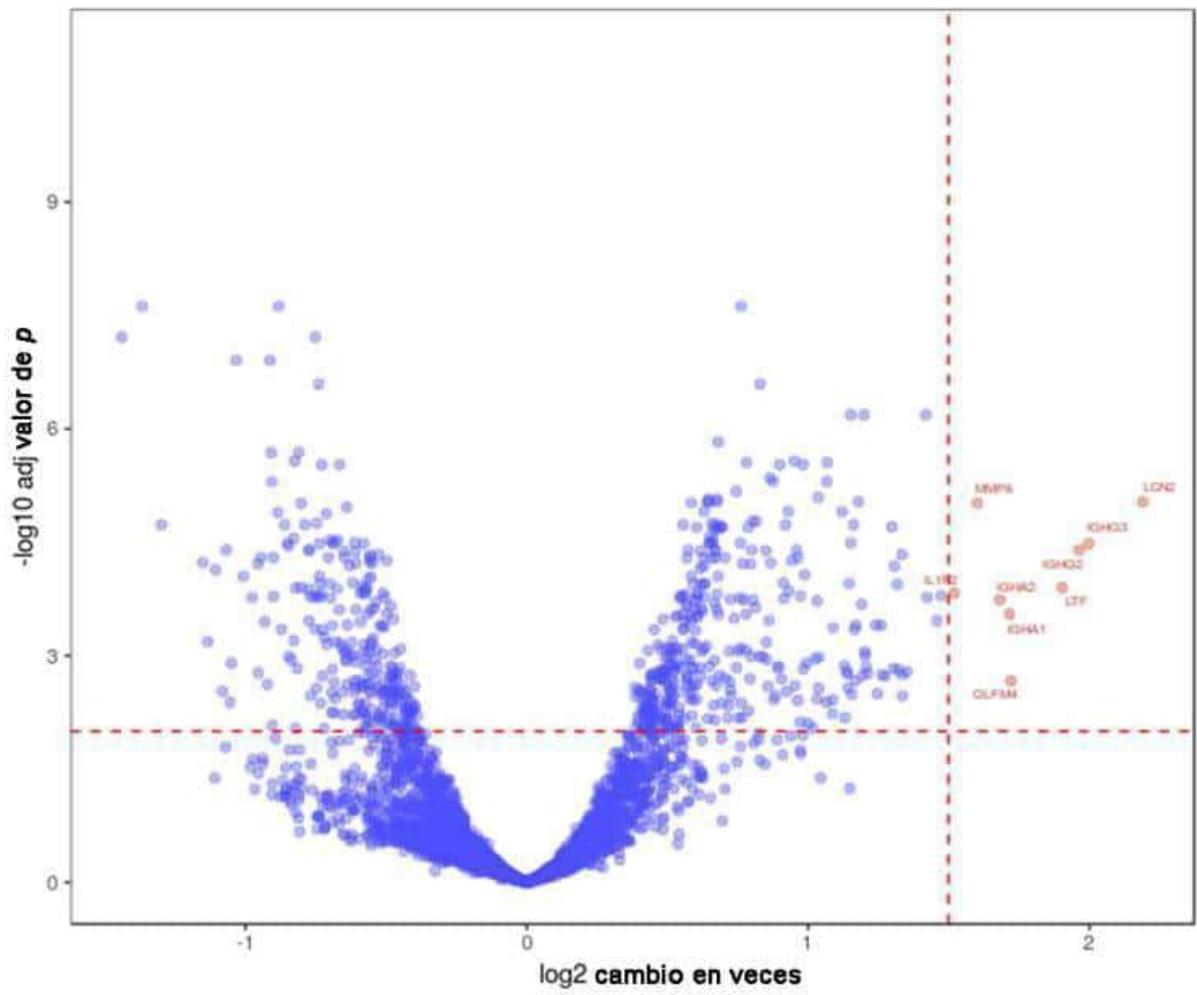


Figura 1 (cont.)

C

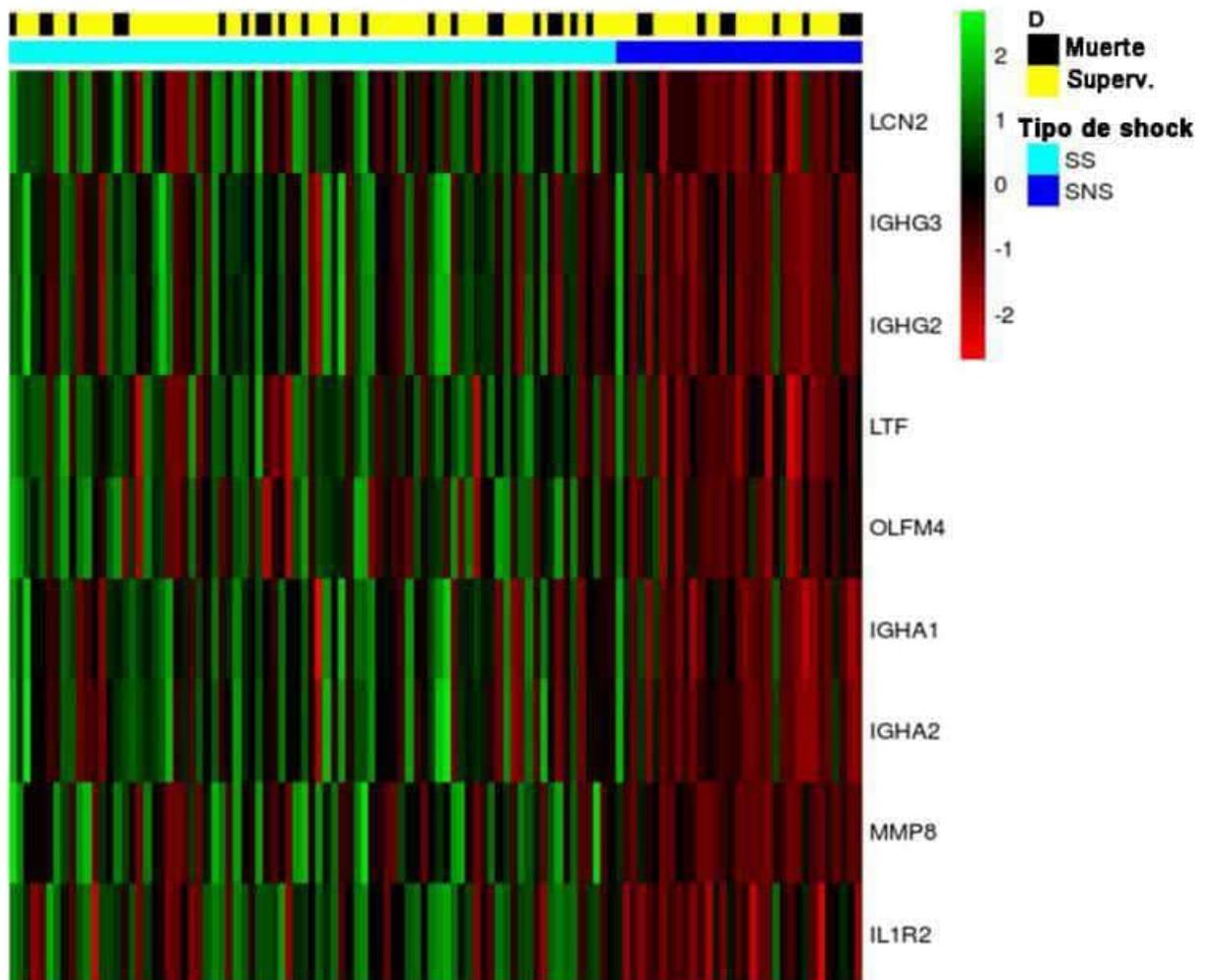


Figura 1 (cont.)

