Estudio de marcadores inmunotromboticos para el diagnóstico de infección protésica

Proyecto de final de carrera

Autor:

María Teresa Enrique Benedito

Dirigido por:

Dra. Pilar Medina Badenes (Instituto de investigación la Fe, Valencia)

Dra. Gemma Beltrán Casellas (Departamento de Bioquímica y Biotecnología, URV)

Biotecnología

Universitat Rovira i Virgili

Facultad de Enología

Tarragona, junio 2019

Este proyecto de final de carrera ha sido desarrollado durante el periodo de Prácticas Externas en el Instituto de investigación la Fe en Valencia, bajo la dirección de la Dra. Pilar Medina Badenes y la Dra. Gemma Beltrán Casellas.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a la Dra. Pilar Medina Badenes por enseñarme, guiarme y aconsejarme a lo largo de este estudio. Además, de darme la oportunidad de realizar las prácticas en el Grupo Acreditado de Investigación en Hemostasia, Trombosis Arteriosclerosis y Biología Vascular del Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital La Fe en Valencia. Asimismo, me gustaría agradecer a todos los integrantes del laboratorio: Dr. Francisco España Furió, Julia Oto Martínez, María José Solmoirago, Dra. Emma Plana Andani, Raquel Herranz Gómez, Álvaro Fernández Pardo y Marina Yelo Sáez.

Igualmente, a la Dra. Gemma Beltrán Casellas del Departamento de Bioquímica y Biotecnología por su revisión y correcciones del trabajo. Por último, me gustaría agradecer a Paula Calvo López-Davalos y Beatriz Lorenzo López-Cortón por estar conmigo en cada paso que he dado y su soporte durante este proceso.

Abreviaturas

CMBD: Conjunto mínimo básico de datos

EPS: Sustancias poliméricas extracelulares

ETP: Potencial endógeno de trombina

IL-6: Interleuquina-6

LT: tiempo de latencia

min: minuto

ml: mililitro

NETs: *Neutrophil extracellular traps*

ng: nanogramo

nM: nanomolar

pg: picogramo

PK: Altura máxima del pico

RACat: Registre d´Artroplàsties de Catalunya

RT: Temperatura ambiente

TGT: Test de generación de trombina

ttPeak: Tiempo al pico

Vellndex: Velocidad de generación de trombina o pendiente de la curva

1. Índice

1. Índice..... 5

2. Resumen..... 6

3. Palabras clave..... 6

4. Introducción..... 7

4.1. Definición..... 7

4.2. Importancia de las infecciones..... 8

4.3. Patogenia..... 12

4.4. Respuesta de los neutrófilos ante una infección protésica..... 13

4.5. Test de generación de trombina..... 14

5. Hipótesis..... 14

6. Objetivos..... 15

7. Materiales y métodos..... 15

7.1. Sujetos estudiados..... 15

7.2. Extracción y conservación de las muestras de plasma..... 16

7.3. Cuantificación de los marcadores de NETs..... 16

7.4. Cuantificación de la respuesta inflamatoria de los marcadores de neutrófilos..... 17

7.5. Test de generación de trombina..... 18

7.6. Análisis estadístico..... 19

8. Resultados..... 19

9. Discusión..... 26

10. Conclusión..... 27

11. Referencias..... 28

12. Autoevaluación..... 30

13. Anexos..... 30

2. Resumen

La infección protésica es una complicación que involucra cirugía de reemplazamiento, daño del tejido, degradación del hueso y un incremento asociado a costes médicos y de cuidados del paciente. Actualmente, no hay ningún método diagnóstico que ofrezca una sensibilidad y especificidad del 100% en todos los casos de infección protésica. Surge pues, la necesidad de buscar nuevos biomarcadores que permitan una efectiva y rápida identificación de la subpoblación de pacientes con infección protésica a fin de poder dirigir un tratamiento rápido y eficaz, además, de poder seguir la evolución para así, poder personalizar el manejo de cada paciente de forma temprana.

Los neutrófilos son la primera línea de defensa contra una infección bacteriana. Los *neutrophil extracelular traps* (NETs) son redes extracelulares de DNA, histonas y proteínas de los gránulos que liberan los neutrófilos en respuesta ante un estímulo inflamatorio o ante la presencia de patógenos. Además, ante estos estímulos inflamatorios o infecciosos, los neutrófilos liberan alfa-defensina la cual presenta funciones microbicidas, quimiotácticas y citotóxicas.

