



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
NUEVAS ESTRATEGIAS
NANOTECNOLÓGICAS PARA LA DETECCIÓN
DE SEPSIS**

Autor: Laura Aguirre Socas

Fecha: Julio 2019

Tutor: María Moreno Guzmán

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
2 OBJETIVOS.....	4
3 METODOLOGÍA.....	4
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	4
4.1 El test ideal.....	4
4.2 Métodos empleados en la actualidad.....	5
4.2.1 Cultivo sanguíneo, patrón de referencia.....	5
4.2.2 Diagnóstico molecular.....	6
4.2.3 Marcadores.....	7
4.2.4 Combinaciones de marcadores.....	10
4.3 Nuevas alternativas diagnósticas.....	11
4.3.1 Sensores electroquímicos y ópticos.....	12
4.3.2 Sistemas microfluídicos en chip.....	15
4.4 Comparación de los principales métodos de detección.....	17
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	18
6 BIBLIOGRAFÍA.....	18

RESUMEN

La sepsis es una enfermedad que puede afectar a toda la población, aunque existe mayor incidencia en neonatos, en ancianos, en personas con enfermedades crónicas y/o con sistemas inmunitarios debilitados. Esto ligado a la alta mortalidad, la inespecificidad de la sintomatología inicial y al aumento de la letalidad conforme aumenta el tiempo de actuación, hace que sea complicado y primordial identificar la sepsis de la manera más rápida, específica y menos invasiva posible. Aunque existen varias estrategias de diagnóstico que han demostrado tener una alta sensibilidad y fiabilidad, estas no resultan suficientes, ya que no cumplen varias de las premisas necesarias. Además, la detección no se completa hasta que se haya llevado a cabo un cultivo sanguíneo, esto conlleva varias limitaciones que serán discutidas.

Los recientes avances en nanotecnología han posibilitado el desarrollo de estrategias de detección de los biomarcadores de interés o incluso directamente a los microorganismos patógenos, en tiempos y volúmenes muy reducidos. La aplicabilidad más prometedora de estos avances se centra en la tecnología en el punto de asistencia (POCT), que ha resultado revolucionaria en varios ámbitos científico-sanitarios, entre ellos, en la detección de sepsis. Están surgiendo numerosos métodos que cuentan o aspiran a contar con tecnología POCT, y estos parecen tener un futuro prometedor como herramientas de identificación de sepsis, ya que cumplen muchas, sino todas, de las características imprescindibles para convertirse en los métodos de detección perfectos.

En este trabajo se ofrece una revisión y comparación breve de los principales métodos convencionales de detección con los métodos nanotecnológicos que han surgido estos últimos años.

Palabras clave. Sepsis, Biosensores, POCT, Biomarcadores de sepsis, Nanotecnología, Diagnóstico Sepsis

ABSTRACT

Sepsis is a disease that can affect the whole population, although there is a higher incidence in neonates, the elderly, people with chronic diseases and/or weakened immune system. This, along with the high mortality, the lack of specificity of the initial symptomatology and the increase in lethality as the time of action increases, makes it difficult and a top priority to identify sepsis in the fastest, most specific and the least invasive way possible. While there are several diagnosis strategies that have proven to be highly sensitive and reliable, these are insufficient, as they do not properly complete the necessary premises. In addition, detection it is not considered completed until a blood culture test has been taken, which entails multiple limitations that will be discussed.

Recent advances in nanotechnology have made it possible the development of diagnosis methods for detecting the biomarkers of interest or even directly the pathogenic microorganisms, in very low time and volumes. The most promising applicability of these advances are the point of care technologies (POCT), it has proven to be revolutionary in many scientific-health fields, including the detection of sepsis. Many methods are emerging that have or aspire to POCT technology, and these seem to have a promising future as tools for sepsis identification, as they meet many, if not all, of the characteristics required to become the perfect detection methods.

This paper offers a brief review and comparison of the main conventional detection methods with the nanotechnology methods that have emerged during the past years.

Keywords. Sepsis, Biosensors, POCT, Sepsis biomarkers, Nanotechnology, Sepsis Diagnosis

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Sepsis se redefine en la *Tercera Conferencia sobre las definiciones de Sepsis y Shock Séptico* de 2016 como una disfunción orgánica causada por la respuesta desregulada del huésped a una infección que supone una amenaza para la supervivencia del individuo. Se enfatiza en la presencia de una respuesta no homeostática a la infección, lo que atribuye una mayor letalidad en comparación a una infección, y se remarca la necesidad de diagnóstico y manejo precoz.¹

Anteriormente, en 1991, la sepsis designaba un Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) causado por un microorganismo patógeno. Se suele manifestar por dos o más de las siguientes condiciones, temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$, frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto; frecuencia respiratoria >20 respiraciones por min o Presión parcial de CO_2 (PaCO_2) <32 mmHg y/o recuento de leucocitos $>12000/\text{mm}^3$, $<4000/\text{mm}^3$ o $>10\%$ de bandas.² Debido a la pobre especificidad y a la existencia de pacientes que no muestran criterios de SIRS, se ha producido este cambio de definición, y se ha empezado a utilizar la escala SOFA (Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica). El uso de esta escala hace prescindible el término sepsis grave, que anteriormente designaba la existencia de una o varias disfunciones orgánicas.

El shock o más conocido como choque séptico es una subdivisión de la sepsis con mayor índice de mortalidad. Ocurre cuando se producen anomalías circulatorias, celulares y metabólicas profundas. Esto se traduce en un aumento de la presión arterial de 65 mmHg y en los niveles de lactato sérico >2 mmol/L en ausencia de hipovolemia.¹

La sepsis puede ocurrir a toda la población en general, aunque existen grupos y factores de riesgo que pueden predisponer a padecer este síndrome. Los principales factores de riesgo de padecer sepsis son, la baja (neonatos y niños) y la alta edad, pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas, como pueden ser pacientes con VIH, diabetes, cáncer y/o trasplantados. En los últimos años, la incidencia de la sepsis ha aumentado debido al aumento de la conciencia de esta enfermedad (que ha permitido identificar casos antes subestimados), al aumento de la población anciana y con enfermedades crónicas expuesta, a la aparición de gérmenes multirresistentes a antibióticos y por último debido a los avances médicos que permiten un aumento de la población trasplantada.³

Posee una muy elevada mortalidad y el pronóstico varía dependiendo del tiempo de detección y del estadio de la enfermedad. La progresión de sepsis a shock séptico suele ser rápida, siendo las primeras 72 horas cruciales para el pronóstico del paciente afectado, es por ello por lo que se remarca siempre la importancia de una detección precoz para lograr un rápido abordaje.³

El estudio de Vincent et al.⁴ (2006), uno de los estudios más importantes realizados en Europa, en el que se estudiaron 3147 personas de 24 países europeos con un seguimiento de 15 días, concluyó que la mortalidad asociada a sepsis es del 27%, en el caso de sepsis grave la mortalidad es del 36%, pudiendo superar el 50% si el paciente llega al shock.

Por otro lado, en un estudio realizado en la comunidad de Madrid, en el que se identificaron 6968 episodios, la incidencia de sepsis grave fue de 14,1/10000 habitantes, aumentando a 86,4/10000 en menores de 1 años y a 230,8/10000 en mayores de 84 años.⁵

Cabe mencionar que, en gran parte de los supervivientes, la sepsis deja importantes secuelas, aumentando la gravedad de éstas a medida que avanza el síndrome. Es común un deterioro físico, cognitivo y de la salud mental, un posible desarrollo de sepsis recurrente, de amputaciones e incluso exacerbaciones de enfermedades presentes o futuras.⁶

Por todo esto resulta muy importante la detección lo más temprana y rápida posible, para poder frenar el trascurso de la enfermedad y evitar, en la medida de lo posible, los daños asociados.

Actualmente el método de certeza o patrón de referencia (denominado comúnmente *gold standard*) para detectar sepsis sigue siendo el cultivo sanguíneo, aunque para el manejo y

pronóstico de la enfermedad no es el mejor indicador si se utiliza como única técnica de diagnóstico, principalmente por su tiempo de demora. Por ello, para la detección y seguimiento de la sepsis se ha hecho indispensable el uso de (bio)marcadores que gracias a la aparición o al aumento en sangre de los mismos, indican la posible presencia de sepsis. Estos pueden desde jugar papeles determinantes en la defensa del hospedador a simplemente indicar de manera inespecífica la presencia de una inflamación o infección. Los biomarcadores tienen por lo tanto tres papeles importantes: identificar o descartar la presencia de sepsis, evaluar la severidad y evaluar la respuesta del paciente al tratamiento.