D

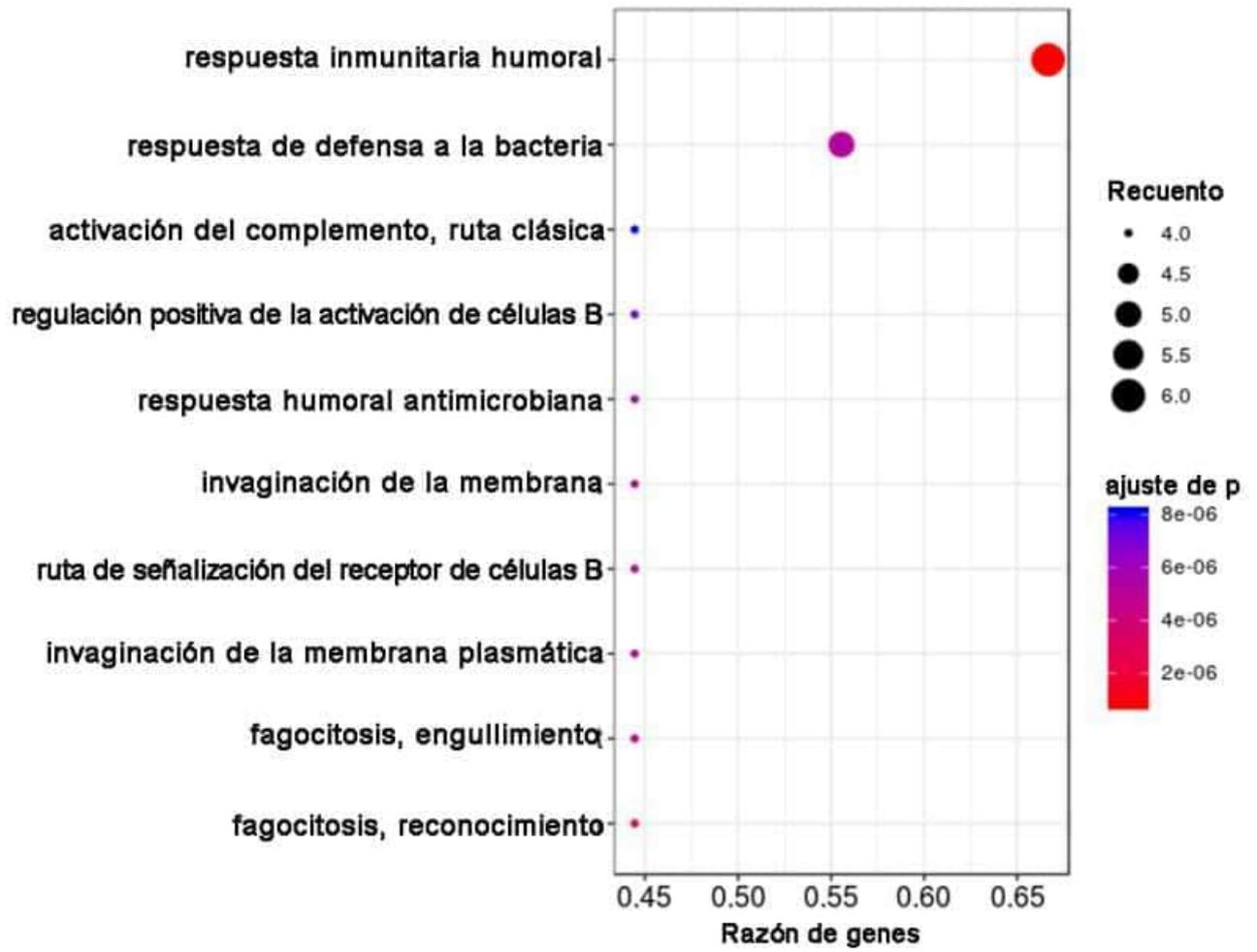
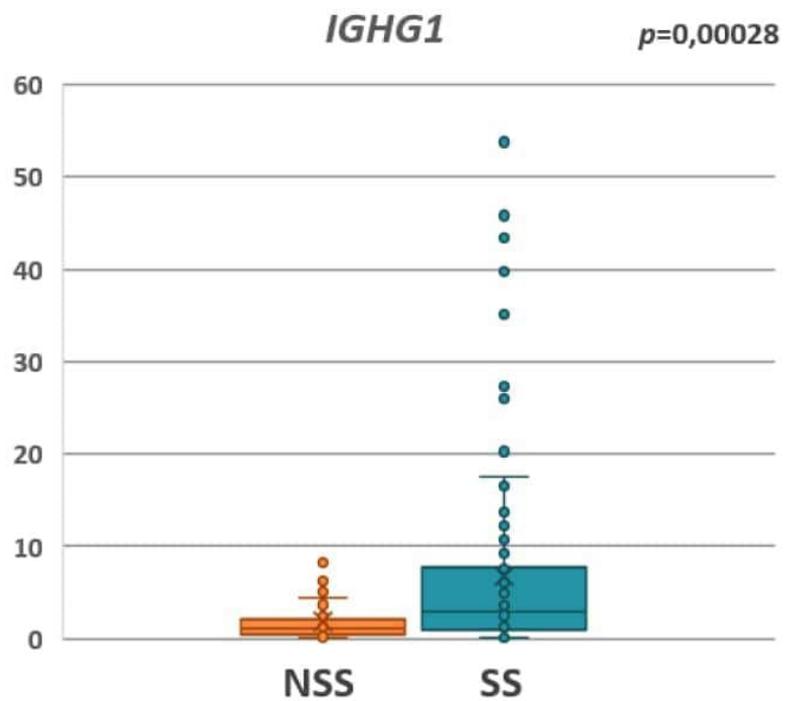