En este estudio evaluamos el potencial diagnóstico y pronóstico de los NETs, del test de generación de trombina, de las alfas-defensinas de los neutrófilos y de la interleuquina proinflamatoria (IL-6) en las infecciones protésicas.

3. Palabras clave

Infección protésica, NETs, test de generación de trombina, alfa-defensina, interleuquina-6.

4. Introducción

4.1. Definición

El implante de prótesis articulares ha supuesto un gran avance sanitario en las últimas décadas. Las prótesis constituyen un método eficaz para mejorar el dolor y la movilidad articular en pacientes con patología articular crónica. Por otra parte, las prótesis también son utilizadas como tratamiento ante algunos tipos de fractura como podría ser la fractura subcapital de fémur (Franco Arenaz, 2017).

La *Musculoskeletal Infection Society* (MSIS) convocó en 2011 un grupo de trabajo donde se definieron los criterios clínicos para el diagnóstico de infección de prótesis articular (Parvizi, J., Zmistowski, B, et al, 2011) (anexo 1). En agosto de 2013, se celebró la primera *International Consensus Meeting on periprosthetic joint infection*, está acepto la definición de la MSIS cambiando solamente un criterio mayor, la esterasa leucocitaria, que paso a ser menor. En octubre de 2018 se realizó la segunda *International Consensus Meeting on periprosthetic joint infection* (Parvizi, J., Tan, T. et al, 2018) (anexo 2).

Así, la definición de infección protésica según la *International Consensus Meeting on periprosthetic joint infection* de 2013 se realiza cuando se cumplen los siguientes criterios:

1. Dos cultivos periprotésicos positivos con organismos fenotípicamente idénticos.
2. Un tracto sinusal que se comunica con la articulación.
3. Tres de los siguientes criterios menores:
    1. Elevada proteína C reactiva sérica (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG).
    2. Elevado recuento de glóbulos blancos en líquido sinovial (WBC) o cambios en la tira reactiva de esterasa leucocitaria.
    3. Elevado porcentaje de neutrófilos polimorfonucleares en líquido sinovial (PMN).

4. Análisis histológico positivo de tejido periprotésico.

5. Un solo cultivo positivo.

Cuando no se llegan a cumplir todos los criterios diagnósticos de infección protésica, el diagnóstico es dudoso, lo cual dificulta el manejo del paciente. Ello viene agravado por el hecho de que ningún método diagnóstico disponible tiene una sensibilidad y especificidad del 100% (Stone et al, 2019).

4.2. Importancia de las infecciones

La infección de prótesis articular supone actualmente un problema de primera magnitud en la salud pública de la mayoría de países desarrollados. La implantación de una prótesis de cadera, rodilla y, en menor medida, de hombro y otras articulaciones son un hecho habitual en los hospitales de España donde la infección es la principal complicación (Ariza, J. et al, 2008).

En 2010 en Estados Unidos se implantaron un total de 332.000 prótesis de cadera y 719.000 de rodilla. Se prevé que en 2030 este número ascienda a 572.000 y 3.48 millones, respectivamente. En España no existe un registro de artroplastias implantadas, sin embargo, según el conjunto mínimo básico de datos (CMBD) que extrae los datos a partir de los informes de altas de los hospitales del Sistema Nacional de Salud, en 2015 se colocaron en España 25.496 prótesis de cadera y 42.401 de rodilla.