Aunque las estrategias de detección de sepsis convencionales han demostrado tener una sensibilidad y especificidad alta, no han logrado funcionar con bajas cantidades de muestra o tener la rapidez que se precisa, y de ninguna manera, han logrado sustituir el cultivo sanguíneo.

2 OBJETIVOS

El principal objetivo de esta revisión bibliográfica es dar a conocer los últimos avances en la detección precoz de sepsis. Para ello, se analizarán de manera independiente las características y las bases científicas de los últimas estrategias de detección que sean consideradas más prometedoras, por último, se compararán tanto entre ellas como con los métodos convencionales de diagnóstico para corroborar sus ventajas.

3 METODOLOGÍA

Este trabajo se ha realizado mediante la búsqueda exhaustiva de los últimos estudios publicados sobre el tema a tratar para proporcionar una visión lo más actualizada posible. Además, se ha incluido información general sobre las características y patogenia de la sepsis para poner así en contexto al lector.

La bibliografía se ha consultado en revistas científicas, tesis, bases de datos (PubMed, ScienceDirect, SciELO, Dialnet, Google Scholar, catálogo Cisne de la Biblioteca Complutense en línea y ACS Publications) y libros de texto. La búsqueda de información se realizó entre marzo y mayo del año 2020. La lista completa de las fuentes consultadas está disponible en el apartado de bibliografía.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 *El test ideal*

La prueba ideal para detectar la sepsis debe reunir varios requisitos, entre ellos los más importantes son, permitir una rápida detección (en menos de 6 horas y antes de la aparición de daños irreversibles), de alto espectro y permitir identificar patógenos específicos y que muestre la severidad de la sepsis. Además, es imprescindible que cuente con una alta sensibilidad y que sean fácilmente reproducibles, siendo lo menos invasivo posible y con una cantidad de muestra menor de 0,5 ml (punto especialmente importante en el caso de neonatos). En el caso de que además de cumplir todo lo anterior, detecte resistencias, ofrezca valores pronósticos y mantenga un coste-efectividad elevado, estaríamos ante una prueba de sepsis ideal.

También, en el caso de utilizar un biomarcador para determinar la presencia de sepsis, estos deben presentar unas características determinadas. Tienen que ser componentes estables en un periodo de tiempo suficiente para que se pueda garantizar su determinación, este tiempo debe tener en cuenta el proceso de recogida de la muestra en una jornada de trabajo normal, o deben permitir su almacenaje sin que se produzca descomposición del mismo antes del análisis. Además, debe permitir la obtención cuantitativa de su concentración y que el método de

determinación sea lo más sencillo y barato posible, así como debe mencionarse que el tiempo de respuesta sea rápido.^{7,8}

Este test ideal aún no existe, pero se están estudiando nuevos métodos y combinaciones que cada vez se acercan más a cumplir todos los requisitos. El método de referencia sigue siendo el cultivo sanguíneo, se sigue teniendo que realizar para identificar el(los) agente(s) patógeno(s) y así administrar el antibiótico más adecuado. Todos los métodos de detección que se comentan a continuación se utilizan para agilizar el posible diagnóstico y lo más importante, poder hacer un seguimiento de la efectividad del tratamiento mientras se realiza el cultivo sanguíneo, que, al tardar días, el tratamiento se comienza “a ciegas”, ya que se administra antes de conocer de manera certera el agente patógeno que causa la infección.

4.2 Métodos empleados en la actualidad

4.2.1 Cultivo sanguíneo, patrón de referencia

Es el método de detección imprescindible en la actualidad para poder corroborar la existencia de sepsis en el paciente, así como para poder detectar el microorganismo responsable y así poder usar el tratamiento antibiótico más adecuado, los hemocultivos son necesarios ya durante una bacteriemia el número de microorganismos es limitado, por ello no se pueden realizar tinciones directas en sangre. Esta prueba es de fácil realización y accesible a cualquier centro por lo que debe realizarse, si es posible, antes de comenzar el tratamiento antibiótico y periódicamente para conocer cómo va respondiendo el microorganismo al tratamiento. Una de las mayores limitaciones de este método es el tiempo que demora la prueba, pudiendo tardar de 6 h a 5 días el cultivo de dicho patógeno, sumado al tiempo de identificación por parte del laboratorio, <24h, y al tiempo de realización de la prueba de susceptibilidad antibiótica, unas 48h. Esto muchas veces limita la posibilidad de realizarse el cultivo antes de comenzar el tratamiento debido a la necesidad de una rápida actuación en una enfermedad contrarreloj como es la sepsis. Otro de los grandes inconvenientes es la necesidad de altas cantidades de sangre, especialmente restringidas en neonatos y más en los de bajo peso al nacer ya que no permiten la extracción de tal volumen sanguíneo. Generalmente en adultos es necesaria más de una extracción de 10-20 ml, llegando a los 20-40 ml de sangre extraída en total. Esta cantidad resulta inviable en neonatos, por lo que se debe reducir la cantidad a 1-5 ml en este caso, acción que puede inducir a la aparición de falsos negativos.^{9, 10}

Además, es imprescindible conservar la asepticidad durante todo el proceso, en el caso de que no se guarde esta premisa puede llevar a falsos positivos o la identificación de patógenos que se encuentran en la epidermis y no están causando la infección. A favor de este método cabe mencionar que, al utilizar altos volúmenes de muestra, permite con mayor sensibilidad detectar la escasa cantidad de microorganismos presentes en sangre durante una bacteriemia, por ello decimos que la sensibilidad del método es volumen dependiente.^{10, 11, 12}

Existen sistemas automatizados que realizan de manera computarizada el hemocultivo del microorganismo, manteniendo una temperatura de 36° +/-1 °C, una agitación continua y la emisión de una señal en caso de obtener un cultivo positivo. Dentro de estos sistemas destacan dos, VITEK® y BD BACTEC™ FX.

El VITEK® permite la identificación y prueba la especificidad a los antibióticos de forma automatizada una vez que se han tomado e incubado las muestras. En el caso de BACTEC™ es necesario añadir la muestra de sangre, de 1-3 ml en caso pediátrico (ya que no es posible extraer más, la cual sería deseada) y de 8-10 ml en adultos. Estos aparatos detectan en 8-70 horas el consumo de CO₂ mediante colorimetría, que en el caso de aumentar significativamente será

positivo. Esta prueba disminuye el tiempo de diagnóstico frente al cultivo convencional (6 h a 5 días), pero también detecta bastantes falsos positivos, que por ejemplo en el caso de un neonato puede ser bastante perjudicial, al administrarle antibiótico sin necesidad.^{10, 12, 13}

Por todo esto, aunque hoy por hoy sea necesario el uso de cultivos sanguíneos, debido a las limitaciones del excesivo volumen de muestra que se necesita, y alto tiempo en el diagnóstico, se están estudiando nuevas opciones para la detección precoz de la sepsis (o de los biomarcadores) que aumenten la rapidez de la obtención de resultados y que permitan la disminución del volumen de muestra.

También es importante comentar que existe la posibilidad de realizar cultivos con otros fluidos como orina o fluido cerebroespinal, pero estos son menos sensibles, especialmente en neonatos de menos de 72 horas de vida.

4.2.2 Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares se utilizan también, aunque en menor medida, como herramientas diagnósticas de sepsis. La detección de microorganismos se puede realizar a partir de un hemocultivo positivo (FilmArray™ de Biomerieux) o directamente de la sangre del paciente, sin necesidad de realizar una incubación previa como en los cultivos sanguíneos (SeptiFast® de Roche o SepsiTest™ de Molzym). Mediante estas estrategias, se podría acelerar la identificación del agente patógeno, disminuyendo en un primer momento la administración indiscriminada de medicamentos, habitualmente antibiótico.