Figura 2

A



B

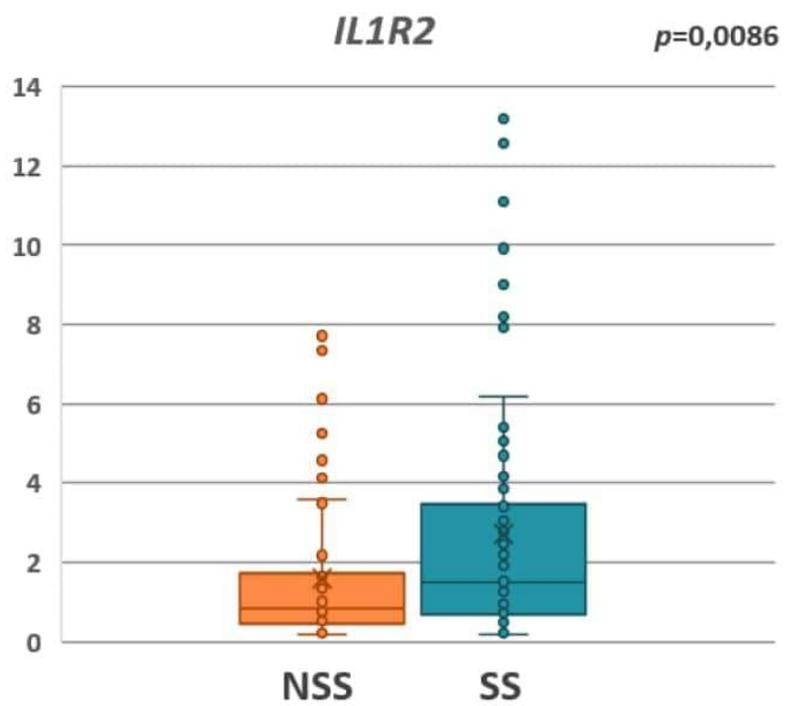
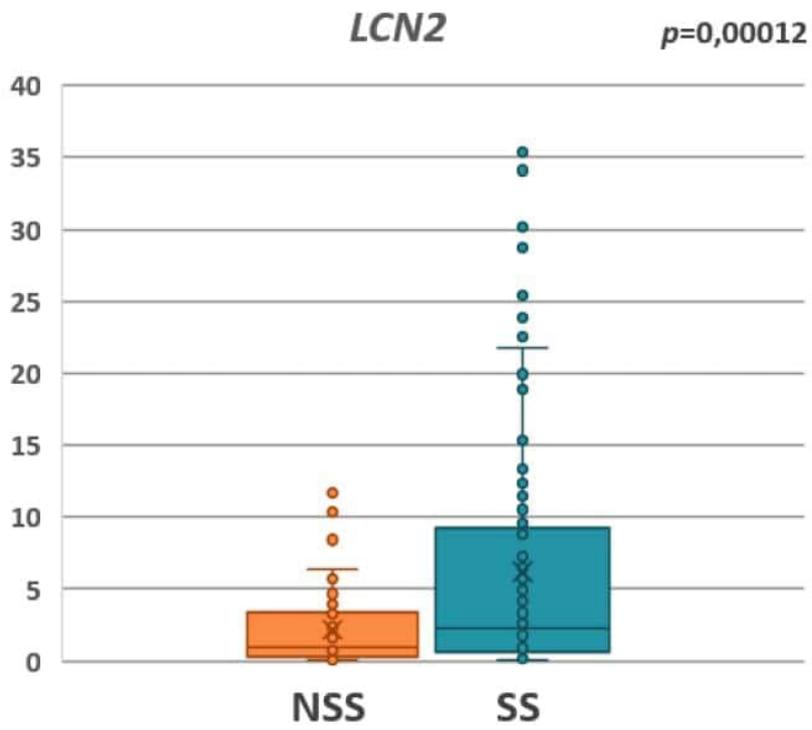


Figura 2 (Cont.)

C



D

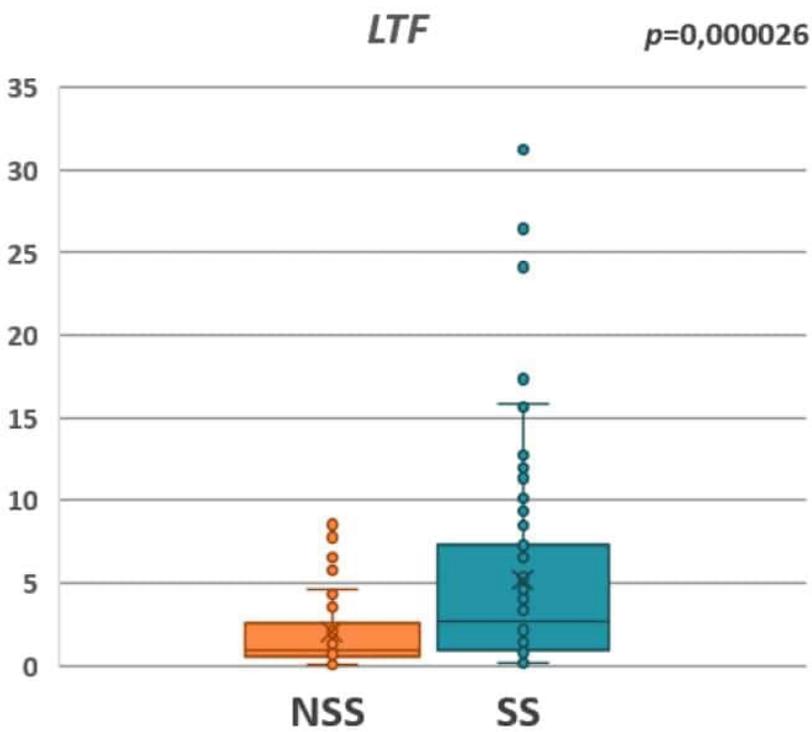
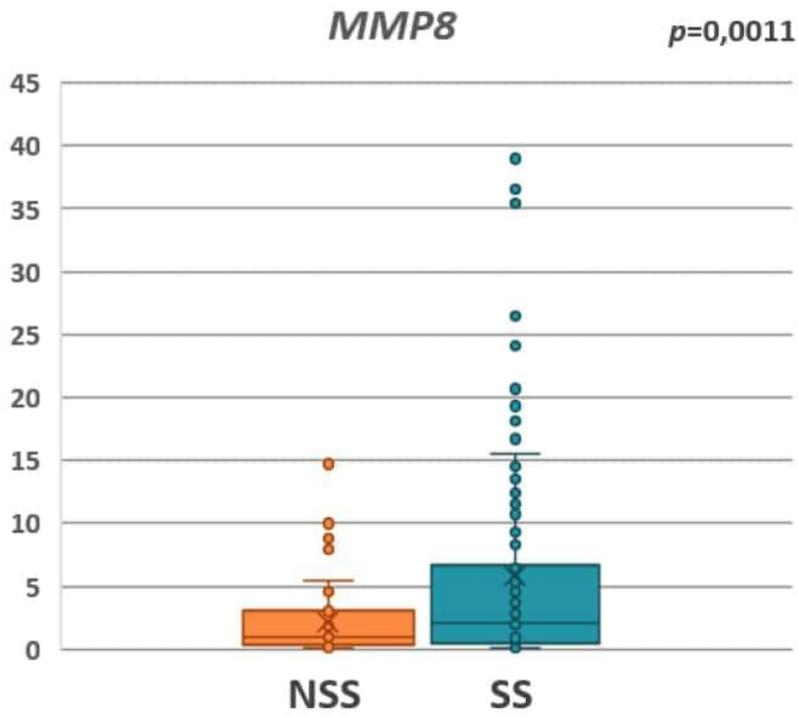


Figura 2 (Cont.)