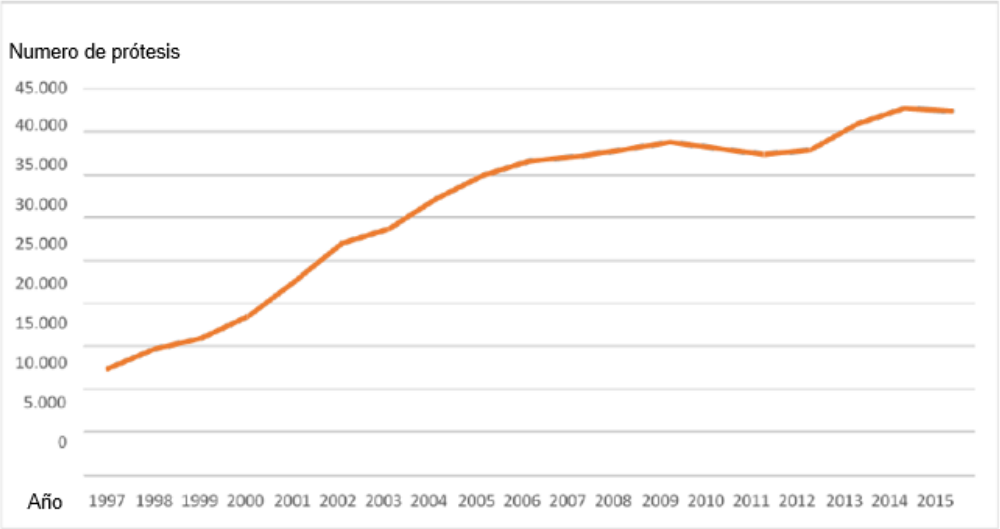


Figura 1. Prótesis totales de rodilla implantadas en España durante el periodo 1997-2015.

Fuente: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto de Información Sanitaria.

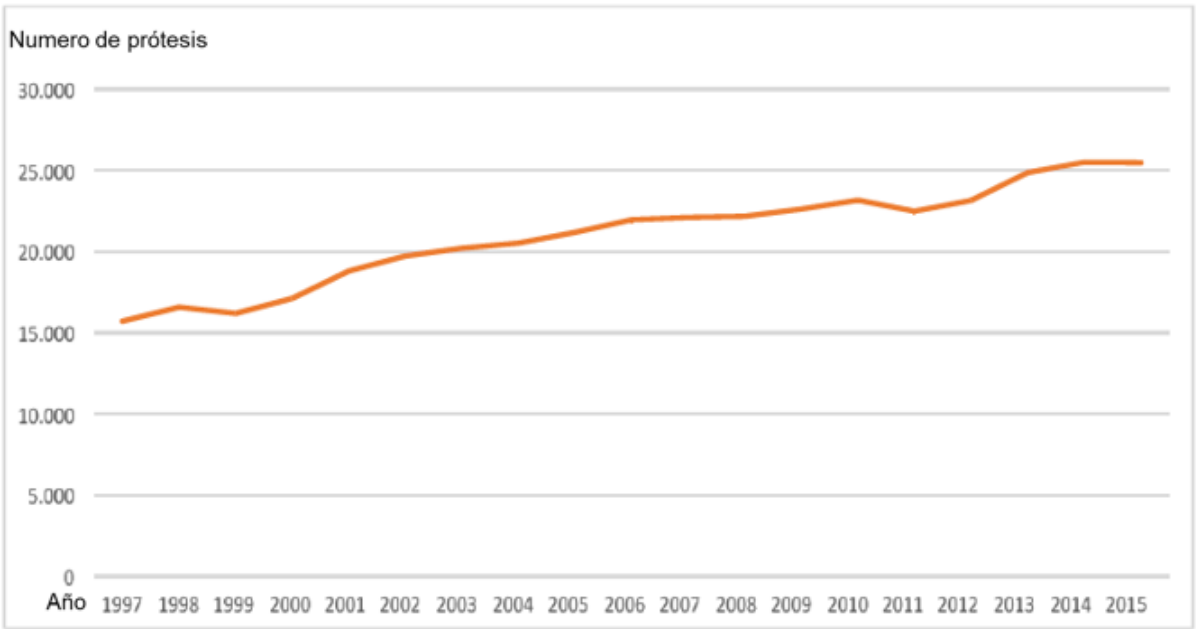
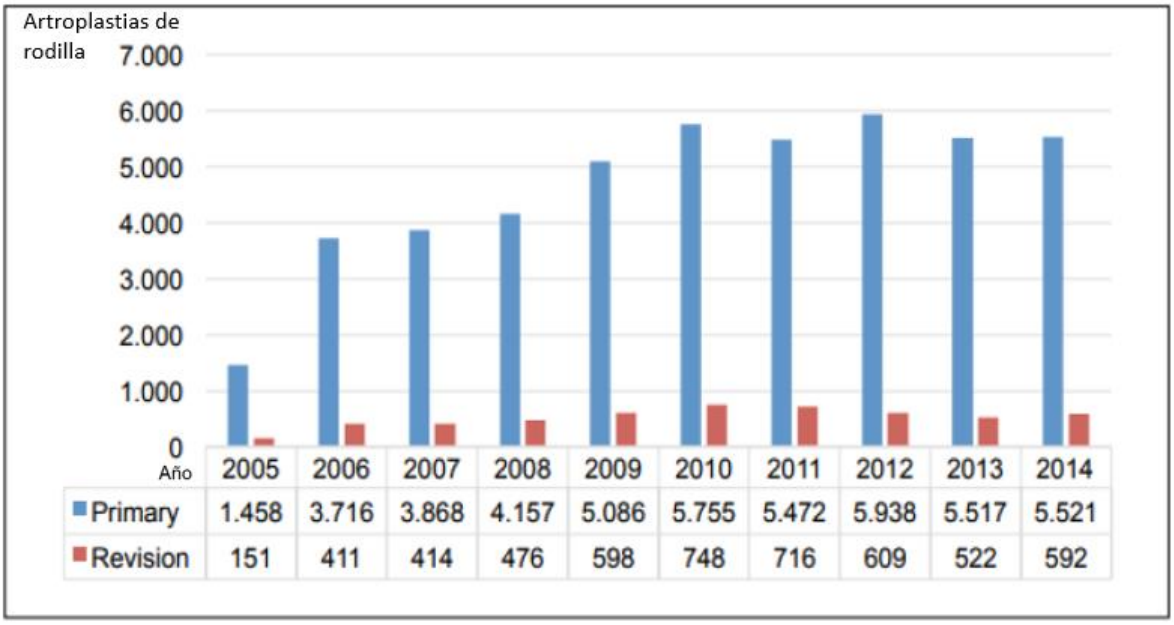