Cabe destacar que, si bien estas plataformas han permitido acelerar el diagnóstico etiológico de la sepsis frente a ciertos casos de hemocultivos, el tiempo de detección con estas plataformas oscila entre las 4 y 10 horas, tiempo en ocasiones equivalente al patrón de referencia. De igual manera, los valores de sensibilidad y especificidad son altamente variables, hecho que demuestra que existe una falta de perfeccionamiento de estas técnicas moleculares. Otro inconveniente, especialmente de las técnicas que analizan directamente a partir de una muestra sanguínea, es que al reducir el volumen de muestra a analizar aumenta la posibilidad de falsos negativos.^{11, 14, 15}

FilmArray™ es una técnica que emplea tecnología de PCR en tiempo real. En varios estudios ha demostrado una disminución del tiempo de identificación del microorganismo, el tiempo de actuación una vez que se ha obtenido un hemocultivo positivo (24-72 horas) es de 1 hora, y tiene una sensibilidad del 95%. Este método no exige de la realización de un primer cultivo sanguíneo, por lo que la cantidad de muestra es la misma que en el método de referencia, 10-20 ml en adultos.¹⁴

Dentro de los sistemas que utilizan directamente una muestra sanguínea encontramos SeptiFast®, que a través de 3 PCR combinadas secuenciadas (para identificar bacterias Gram +, Gram – y hongos) permite identificar 19 especies de bacterias y 6 de hongos, en un tiempo de 6 horas. La cantidad de muestra necesaria es de 1,5 ml de sangre. Mediante la realización de una prueba adicional, esta técnica permite detectar la presencia de *mecA* en *S. aureus*, gen de resistencia a Meticilina. La sensibilidad de esta prueba oscila entre el 63-83% y la especificidad entre el 83-95%. El otro método de estas mismas características es SepsiTest™ funciona mediante PCR y una posterior secuenciación del amplicónⁱ obtenido. Necesita un volumen de muestra de solamente 1 ml, aunque esta muestra suele ser de sangre también puede aceptar

ⁱ Amplicón: conjunto de moléculas de DNA idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esencialmente, se trata de un clon molecular. Fuente: TREMEDICA (2008)

hasta 10 ml de otros líquidos estériles; y el tiempo de muestreo oscila entre las 8 y 12 horas. La sensibilidad de esta prueba es muy variable, en los estudios varía desde el 11 al 87%.¹² Tanto SeptiFast® como Sepsitest™ requieren equipamiento para realizar la PCR.¹⁵

La medición de niveles de HLA-DRAⁱⁱ se utiliza como método de detección de sepsis. Su importancia radica en que está ligado a la respuesta inmune. Mediante la medida de los niveles sanguíneos de HLA-DRA se evalúa el grado de inmunosupresión asociado a la sepsis, estos niveles pueden monitorizarse mediante la realización de técnicas PCR.¹⁶

4.2.3 Marcadores

Se ha estudiado un gran número de marcadores, entre ellos más de 170 biomarcadores, pero a día de hoy no existe ninguno que de manera independiente confirme de manera certera sepsis. Todos los marcadores se deben interpretar teniendo en cuenta el contexto de la historia clínica del paciente, así como es imprescindible evaluar otros síntomas clínicos o signos de infección. La escala SOFA es imprescindible, en el caso de sospecha de sepsis se puede complementar el diagnóstico con biomarcadores, algunos de los más estudiados y utilizados son la PCT, la CRP y la IL-6. Otros como el CD64 y los relacionados con el genoma del patógeno están siendo investigados en la actualidad.³

4.2.3.1 Marcadores biofísicos

El SOFA y el qSOFA (*quick* SOFA) son las dos escalas indicadas en el último consenso internacional para la detección precoz y seguimiento de la sepsis que sustituyen a los criterios SIRS establecidos en el 2001.¹ SOFA valora el funcionamiento de 6 órganos, siendo el cardiovascular el de mayor importancia para su pronóstico (Tabla 1), las puntuaciones para cada órgano son de 0 a 4, se dirá que hay “disfunción” cuando se asignan 1 o 2 puntos y “fallo” de 3 a 4 puntos. En definitiva, una puntuación mayor o igual a 2 indica disfunción orgánica. El qSOFA incluye criterios mesurables a pie de cama, lo que sirve como una alternativa más rápida que SOFA al no necesitar pruebas de laboratorio. Los criterios son alteración del nivel de conciencia en la escala Glasgow ≤ 13 , tensión arterial sistólica ≤ 100 mmHg y una frecuencia respiratoria ≥ 22 respiraciones por min. Existirá infección cuando se cumplen al menos 2 de los 3 criterios presentes.^{2, 17}

SIRS como se indicó en la introducción, se suele manifestar por dos o más de las siguientes condiciones, temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$, frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto; frecuencia respiratoria >20 respiraciones por min o $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg y/o recuento de leucocitos $>12000/\text{mm}^3$ y $<4000/\text{mm}^3$. SOFA tiene mayor capacidad pronóstica que SIRS y qSOFA, por ello es la actual referencia de diagnóstico.¹¹

Aunque los criterios SOFA hayan supuesto una mejoría en la detección rápida de sepsis, este sigue sin ser suficiente, debido primariamente a su falta de especificidad. Por este motivo existe un sobrediagnóstico de aproximadamente un 30% de los pacientes, lo que aumenta los gastos hospitalarios, la administración innecesaria de antibióticos y la resistencia a los mismos. Además, para poder analizar algunos de los criterios SOFA se necesitan equipos e infraestructura que puede no estar presente en todos los hospitales.¹²

ⁱⁱ HLA-DRA: genes de clase II que codifican la cadena alfa del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) o en inglés, HLA. Fuente: HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)

Tabla 1. Parámetros evaluados por la escala SOFA

Puntuación	0	1	2	3	4
RESPIRATORIO					
PaO₂/FIO₂ (mmHg)	≥400	<400	<300	<200 + SR	<100 + SR
COAGULACIÓN					
Plaquetas 10³/mm³	≥150	<150	<100	<50	<20
HEPÁTICO					
Bilirubina (mg/dL)	<1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	>12.0
CARDIOVASCULAR					
TAM (mmHG) Drogas vasoactivas (µg/kg/min)	≥70	<70	DA <5 o dobutamina a cualquier dosis	DA 5.1–15 o Epi ≤0.1 o NA ≤0.1	DA >15 o Epi >0.1 o NA >0.1
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL					
Escala de Glasgow	15	13–14	10–12	6–9	<6
RENAL					
Creatinina (mg/dL)	<1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9	>5.0
Diuresis (ml/día)				<500	<200

Abreviaturas. PaO₂, presión parcial de oxígeno; FIO₂, fracción inspirada de oxígeno; SR, soporte respiratorio; TAM, taquicardia auricular multifocal; DA, dopamina; Epi, epinefrina; NA, noradrenalina.

Notas. El rango de la escala de coma de Glasgow es de 3–15; mayor puntuación indica mejor función neurológica.

Fuente: tabla adaptada de Ref 1

Otro marcador biofísico es el RALIS, un algoritmo computarizado que analiza los signos vitales que introduce el clínico en el programa. Se examinan los datos de ritmo cardiaco, ritmo respiratorio, temperatura, número de desaturaciones (<80% en >10”), número de eventos de bradicardia (<100 latidos/min en >10”) y el peso. El resultado será un valor numérico entre 0-10, un resultado ≥5 durante más de 6 horas es signo de respuesta inflamatoria aguda.

Es un método de detección que se utiliza en neonatos prematuros, al ser más probable que desarrollen sepsis, ya que esta prueba es útil para detectar la sepsis antes de la que se instauran los síntomas clínicos, pero al igual que las anteriores son poco específicas.¹⁸

4.2.3.2 Biomarcadores

Los biomarcadores más estudiados son la Proteína C-reactiva (CRP) y la Procalcitonina (PCT), ambos son mediadores inflamatorios que indican de manera más o menos específica la presencia de una infección.

La CRP es una proteína de fase aguda liberada por los hepatocitos que indica la presencia de inflamación y/o infección, esto se traduce en una baja sensibilidad, ya que pueden aumentar sus

valores en sangre por motivos distintos a la presencia de una infección, resultando insuficiente su aumento para diagnosticar la sepsis. Destaca su cinética, ya que el aumento de los niveles de CRP en sangre se dan a partir de las 10-24 horas, produciéndose el pico hasta las 48 horas después del comienzo de la sepsis. Por todo esto, la detección de la CRP como único biomarcador carece de sentido actualmente.

En segundo lugar, la PCT, es una molécula proinflamatoria, su incremento en sangre se produce antes de las 6 primeras horas de infección, alcanzando su pico a las 8-24 horas. A partir de este periodo, los niveles de PCT comienzan a disminuir. Por ese motivo es importante detectar esta proteína durante las primeras horas de sospecha. La sensibilidad y especificidad de esta molécula es mayor que la de CRP además de permitir su detección varias horas antes, permitiendo una más rápida detección.^{8, 9, 18}

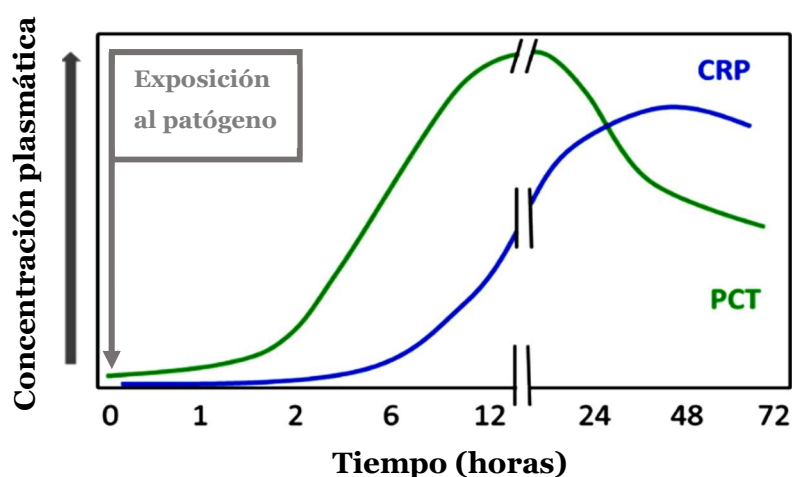


Figura 1. Relación entre la concentración plasmática de los biomarcadores CRP y PCT, y el tiempo.