E



F

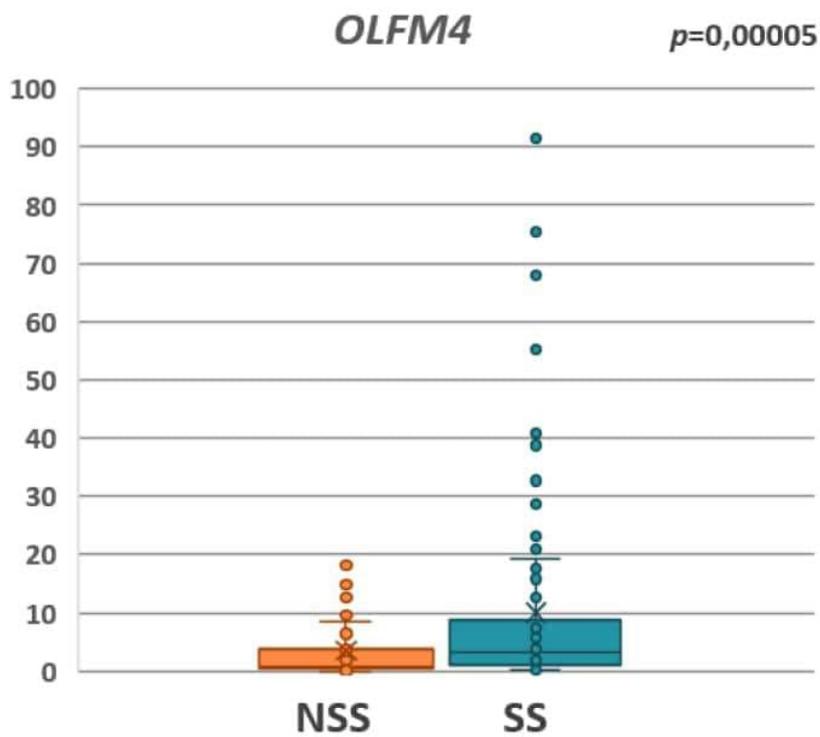


Figura 3

A

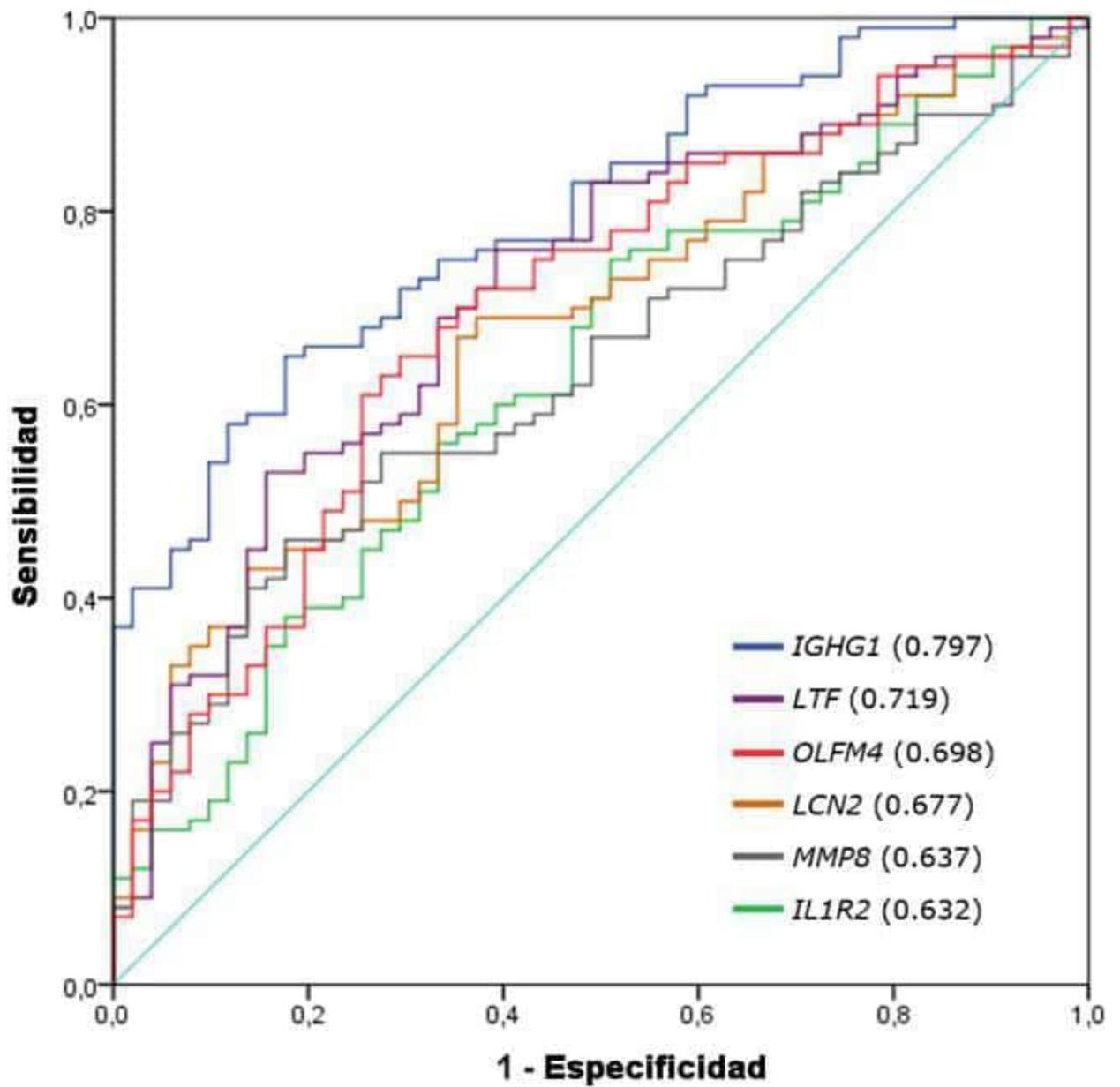


Figura 3 (cont.)