Figura 2. Prótesis totales de cadera implantadas en España durante el periodo 1997-2015.

Fuente: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto de Información Sanitaria.

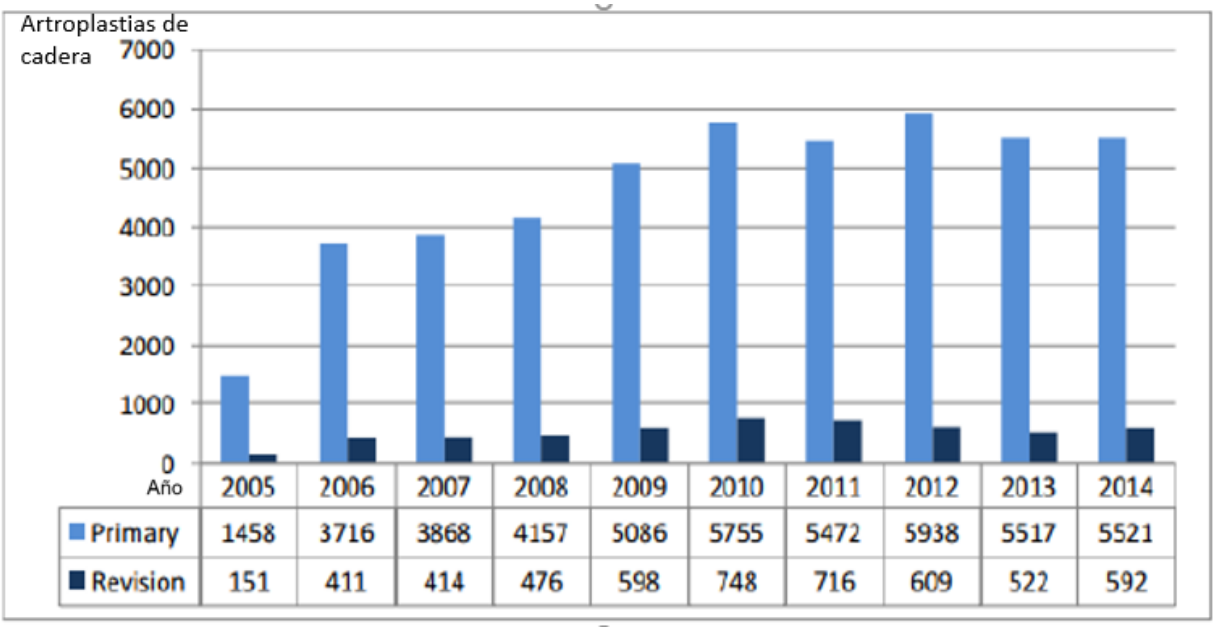
Según el Registre d´Artroplàsties de Catalunya (RACat), durante el periodo de 2005-2014, en Cataluña se realizaron 46.488 artroplastias primarias de cadera y 5.237 de revisión, 33.639 artroplastias primarias de rodilla y 6.689 de revisión, Este registro muestra un aumento de procedimientos realizados en el último año. El RACat es un registro voluntario en el cual participo un 85% de la actividad del sector público en Cataluña durante el periodo 2005-2014.