Fuente: reproducido con el permiso de Ref 9

Otro de los biomarcadores que se pueden encontrar a la hora de realizar un análisis bioquímico es el lactato, un metabolito resultante de una hipoperfusión tisular que desencadena en una falta de suministro de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Niveles elevados de lactato se correlacionan con mayor severidad de sepsis, por lo que se utiliza para estratificar el riesgo de mortalidad, no se puede utilizar como biomarcador diagnóstico.^{19, 20}

Las citoquinas al ser moléculas secretadas por distintas células que intervienen en la respuesta inflamatoria se encontrarán en niveles anormales y por ello pueden servir de biomarcadores de sepsis. Destacan IL-6, IL-10, IL-8 y el TNF α .⁷ Varios estudios concluyen que la cuantificación de estos biomarcadores por separado no resulta demasiado representativa de la presencia de sepsis, en cambio el análisis del ratio IL-6:IL-10 posee una sensibilidad del 81,25% y una especificidad del 100%. Los niveles de citoquinas empiezan a aumentar a las 2-4 horas del inicio de sepsis, alcanzando el pico a las 6-8 horas.¹⁵

El neutrófilo CD64 es un receptor expresado mayoritariamente en monocitos que media en la realización de fagocitosis. El aumento de CD64 en PMN (leucocitos polimorfonucleares) (nCD64) significa la respuesta a una inflamación y de una infección en el hospedador, además se detecta entre 1 y 6 horas tras la infección.¹⁴ En un metaanálisis realizado por Joan Cid et al.²¹ en el 2010, se confirmó la utilidad de utilizar el nCD64 como diagnóstico de infecciones bacterianas, aunque también se sugirió la necesidad de realizar más estudios al respecto.

Mediante un hemograma también se pueden obtener valores que ayuden a detectar sepsis. Las células sanguíneas que sirven de biomarcadores de sepsis son las que se indican en la Tabla 3. De cualquier manera, el rendimiento es limitado y nunca se deben utilizar como método diagnóstico por sí mismos, pero sí proporcionan información complementaria solo.⁶

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de los biomarcadores sanguíneos empelados en sepsis

Biomarcador sanguíneo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Neutrófilos inmaduros/totales >0,16	92-96	71-95
Neutrófilos totales <1750/mm ³	77-96	61-68
Leucocitos totales ≤5000/mm ³ o >21000/mm ³	22-44	89-92
Neutrófilos degenerados	33-45	70-95
Recuento de plaquetas ≤150000/mm ³	22-70	88-99

Fuente: adaptación de la tabla “Valores de sensibilidad y especificidad de los datos anormales del hemograma para el diagnóstico de la sepsis neonatal tardía” de Ref 7

Las técnicas que se utilizan convencionalmente para el diagnóstico de sepsis son la espectrometría de masa (EM), la quimioluminiscencia (CLIA) y la electroquimioluminiscencia (ECLIA), basadas en la emisión radiomagnética producida por reacciones químicas; también por enzimoanálisis, de los que destaca el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA); el ensayo inmunofluorométrico (FIA) en el que una molécula fluorescente evidencia si hay reacción química; y nefelometría, que se basa en la medición de la radiación causada por partículas, y por último inmunoturbidimetría, basada en la pérdida de intensidad lumínica debido al fenómeno de dispersión.^{8, 22}

4.2.4 Combinaciones de marcadores

La combinación de dos o más indicadores de sepsis es la práctica más utilizada en la clínica, esto se debe a que no existe un único indicador específico de sepsis. Estas combinaciones aumentan siempre el valor predictivo de las pruebas.

CRP+PCT

Esta combinación de biomarcadores es la que más se utiliza para diagnosticar en un primer momento sepsis.

Un metaanálisis realizado en el año 2018 concluyó que la combinación de PCT y CRP mejora la capacidad de diagnóstico en comparación con ambos métodos por separado, con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 89%²³. Aunque esta combinación resulta útil en el diagnóstico, sigue teniendo varios problemas, entre ellos, la cantidad de muestra necesaria para el análisis, alta para neonatos.

nCD64 + SOFA

Un estudio reciente realizado por Yin et al.²⁴ concluyó que los parámetros nCD64 y el sistema SOFA se pueden utilizar como indicadores de sepsis, sin necesidad de usar más marcadores.

PCT + HLA-DRA

Esta combinación de métodos diagnósticos aumenta la sensibilidad al 80,2% en comparación con PCT de manera individual, pero mantiene la especificidad en el mismo valor. El estudio realizado por Almansa et al. muestra que el ratio de PCT/HLA-DRA, aunque permite distinguir la presencia de sepsis no indica la gravedad de la misma.

Para realizar esta cuantificación hay que medir la PCT del plasma sanguíneo, que normalmente se analiza mediante un inmunoensayo de ECLIA y la realización de la PCR para detectar la HLA-DRA.²⁵

CRP + IL-8

En un estudio realizado por Franz et al. (2004) se midieron las ventajas del uso de la combinación de los biomarcadores CRP e IL-8 como herramientas de detección de sepsis. Para medir la CRP se utilizó Nefelometría en heparina-litio utilizando como muestra el plasma o suero sanguíneo, por otra parte, para el análisis de la IL-8 se utilizaron 50 µL de plasma heparina-litio y se utilizó quimioluminiscencia. La sensibilidad y especificidad del uso de esta combinación fue del 80% y del 87% respectivamente.²⁶

CD64 + CRP + PCT + WBC

La combinación de todos estos biomarcadores estudiada por Yang et al.²⁷ mostró una muy alta sensibilidad del 95,45% y una especificidad del 70,43%, aumentando por lo tanto la sensibilidad en comparación de cada uno de los biomarcadores mencionados por separado. Para la cuantificación de dichos biomarcadores se utilizaron varias tecnologías de identificación como el Módulo E170 para Modular Analytics (de Roche) o BD FACSCanto (de BD Biosciences) entre otras. Por ello, aunque la sensibilidad de la combinación de CD64, CRP, PCT y WBC es muy alta, se necesita mucha instrumentación, además de que aumenta el tiempo de detección al tener que detectarse todos los biomarcadores de manera individual.

4.3 Nuevas alternativas diagnósticas

Los métodos de detección que más están siendo estudiados en los últimos años son aquellos que pueden ser tecnologías POCT (*point-of-care testing*, pruebas en el punto de cuidados o de asistencia). Estas nuevas opciones diagnósticas pretenden cubrir los problemas e inconvenientes que surgen en el uso del sistema SOFA, así como en los métodos actuales que no permiten cubrir varias de las premisas que debe cumplir una prueba de sepsis para ser considerado ideal.^{12, 28}

Las pruebas en el lugar de asistencia al paciente pueden definirse como aquellas magnitudes biológicas que se determinan fuera del laboratorio, en un entorno próximo al lugar de asistencia al paciente, y que son realizadas de forma manual, automática o semiautomática por personal ajeno al mismo. Se basan en la realización de un análisis biomolecular lo más rápido posible, esto se consigue en gran parte al ser portátiles, evitando así el continuo desplazamiento del paciente, así como del personal encargado. También se encargan de evaluar la eficacia de los tratamientos de manera periódica mediante una continua monitorización, y reducir el volumen y número de extracciones sanguíneas, al necesitar muestras del orden de microlitros. Otros de los objetivos administrativos y económicos son agilizar el proceso de consentimiento por escrito y reducir al máximo la cantidad de equipamiento necesario, siendo lo más básico y estándar posible; de esta manera, a largo plazo los POCT reducen costes.^{15, 29}

Esta técnica normalmente utiliza tecnologías microfluídicas, usando flujo lateral y/o tiras reactivas entre otras, combinándose en muchas ocasiones con la utilización de *smartphones* como dispositivos de lectura, de esta manera se detectan y analizan las concentraciones de los distintos biomarcadores, que serán proteínas y células humanas, e incluso podrían detectar directamente los microorganismos patógenos. La cantidad de muestra necesaria para la realización de este método puede ser tan baja como la obtenida con un simple pinchazo en el dedo (Figura 2).¹⁵