B

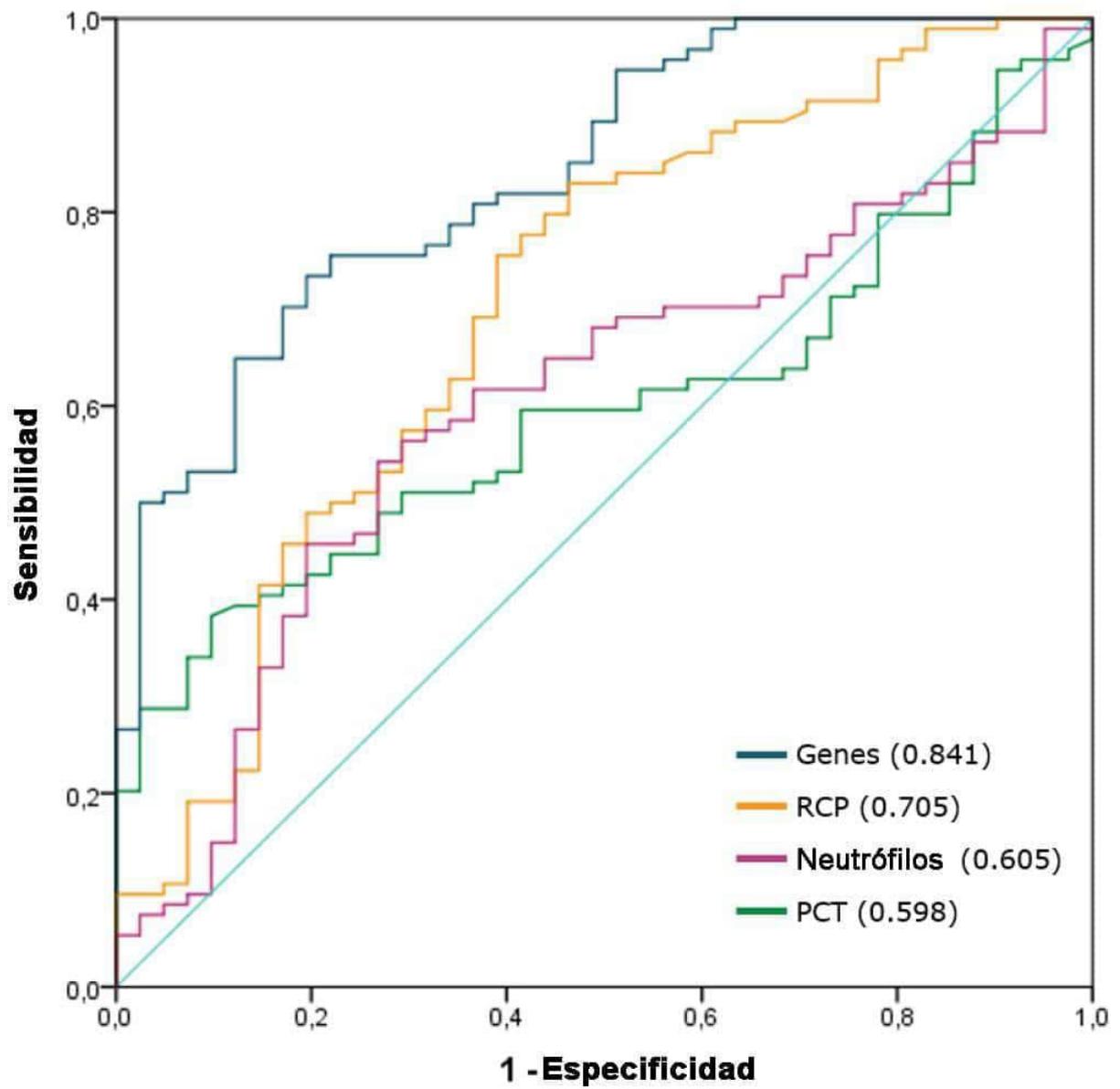


Figura 4

A

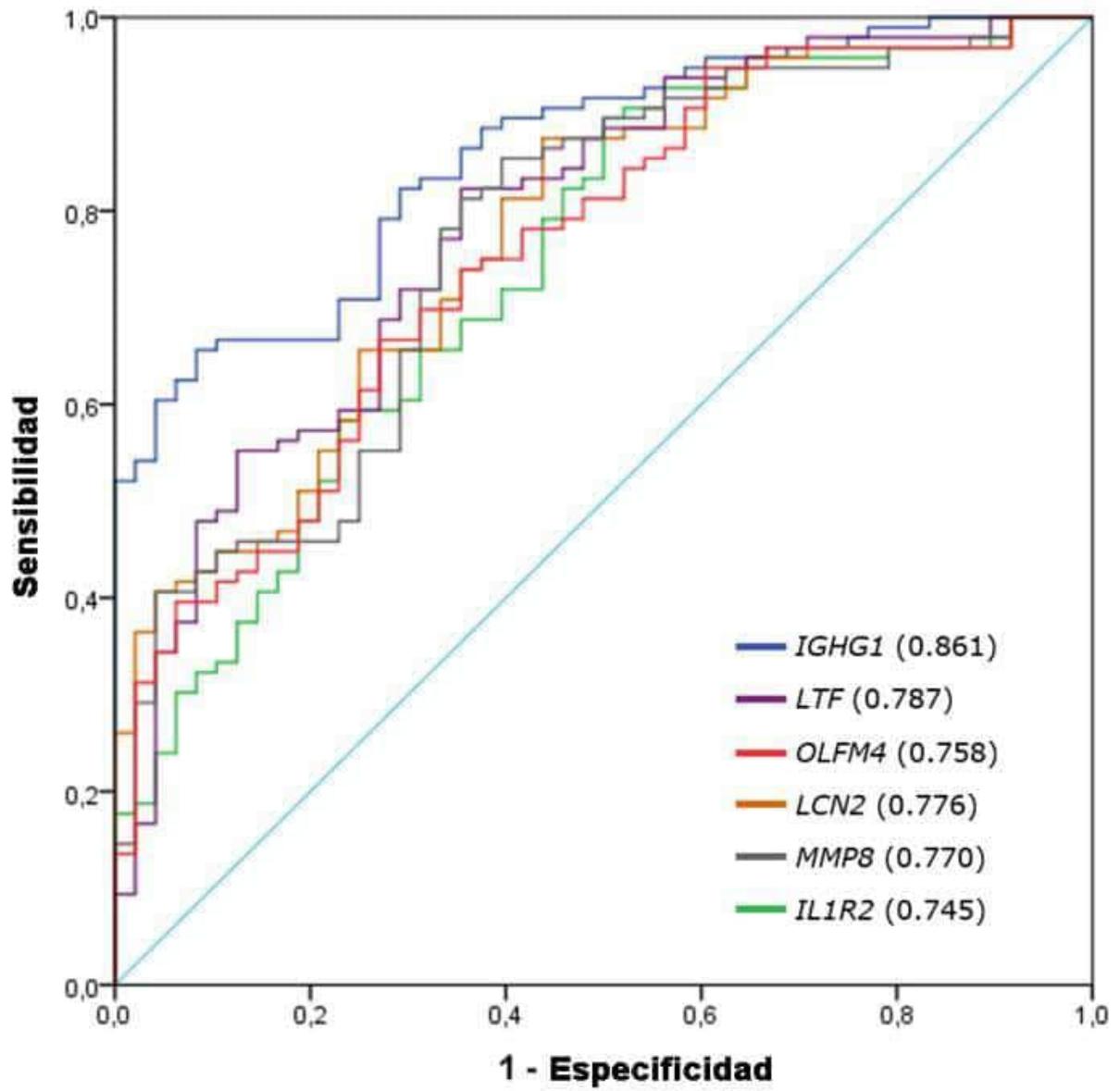


Figura 4 (cont.)