Año	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Primary	1.458	3.716	3.868	4.157	5.086	5.755	5.472	5.938	5.517	5.521
Revision	151	411	414	476	598	748	716	609	522	592

Figura 3. Artroplastias de rodilla (primarias y de revisión) realizadas en Cataluña durante el periodo 2005-2014.

Fuente: RACat. Tercer informe (2005-2014). Agencia de Calidad y Evaluación Sanitaria de Cataluña.



Año	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Primary	1458	3716	3868	4157	5086	5755	5472	5938	5517	5521
Revision	151	411	414	476	598	748	716	609	522	592

Figura 4. Artroplastias de cadera en Cataluña en el periodo 2005-2014 (primarias y de revisión)

Fuente: RACat. Tercer informe (2005-2014). Agencia de Calidad y Evaluación Sanitaria de Cataluña.

Las infecciones asociadas a un procedimiento quirúrgico y, en particular, las infecciones protésicas, constituyen una situación devastadora para el paciente y comportan un gasto sanitario muy elevado. Los costes del tratamiento de una prótesis infectada incluyen (Franco Arenaz, 2017):

- Costes directos:
    - Intrahospitalarios: tratamiento quirúrgico, antibioterapia…
    - Extrahospitalarios: visitas al ambulatorio de control y seguimiento, farmacia…
- Costes indirectos: descenso de la productividad, absentismo laboral…

El coste medio del tratamiento de una infección protésica asciende a 23.583 euros. La infección comporta una gran morbilidad y también una mortalidad entre el 2 y 7% en pacientes mayores de 80 años. El riesgo de infección protésica viene dado por la tasa de incidencia de prótesis-año. El riesgo de tener una colonización hematógena o desarrollar una infección posquirúrgica de aparición tardía persiste a lo largo de la vida de la prótesis. Esta tasa es de 5,9 por cada 1000 prótesis/año durante los

primeros dos años tras el implante y de 2,3 por cada 1000 prótesis/año durante los siguientes 8 años (Ariza, J. et al, 2008).

4.3. Patogenia

Las infecciones protésicas son fruto de una interacción entre el huésped, los microorganismos y el biomaterial protésico.

Según la composición y propiedades del material protésico, éste puede facilitar en mayor o menor medida la implantación de microorganismos incluso por aquellos de baja virulencia. Una vez estos microorganismos se han adherido al implante, se inicia la formación de una biocapa, conocida como biofilm, que se forma con notable rapidez, considerándose madura en 7 días. Las bacterias quedan aglutinadas por un polisacárido bacteriano llamado "*slime*". El biofilm se encuentra rodeado de una matriz mucilaginosa, producida por los propios microorganismos, que consiste en un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que conforman el soporte para la estructura tridimensional del biofilm.

En las capas más profundas del biofilm encontramos una menor concentración de nutrientes, oxígeno y una caída del pH, en el que las bacterias se encuentran en fase estacionaria. Estas bacterias se exponen a una concentración mínima de antibióticos y, por tanto, son más resistentes a la acción de los mismos. La respuesta microbiana deficiente en estas infecciones se debe, entre otras cosas, a una función fagocitaria alterada en las inmediaciones del cuerpo extraño y la presencia de bacterias intracelulares.

Las bacterias de la superficie recuperan su estado planctónico o de libre flotación por desprendimiento y son las que producen los síntomas, sin embargo, son más sensibles a los antibióticos. (Ariza, J. et al, 2008; Franco Arenaz, 2017).

En la mayoría de casos la prótesis se expone a los microorganismos en el mismo quirófano o en el postoperatorio. Aunque, esta infección puede manifestarse mucho tiempo después. El 75% de los casos, la infección es causada por cocos grampositivos, el 10-15% estaría causada por enterobacterias y *Pseudomas aeruginosa*, el 10-15% por *Streptococcus* y *Enterococcus faecalis* y menos del 5%

por bacterias anaerobias *Propionibacterium acnes*. En muchas ocasiones, las infecciones protésicas son infecciones polimicrobianas.