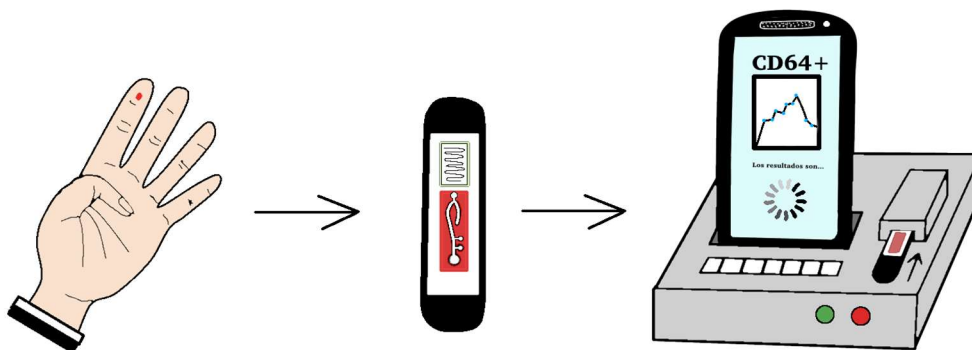


Figura 2. Procedimiento esquematizado del funcionamiento de las tecnologías POCT.
Fuente: elaboración propia

Además, en la actualidad se están estudiando y creando muchos sensores electroquímicos y ópticos, estos pueden ser fácilmente integrados en plataformas miniaturizadas al presentar las características necesarias como son la sencillez, rapidez, alta sensibilidad y la portabilidad. Así, el objetivo de muchas de estas nuevas estrategias de diagnóstico es llegar a ser tecnologías POCT.

4.3.1 Sensores electroquímicos y ópticos

Los sensores son dispositivos analíticos capaces de detectar especies químicas de una muestra. Constan de un transductor acoplado a una molécula de reconocimiento (donde se une la molécula diana al ser reconocida). El transductor será el responsable de transformar la información química en una forma de energía medible, posteriormente, esta energía será traducida en una señal analítica cuantificable.³⁰

4.3.1.1 Sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos son dispositivos que transforman la información electroquímica en una señal analítica, normalmente funcionan con tres electrodos, uno de análisis o de trabajo, otro de referencia y un contraelectrodo, estos permiten detectar los biomarcadores mediante reacciones químicas (normalmente redox). Los sensores electroquímicos más usados son los inmunosensores electroquímicos, estos se basan en el uso de anticuerpos o fracciones de anticuerpos y antígenos, que emiten una señal eléctrica en el caso de que se produzca la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Este tipo de sensores se ha convertido en la estrategia de detección de sepsis más estudiada y habitual, esto se debe a su reproductibilidad, su alta sensibilidad y especificidad, su alta fiabilidad, así como por su fácil integración en las plataformas POCT al ser sensores miniaturizados.^{28,31}

En 2015 Liu y Wang³² desarrollaron un inmunosensor electroquímico que utiliza nanopartículas de Au para detectar las moléculas de PCT de la sangre. El electrodo se sumerge en 100 μ l de muestra, éste se lava con PBS y a continuación se sumerge en una solución de Ac-PCT (anticuerpo de PCT) marcado con nanopartículas de oro modificado con ferroceno. Una vez captadas las moléculas de PCT se detectan con un equipo de análisis electroquímico específico.

Un estudio más actual publicado en 2019 y realizado por A.S. Tanak et al.³³ demuestra la sensibilidad y especificidad de un inmunosensor dual basado en el uso de un electrodo, capaz de identificar PCT y CRP en 10 μ l de una muestra de suero sanguíneo o de sangre total. En un primer momento se utiliza un inmunosensor que capta las moléculas de PCT y PCR,

seguidamente mediante la utilización de fluorofóros (molécula con un marcador fluorescente) y microscopía de fluorescencia se valida que se ha producido esta unión. La concentración de los biomarcadores se conocerá a través de la espectroscopía ATR-IR (que mide cambios que se producen en un haz de infrarrojos) y un análisis electroquímico basado en espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)ⁱⁱⁱ.

Otro de los dispositivos que se acercan a una tecnología POCT desarrollado en los últimos años es el de Min et al.³⁴, estudio publicado en el año 2018, en él muestran un chip con tecnología IBS (biosensor integrado de sepsis) que, mediante reacciones inmunomagnéticas captura el biomarcador diana IL-3, la muestra sanguínea necesaria es de 500 μ L. Posteriormente, un electrodo se encargará de detectar los niveles de IL-3 mediante una reacción enzimática redox, el tiempo total de análisis es <1 hora. Los resultados se pueden leer en dispositivos portátiles tal y como *smartphones*, incluso señalan el desarrollo de una *app* y la posibilidad de conectarse mediante *bluetooth*, facilitando la continua monitorización del paciente. Al comparar dicho IBS con el método ELISA se encontró que este chip cuenta con 10 veces más sensibilidad y 5 veces más rapidez que el método clásico. La sensibilidad y especificidad fue del 91.3% y 82.4% respectivamente.

Cabe destacar el estudio realizado por Molinero-Fernández et al.⁹, en él se utiliza un magnetoinmunsensor que en combinación con técnicas electroquímicas detecta y cuantifica los biomarcadores PCT y CRP en menos de 20 min y con un volumen de muestra de suero o plasma sanguíneo menor de 30 μ L. Como se muestra en la Figura 3, consiste en un sensor con 2 electrodos de trabajo, W1 y W2, que se encargarán de capturar magnéticamente el compuesto de CRP y PCT respectivamente. El compuesto mencionado estará formado por las moléculas diana unidas a sus respectivos anticuerpos, los conjugados con la enzima HRP (Anti-CRP y Anti-PCT) y los biotinizados (Anti-CRPb y Anti-PCTb), así como por las microesferas magnéticas, formando una estructura en sándwich. Gracias a su geometría y sus características magnéticas, disminuye el tiempo de ensayo y facilita la manipulación.

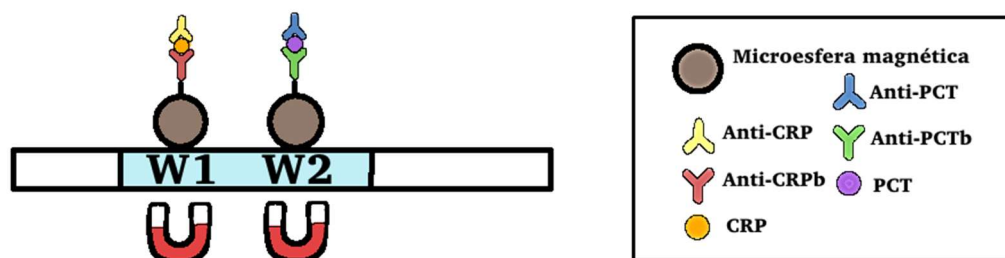


Figura 3. Representación esquemática del magnetoinmunsensor para detectar CRP y PCT.

Fuente: adaptación de la Ref 9

4.3.1.2 Sensores ópticos

Los sensores ópticos son otro tipo de método de detección de los biomarcadores de sepsis, con posible aplicación POCT, estos utilizan la luz y sus propiedades u otras ondas magnéticas para detectar la posible unión de una molécula diana al biosensor, si se produce la unión, se emite una señal luminosa que permite la cuantificación del biomarcador de interés, un ejemplo de esta señal es la fluorescencia. Los biosensores ópticos han demostrado una alta sensibilidad, así

ⁱⁱⁱEIS: se basa en el uso de una señal de corriente alterna que es aplicada a un electrodo y registrando la respuesta correspondiente, se utiliza para la caracterización electroquímica de las propiedades de los biomateriales, mide la resistencia de transferencia de carga. Fuente: Mendoza-Flores J et al. *Impedancia electroquímica*.

como una fácil reproductibilidad. En este caso también es común el uso de inmunosensores ópticos, por lo que, en este caso, si se forma el complejo antígeno-anticuerpo la señal será una señal óptica como un cambio de color o la emisión de fluorescencia, o un cambio en las propiedades ópticas, como puede ser el índice de refracción.³¹

En el año 2016 el grupo de Vashist et al.³⁵ desarrolló un inmunosensor óptico para detectar los niveles de PCT, la tecnología utilizada es la Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), mediante esta técnica al incidir un haz de luz se producen oscilaciones de los electrones libres de las superficies metálicas que permite detectar si existe unión antígeno-anticuerpo. Se comprobó que este método es más rápido (20 min), más barato, más estable, más simple y reproducible que el clásico método ELISA. La muestra en este caso es de 50 μ l de PCT.