B

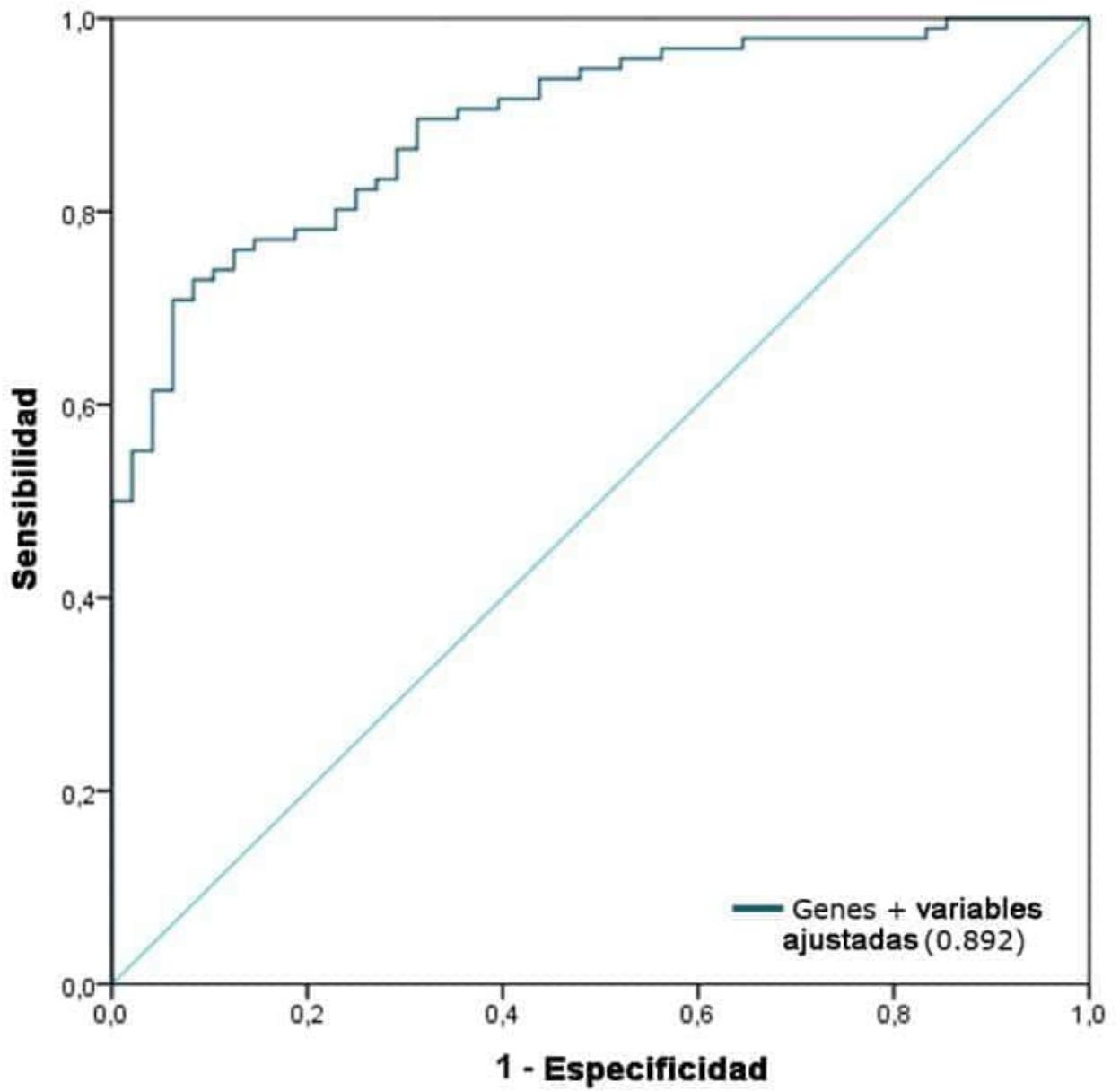


Figura 5

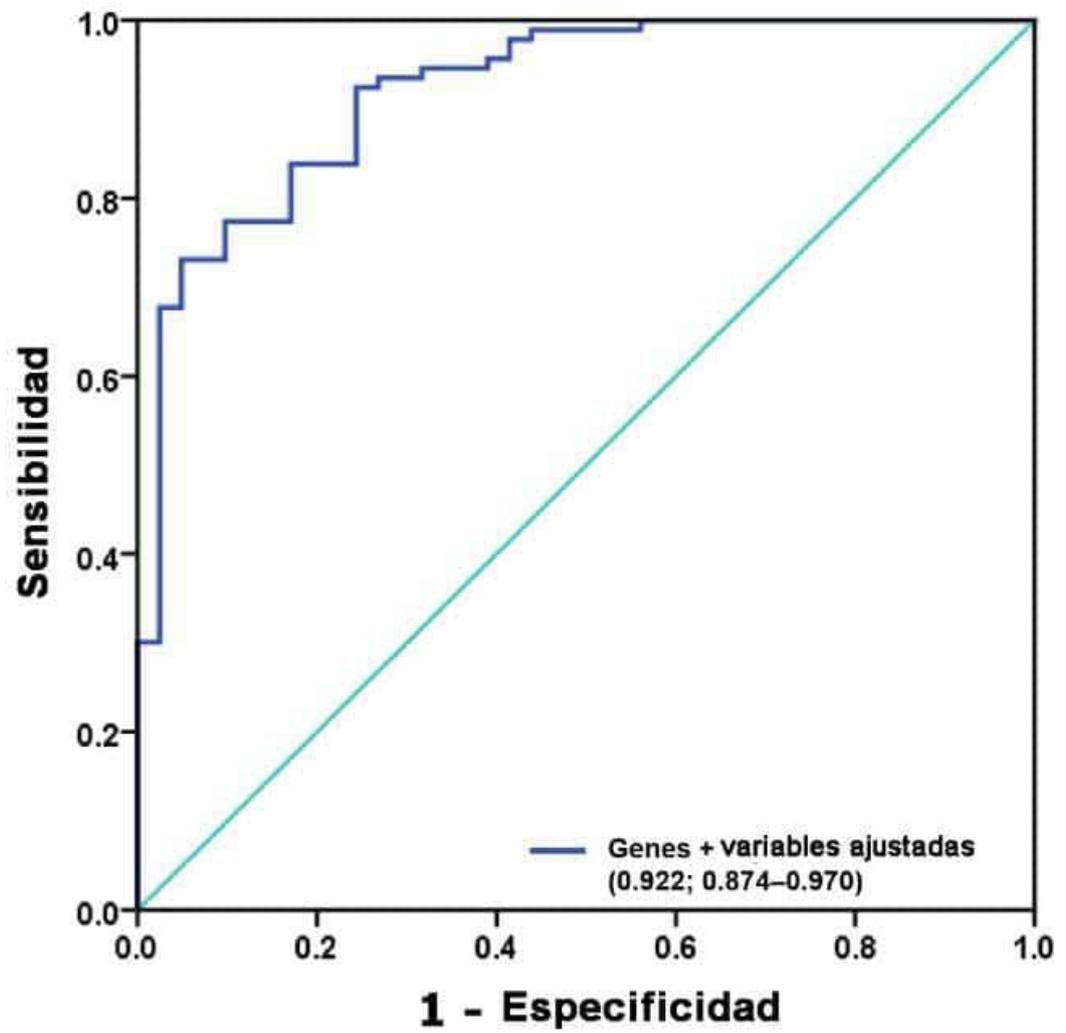


Figura 6

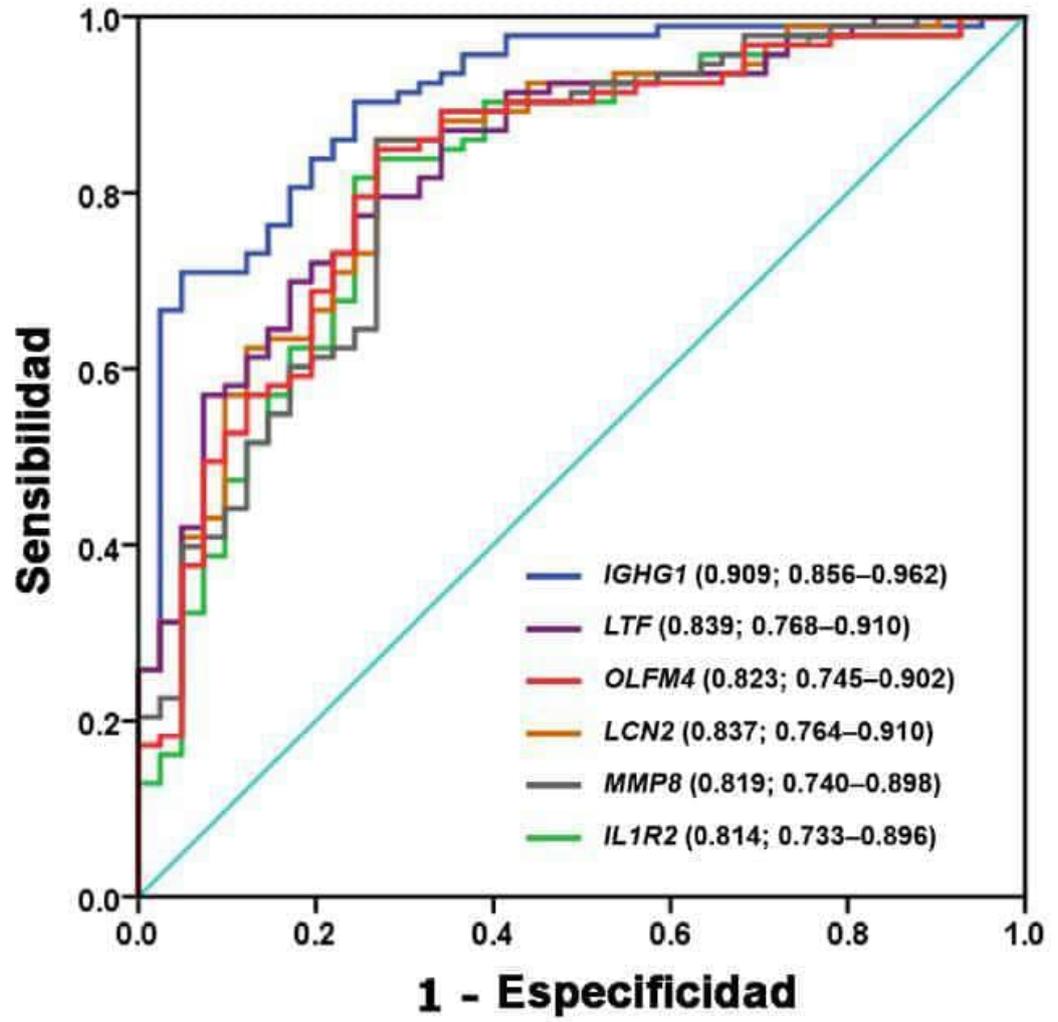
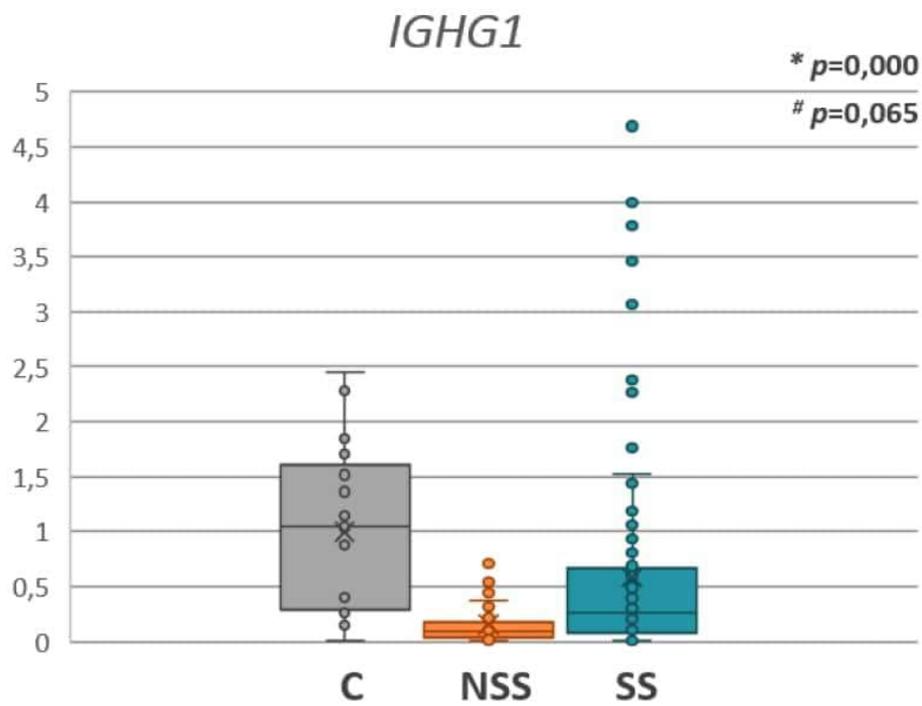