Uno de los estudios más recientes, publicado en diciembre del año 2019 y realizado por Belushkin et al.³⁶, ha diseñado un dispositivo rápido, portátil y digital al que llamaron DENIS (*portable digital nanoparticle-enhanced plasmonic imager for rapid detection of inflammatory biomarkers*). Está basado en la tecnología SPR y LSPR, para la que se utilizan nanopartículas de oro (Au-NPs) para amplificar la señal que produce la reacción inmunológica en el caso de producirse, y una matriz o *array* plasmónico de oro que permite cuantificarla (Au-NHA). El sistema DENIS detecta los niveles en suero sanguíneo de los biomarcadores PCT y CRP, mediante la conjugación de estos con Au-NPs (Au-NPS con Ac-PCT2 o Ac-CRP2), unidos a la superficie de Au-NHA funcionalizada con anticuerpos complementarios (Ac-PCT1 o Ac-CRP-2). Como ventajas, este sensor permite la lectura óptica en un lector portátil, y evita el uso de fluorocromos y reactivos habituales, abaratando el coste de estas plataformas. Es capaz de cuantificar los niveles de PCT y PCR en una muestra de 20 μ l, y un tiempo reducido de 15 min.

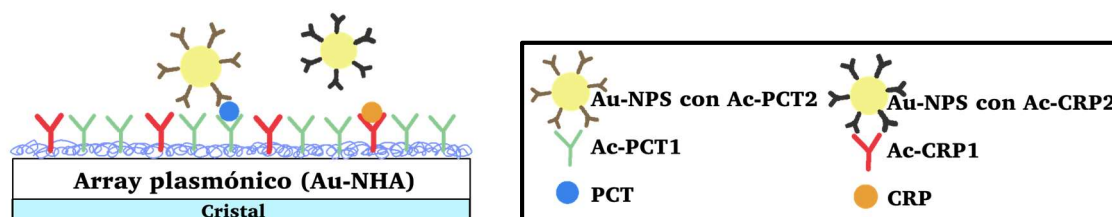


Figura 4. Bases del funcionamiento del sensor óptico DENIS, en este caso se muestra la unión para el biomarcador PCT (para el CRP el procedimiento es el mismo).

Fuente: adaptación de la Ref 36

El grupo de investigación de Molinero-Fernández et al.³⁷ ha publicado este año un sensor de sepsis en el que utilizan un inmunoensayo de fluorescencia basado en micromotores (FMIm) para detectar PCT. El método de detección de PCT es mediante un inmunoensayo de fluorescencia (FIA) basado en un micromotor^{iv}, necesita una cantidad de muestra muy baja (25 μ l) y un tiempo de análisis de muestra medio de 30 min. Los micromotores tienen ventajas destacables sobre las capacidades de detección del biomarcador, entre ellos el movimiento autónomo que genera los micromotores en la disolución, los propios motores se mueven a través de la muestra buscando el analito sin necesidad de agitación externa, mejorando así el reconocimiento de los biomarcadores. La cuantificación del biomarcador se lleva a cabo mediante el uso de un microscopio que mide la señal de fluorescencia. Este método puede suponer un avance muy prometedor por su potencial aplicación POCT.

^{iv} Micromotor: microdispositivos autopropulsados, que dotados de bioreceptores específicos son capaces de transportar "cargas" de una manera rápida y controlada. Fuente: *Boletín de la Sociedad Española de Química Analítica* N°63

Uno de los más prometedores estudios es el publicado en 2019, el grupo de investigación formado por Fabri-Faja et al.³⁸ ha diseñado un dispositivo POCT, un microarray que incorpora un biosensor interferométrico^v óptico que permite la detección de las moléculas de interés, que son en este caso dos proteínas, CRP y IL-6, y miRNA. El funcionamiento de este sistema se basa en que los biomarcadores presentes en la muestra se unen a su biomolécula de reconocimiento (que serán anticuerpos para las proteínas y hebras de DNA complementarias para el miRNA), una vez unidas, estos complejos son atravesados por 2 haces de luz polarizada, que mostrarán cambios en el caso de que exista unión de los marcadores diana a sus respectivas biomoléculas. Estos cambios crean un patrón interferométrico que se traducirá en un mapa OPD (diferencia de camino óptico). Este método es rápido, una vez incubada la muestra tarda tan solo 1 min en detectar de forma simultánea los indicadores mencionados. Este sensor puede ser una alternativa en un futuro, en este momento es una prueba de concepto en la que hay que profundizar sobre todo en la viabilidad con muestras reales.

4.3.2 Sistemas microfluídicos en chip

La microfluídica es la principal tecnología empleada en los POCT. Se tratan de dispositivos que forman parte de los llamados microlaboratorios o laboratorios en un chip (del inglés *lab on a chip*), éstos son capaces de realizar la detección y cuantificación del biomarcador de interés en un tamaño mínimo, mediante la utilización de nanotecnología, análisis que se llevaría a cabo de manera clásica en laboratorios rudimentarios.

La base de este método es la diferencia de comportamiento que tienen los fluidos a micro o nanoescala, los fluidos circularán a través de microcanales que permitirán la detección de los biomarcadores diana. Para ello se utilizan chips con sensores miniaturizados (del orden de 3 cm²) que permiten la separación y posterior cuantificación de las moléculas mediante el uso de muy bajas concentraciones de reactivos y de energía. La cuantificación de las señales se suele realizar de manera colorimétrica y se leerán en cualquier dispositivo compatible, que facilita la lectura de los resultados.¹⁵

En el año 2019, en un estudio realizado por LL.Sun et al.³⁹ se llevó a cabo un inmunosensor igualmente basado en la tecnología SPR pero esta vez localizada (que indica que el haz incide sobre nanoestructuras) y la emisión de puntos cuánticos (QD)^{vi}, lo que permite la identificación del complejo antígeno-anticuerpo en el caso de que se haya formado. El sensor se integra con un chip microfluídico, lo que permite que sea un sistema POCT y llevar a cabo la detección en la propia plataforma. Este chip permite la detección de PCT en 30 min y tiene una sensibilidad de 0.5 ng/ml, usando 50 µl de muestra.

Un estudio anterior, publicado en el año 2017, realizado por Hassan et al.⁴⁰ cuantificó la expresión del marcador antígeno CD64 de los neutrófilos utilizando un sistema microfluídico, la muestra necesaria para realizar esta prueba es de únicamente 10 µl de sangre, que se mide directamente en el biochip. Este sistema es uno de los pocos que cumple las premisas para ser un POCT. En la Figura 3 se esquematiza el funcionamiento del sistema, en primer lugar, se introduce la muestra de sangre en el reservorio del chip representado como **a** en el esquema; esta reaccionará con la solución tampón de la zona de entrada **b** (formada por ácido fórmico y saponina) que provocará la lisis de los eritrocitos preferentemente. El proceso de lisis se detiene

^v Interferometría: método basado en la medida de la diferencia de índices de refracción entre la especie a estudiar y una sustancia patrón con un interferómetro. *Fuente: JM Costa, Diccionario de química física*

^{vi} QD: cristales semiconductores con tamaño de unos pocos nanómetros, producen fluorescencia al ser excitados con una fuente de luz ultravioleta.

gracias a la solución de neutralización que se encontrará en **c**, consiguiendo un medio isotónico. Las células CD64+ serán capturadas en la zona de depleción y posteriormente cuantificadas según su tamaño mediante un contador eléctrico.

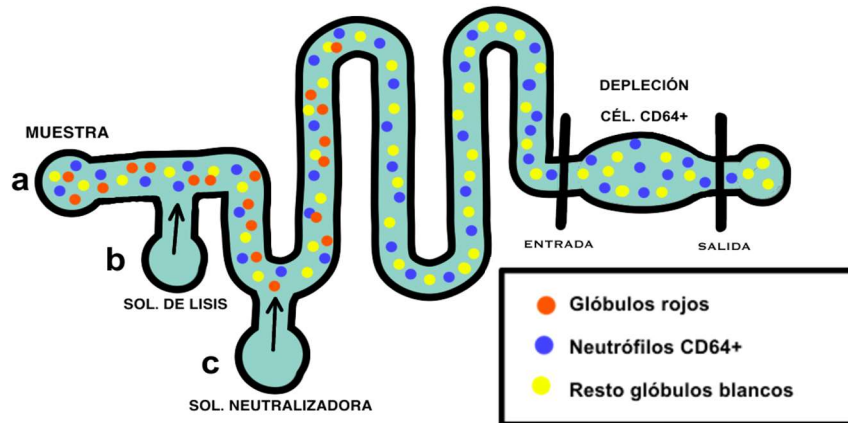


Figura 5. Esquema del proceso de cuantificación del sistema microfluídico realizado por Hassan et al.
Fuente: adaptación de la Ref 40

Una de las últimas plataformas microfluídicas desarrolladas es la realizada por el grupo de investigación formado por Berger J, Valera E et al.⁴¹ en el año 2020. Este biochip detecta por medio de métodos electroquímicos e inmunoensayos, en una base microfluídica, los biomarcadores IL-6 y PCT de manera simultánea. En un principio necesita una muestra de 10 µl de plasma sanguíneo, esta plataforma se encuentra en desarrollo todavía y aún debe evaluarse su eficacia clínica.

En el ámbito del diagnóstico molecular, se ha diseñado una plataforma microfluídica llamada U-dHRM, su nombre se debe a que integra la técnica de fusión de alta resolución (HRM) con una PCR digital universal (d-PCR), de esta manera se detecta y genotipa el DNA bacteriano. Su funcionamiento se encuentra esquematizado en la Figura 4, se introduce la muestra en el chip microfluídico, esta es separada en los distintos genomas patógenos, realizándose una PCR en cada una de las divisiones, siendo la diana de amplificación el gen 16s del rRNA. Una vez terminada la PCR, cada una de las divisiones se calienta y emite una imagen fluorescente.

Finalmente se genera una curva de fusión que identifica los agentes patógenos. Este método, todavía en estudio, pretende contar con tecnología POCT, para ello la amplificación con PCR se realiza en la propia plataforma, evitando de esta manera los clásicos equipos caros y voluminosos de PCR. Permite la identificación de los microorganismos patógenos a partir de una muestra de <1 ml de sangre en un tiempo menor de 4 horas. Actualmente tiene la capacidad de identificar hasta 37 bacterias, se pretende ampliar el repertorio además de incluir la identificación de especies de hongos y de virus, permite la identificación de infecciones polimicrobianas y en el futuro podrá añadirse la detección de resistencias.¹²

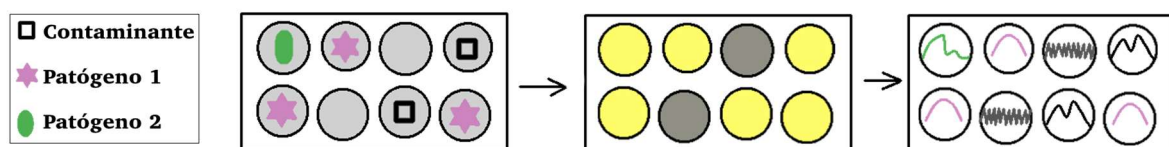


Figura 6. Esquema del funcionamiento del método U-dHRM. Por orden se encuentra representada la digitalización y amplificación por PCR, el calentamiento e imagen fluorescentes de cada muestra y la identificación de los patógenos por curvas de fusión

Fuente: adaptado de la Ref 12

4.4 Comparación de los principales métodos de detección

Método	Indicador	Tiempo	Muestra	Ventajas	Inconvenientes	Ref
Hemocultivo clásico	Cultivo positivo	48 h-5 días	S a n g r e 20-30 ml (adultos), 2-10 ml (niños)	Detección y cuantificación del agente patógeno Alta fiabilidad	Método lento Necesidad de grandes volúmenes Sensibilidad de la prueba proporcional al volumen de muestra	10
Hemocultivo automatizado		8-70 h	8-10 ml (adultos), 1-3 ml (niños)			
SeptiFast® (PCR)	DNA patógeno	6 h	Sangre 1,5 ml	Detección cuantitativa de patógenos Detección de genes resistentes Microorganismos de difícil incubación	Falsos negativos según el volumen de muestra Requiere equipos caros Patógeno no encontrado en la base de datos	11, 12
qSOFA	Escala de coma Glasgow, PA y FR	Min	Signos vitales	Mayor rapidez Permite un primer cribado Pronóstica	Sobrediagnóstico Muy inespecífico, debe existir sospecha de sepsis	42
CLIA	PCT	1 h	Plasma/suero 3-5 ml	Especificidad moderada-alta Detección cuantitativa rápida Pronóstica	Aumento con procesos no infecciosos Falsos negativos	18, 22
Inmunoturbidimetría y CLIA	PCT+CRP	1 h	Sangre 3-10 ml	Precisión y sensibilidad alta Detección cuantitativa rápida Pronóstica	Gran volumen de muestra Necesidad de equipamiento	22, 23
Sensor electroquímico	PCT+CRP	<20 min	Suero/plasma 30 µl	Alta sensibilidad y precisión Bajo volumen de muestra Detección cuantitativa rápida Barato y fácil de usar	No evita el tratamiento “a ciegas”	9
Sensor óptico	IL-6, CRP y miRNA	<1 min	Sangre incubada 10 µl	Identifica al microorganismo Posible futuro POCT	La muestra necesita incubación previa En estudio, no se han utilizado muestras reales	38
Sistema microfluídico	nCD64	30 min	Sangre 10 µl	POCT Pronóstica	Falta perfeccionamiento y estudios No evita el tratamiento inespecífico	40
Sistema microfluídico	DNA patógeno	<4 h	Sangre 1 ml	Detecta resistencias Identifica al microorganismo POCT	En estudios de validación	12

Notas. Las ventajas de las tecnologías POCT son, necesitan muy bajo volumen de muestra, portátiles, permiten monitorización, baratos. Con el inconveniente “No evita el tratamiento a ciegas” se refiere a que no identifica al agente patógeno por lo que se administra tratamiento sin saber cuál es el más adecuado según la etiología de la sepsis.

Fuente. Elaboración propia a partir de los datos de las Referencias indicadas

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La detección de sepsis en los estadios iniciales de la enfermedad es de vital importancia, ya que de esta manera se favorece la supervivencia de los pacientes. Los métodos convencionales de detección de sepsis, si bien muchos poseen una sensibilidad y fiabilidad alta, no resultan suficientes como método de diagnóstico, debido principalmente a que necesitan largo tiempo de análisis y/o altas cantidades de muestra de las que a veces es imposible disponer por las características tan especiales de los pacientes.

Es por ello por lo que se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico de sepsis que incorporan nanotecnología, estos tienen como ventajas que son más rápidos, sencillos y más específicos, además necesitan bajo volumen de muestra, premisa transcendental teniendo en cuenta los grupos de riesgo que son más susceptibles de padecer la enfermedad.

La mayoría de los estudios actuales se centran en desarrollar plataformas POCT. Estos son los dispositivos más prometedores en el avance de los métodos de detección de sepsis, principalmente porque cumplen todas, sino la mayoría, de las características necesarias para convertirse en tests ideales. Entre las ventajas más destacables de estos dispositivos con respecto al resto, destaca la reducción de infraestructura necesaria y la posible monitorización continua del paciente, características que se consiguen al ser dispositivos portátiles y de baja cantidad de muestra.

Los estudios más remarcables, teniendo en cuenta ventajas, inconvenientes y aplicación clínica, son el sistema microfluídico POCT que detecta nCD64 de Hassan et al. y el magnetoinmosensores de Molinero-Fernández et al. que consigue detectar CRP y PCT a niveles altos de sensibilidad y especificidad. Dichos métodos son revolucionarios para monitorizar el tratamiento inespecífico en los inicios del desarrollo de sepsis, es decir, mientras se realiza el cultivo sanguíneo, permiten evaluar de manera continua si la medicación administrada está siendo efectiva en el paciente.

Dentro de las tecnologías POCT, las que incorporan diagnóstico molecular son las más completas, ya que permiten identificar el agente patógeno y detectar resistencias, diferenciándose del cultivo sanguíneo en el escaso tiempo y volumen de muestra necesario. En el futuro estos sistemas podrían sustituir al actual *gold standard*, mejorando el pronóstico y supervivencia de los pacientes con sepsis. Remarcar por lo tanto los dispositivos creados por Fabri-Faja et al. con el sensor óptico que detecta CRP, IL-6 y miRNA, así como la plataforma microfluídica U-dHRM que detecta y genotipa el DNA bacteriano.

6 BIBLIOGRAFÍA

¹ Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). JAMA [Internet]. 2016; 315(8), 801–810. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

² Carrillo, Esper, Raúl. Sepsis. Editorial Alfil, S. A. de C. V.; 2008

³ Wiersinga, W. J., & Seymour, C. W. (Eds.). Handbook of Sepsis, Springer International Publishing AG, 2018

⁴ Vincent JL, Rello J, Marshall J et al. For the EPIC II group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in care units. JAMA [Internet]. 2009; 302(21):2323-29

⁵ Iñigo J., Sendra J.M., Díaz R., Bouza C., Sarría-Santamera A. Epidemiology and costs of severe sepsis in Madrid: A hospital discharge study. Med. Intensiva [Internet]. 2006; 30 (5): 197-203. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912006000500001&lng=es

⁶ Prescott, Angus. Enhancing Recovery From Sepsis. JAMA [Internet]. 2018; 319(1), 62

⁷ Leante Castellanos JL, Martínez Gimeno A(dir), Cidrás Pidrè (dir). Evaluación del Gradiente Térmico como Signo Diagnóstico de la Sepsis Neonatal Tardía [Tesis doctoral] Universidad de Murcia, 2016

⁸ Coelho, F. R., & Martins, J. O. Diagnostic methods in sepsis: The need of speed. Revista Da Associação Médica Brasileira. 2012; 58(4), 498–504.