Figura 7

A



B

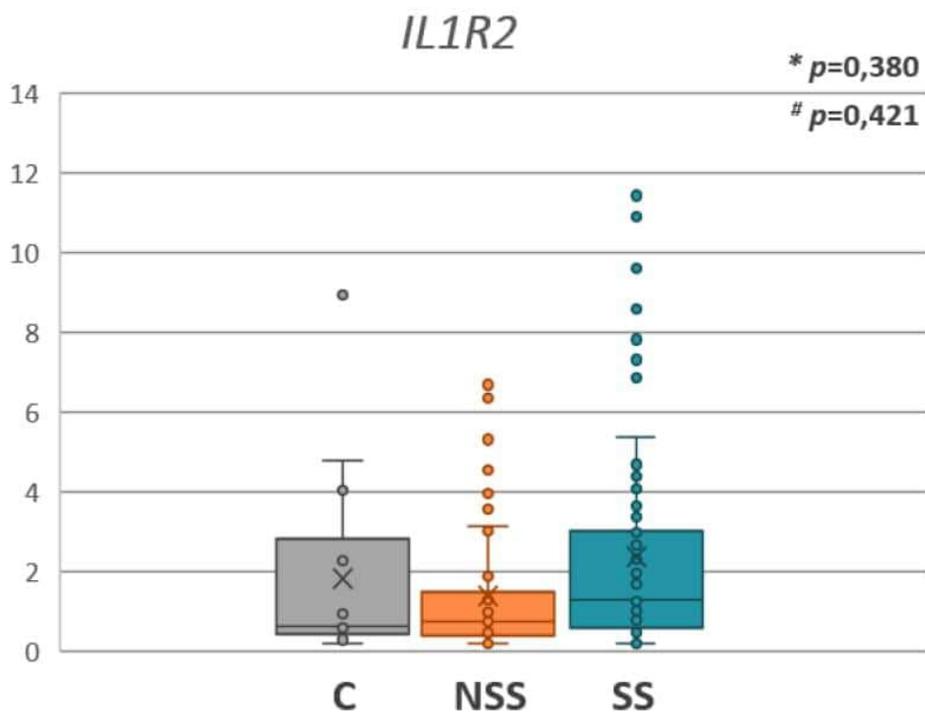
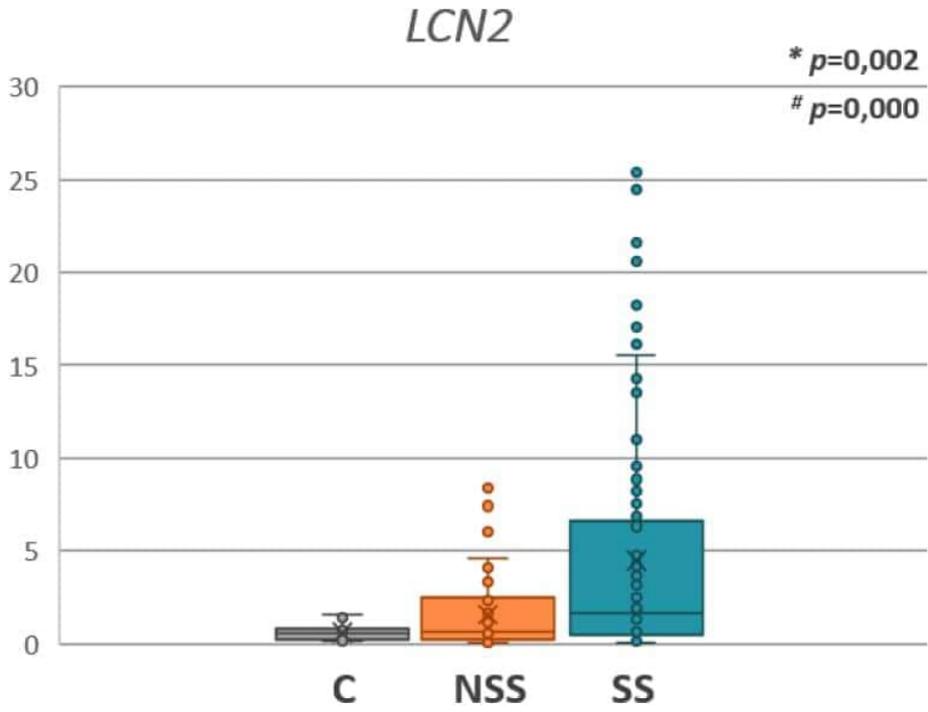


Figura 7 (Cont.)

C



D

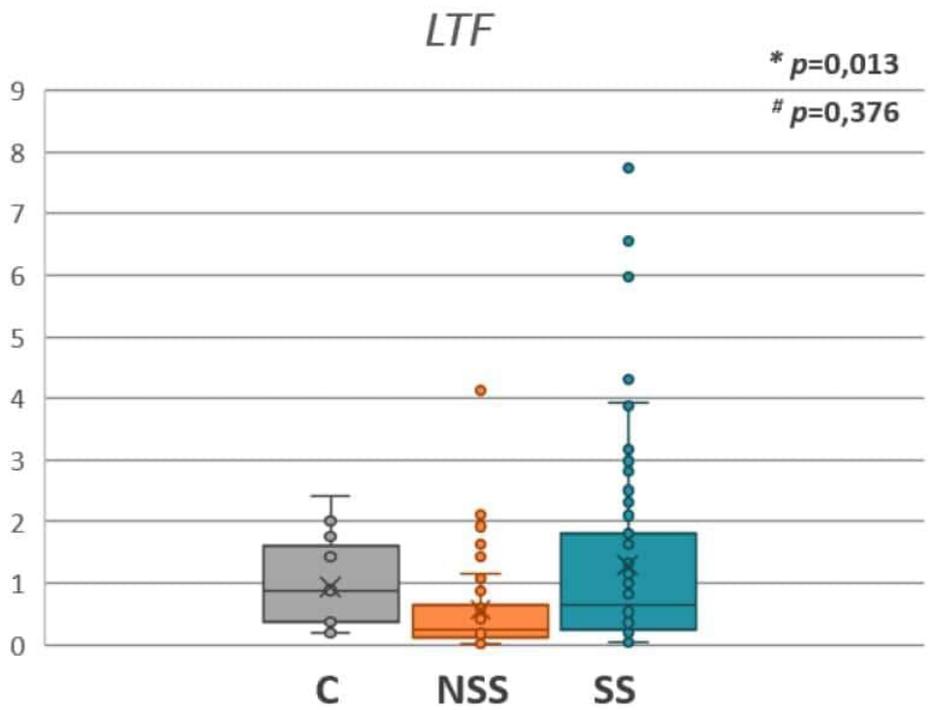
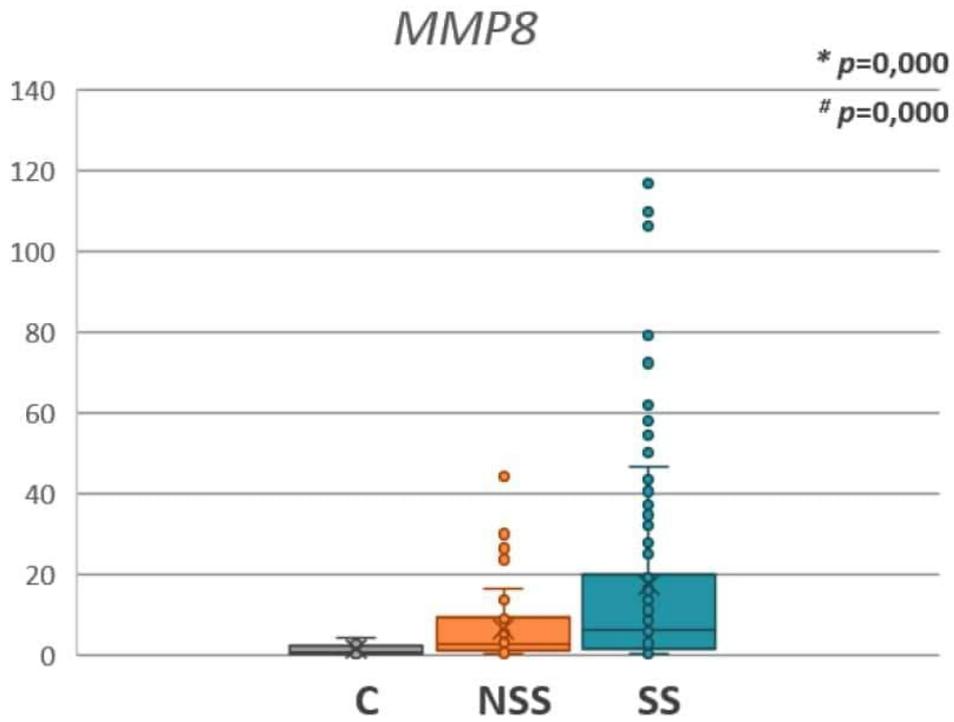


Figura 7 (Cont.)

E



F