⁹ Diagnosis of Late-Onset Sepsis in Preterm Neonates: Dual Magnetoimmunosensor for Simultaneous Procalcitonin and C-Reactive Protein Determination in Diagnosed Clinical Samples. ACS Sens [Internet]. 2019, 4, 2117–2123.

¹⁰ Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017. Cap 62

¹¹ Jordana-Lluch E. Detect BSI e quickly and pathogens with methods: pipe dream, reality or future? University of Nottingham: Centre for Biomolecular Sciences [Internet] Disponible en: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=52792

¹² Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley I. Towards Detection Directly From Whole Blood: Current and Emerging Technologies for Rapid Diagnosis of Microbial Infections. Without. [Internet] 2018;1–26.

¹³ Bolaños Muñoz Mauricio, Barrantes Valverde Edith. Detección de hemocultivos positivos por el de Dios. Rev. costarric. cienc. méd [Internet]. 1998 junio; 19 (1-2): 29-36.

¹⁴ Rodríguez Domínguez M, Franco Álvarez de Luna F, Goyanes Galán MJ, García Rodríguez J. Diagnóstico microbiológico en el lugar de asistencia al paciente. 2019. 66. Mario Rodríguez Domínguez (coord). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (edits). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019. Cap 66

¹⁵ Oeschger T, McCloskey D, Koppaarth V, Singh A, Erickson D. Point of care technologies for sepsis diagnosis and treatment. Lab Chip [Internet]. 2019 Feb 26;19(5):728-737.

¹⁶ Cajander S, Bäckman A, Tina E et al. Preliminary results in quantitation of HLA-DRA by real-time PCR: a promising approach to identify immunosuppression in sepsis. Critical care [Internet]. 2013; 17: R22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4057202/pdf/cc13046.pdf>

¹⁷ Guillen Eva. Nueva definición de sepsis. Biomarcadores de infección/sepsis. Catlab, [Internet]. 2017; 81, 1–10. Disponible en: https://www.catlab.cat/uploads/20170607/CI_81_Sepsis.pdf

¹⁸ Gilfillan M, Bhandari V. Neonatal sepsis biomarkers: where are we now? Research and Reports in Neonatology. 2019;9:9-20. <https://doi.org/10.2147/RRN.S163082>

¹⁹ Jasso-Contreras, G. et al. 2015. Niveles de lactato como Predictor de mortalidad en pacientes con choque séptico. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. [Internet]. 2015;53(3):316-21.

²⁰ Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González Del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet] 2014;32(3):177–90.

²¹ Cid, J., Aguinaco, R., Sánchez, R., García-Pardo, G., & Llorente, A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. Journal of Infection, [Internet]. 2012; 60(5), 313–319. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.02.013>

²² Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. Laboratorio de análisis clínicos Hospital Universitario Río Hortega. Catálogo de pruebas diagnósticas. Sacyl [Internet], 2018. Disponible en: https://www.saludcastillayleon.es/HRHortega/es/carera-servicios/analisis-clinicos.ficheros/1279264-2019_CARTERA

²³ Ruan L, Chen GY, Liu Z, et al. The combination of procalcitonin and C-reactive protein or presepsin alone improves the accuracy of diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis and systematic review. Crit Care. [Internet]. 2018;22(1):316. 2018.

²⁴ Yin WP, Li JB, Zheng XF, An L, Shao H, Li CS. (2020) Effect of neutrophil CD64 for diagnosing sepsis in emergency department. World J Emerg Med. [Internet] 2020;11(2):79–86.

- ²⁵ Almansa, R., Martín, S. et al. Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Scientific Reports*, [Internet]. 2018; 8(1), 1–9
- ²⁶ Franz, A. R., Bauer, K. et al. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: A multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics*, [Internet]. 2004; 114(1), 1–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1542/peds.114.1.1>
- ²⁷ Yang, A. P., Liu, J., Yue, L. H., Wang, H. Q., Yang, W. J., & Yang, G. H. Neutrophil CD64 combined with PCT, CRP and WBC improves the sensitivity for the early diagnosis of neonatal sepsis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, [Internet]. 2016; 54(2), 345–351. Disponible en: <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0277>
- ²⁸ Kumar S, Tripathy S, Jyoti A, Singh SG. Recent advances in biosensors for diagnosis and detection of sepsis: A comprehensive review. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2019;124–125:205–15. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.034>
- ²⁹ Oliver Sáez P, et al. Guía sobre las pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia al paciente (POCT). *Rev Lab Clin*. [Internet]. 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.labcli.2016.03.003>
- ³⁰ Escalona, Luís, Manganiello, Lisbeth, López-Fonseca, Martha, Vega, Cristóbal. Los sensores químicos y su utilidad en el control de gases contaminantes. *Revista INGENIERÍA UC* [Internet]. 2012;19(1):74-88. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70732261010>
- ³¹ Ybarra, Gabriel. Capítulo 9: Inmunosensores. En: Alvarez Vallina L, González Fernández, A et al., editores. *Inmunotecnología y sus aplicaciones*. España: Ediuno; 2018. p. 149-158. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/335679691_Capitulo_9_de_Inmunotecnologia_y_sus_aplicaciones_Edicion_de_la_Universidad_de_Oviedo_ISBN_978-84-16343-73-7
- ³² Liu A, Wang X. Amperometric Immunosensor of Procalcitonin Based on Amplification Strategy of Ferrocene-Modified Gold nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.* [Internet]. 2015; 10:9342–50. Disponible en: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol10/101109342.pdf>
- ³³ Tanak AS, Jagannath B, Tamrakar Y, Muthukumar S, Prasad S. Non-faradaic electrochemical impedimetric profiling of procalcitonin and C-reactive protein as a dual marker biosensor for early sepsis detection. *Anal Chim Acta X* [Internet]. 2019; 3:100029. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.acax.2019.100029>
- ³⁴ Min, J., Nothing, M. et al. Integrated Biosensor for Rapid and Point-of-Care Sepsis Diagnosis. *ACS nano*, [Internet]. 2018; 12(4), 3378–3384. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08965>
- ³⁵ Kumar S, Schneider EM, Barth E, Luong JHT. Analytica Chimica Acta Surface plasmon resonance-based immunoassay for procalcitonin. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2016; 938:129–36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.007>
- ³⁶ Belushkin A, Yesilkoy F, González-López JJ, Ruiz-Rodríguez JC, Ferrer R, Fàbrega A, et al. Rapid and Digital Detection of Inflammatory Biomarkers Enabled by a Novel Portable Nanoplasmonic Imager. *Small*. [Internet]. 2020;16(3). Disponible en: <https://doi.org/10.1002/smll.201906108>
- ³⁷ Molinero-Fernández A, Moreno-Guzmán M, Arruza L, López MA, Escarpa. Polymer-Based Micromotor Fluorescence Immunoassay for On-the-Move Sensitive Procalcitonin Determination in Very Low Birth Weight Infants' Plasma. *ACS Sensors*. 2020; 5 (5), 1336-1344
- ³⁸ Fabri-Faja N, Calvo-Lozano O, Dey P, Terborg RA, Estevez MC, Belushkin A, et al. Early sepsis diagnosis via protein and miRNA biomarkers using a novel point-of-care photonic biosensor. *Anal Chim Acta*. 2019; 1077:232–42.
- ³⁹ Ling L, Sin Y, Zhou X, Ng W, It T, Deng J. Materials Science for Energy Technologies Localized surface plasmon resonance-based point-of-care system for sepsis diagnosis. *Mater Sci Energy Technol* [Internet]. 2020 ;3:274–281. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.10.007>
- ⁴⁰ Hassan U, Ghonge T, Reddy B, Patel M, Rappleye M, Taneja I, et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat Commun* [Internet]. 2017 ;8 :1–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15949>
- ⁴¹ Berger J, Valera E, Jankelow A, Garcia C, Akhand M, Heredia J, et al. Simultaneous electrical detection of IL-6 and PCT using a microfluidic biochip platform. *Biomed Microdevices*. [Internet]. 2020;22(2).
- ⁴² Ballester Joya LA, Yébenes Reyes JC (dir), Capdevila Morell (dir). Impacto de la forma de presentación de la sepsis grave extrahospitalaria. Implicaciones en la detección, manejo terapéutico y evolución clínica. [Tesis doctoral] [Barcelona]. Universitat Autònoma de Barcelona, 2018