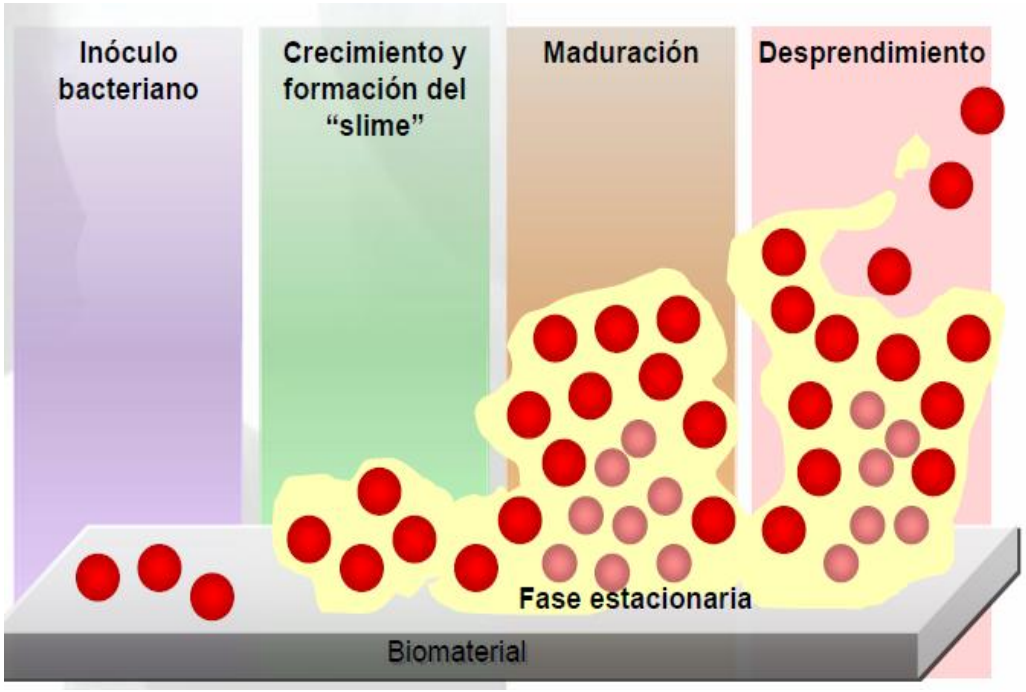


Figura 5. Patogenia: Biocapas bacterianas

4.4. Respuesta de los neutrófilos ante una infección protésica

Los neutrófilos son considerados la primera línea de defensa contra las infecciones bacterianas. Para la correcta activación de los neutrófilos, éstos necesitan reconocer su diana. Las bacterias en estado planctónico serán destruídas por medio de opsonización. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de respuesta específico ante los biofilms bacterianos. Se ha visto que en presencia de biofilms infectados por *S. aureus* o *S. epidermidis*, los neutrófilos actúan en ausencia de anticuerpos o de proteínas de complemento. Además, la fagocitación de estos biofilms no requiere opsonización.

Se ha descrito que los neutrófilos pueden activarse con las EPS del biofilm, como el ácido lipoteicoico, el peptidoglicano y la proteína de shock térmico GroEl.

Los neutrófilos, como respuesta ante un estímulo inflamatorio o ante la presencia de patógenos, sufren una extravasación del contenido nuclear interno y citoplasmático al medio externo también llamado NETosis. Este mecanismo se caracteriza por la liberación al medio extracelular de la cromatina nuclear, DNA, proteínas como

elastasa, mieloperoxidasa, calprotectina y otras enzimas bactericidas, lo que conlleva la captura e inactivación de los patógenos. Con ello se forman los *neutrophil extracelular traps* (NETs) que participan en mecanismos de defensa inmunitaria. Además, los NETs, son altamente protrombóticos y se han relacionado con múltiples patologías como trombosis y cáncer debido, entre otros mecanismos, a la inhibición de anticoagulantes naturales como la proteína C (Dapunt, U et al, 2016; Hahn, J. et al, 2016). Por último, ante un estímulo inflamatorio los neutrófilos liberan alfa-defensinas contenidas en los gránulos azurófilos con función microbicida, quimiotáctica, inmunomoduladora y citotóxica (Lemos Luengas & Sarmiento, n.d; Bruno Rivas-Santiago et al, 2006). Además, la interleuquina 6 (IL-6) es una molécula pleiotrópica con acciones proinflamatoriasestimuladas por infecciones de ciertos microorganismos (Saavedra et al, 2010), cuyos niveles están aumentados en condiciones sépticas.

4.5. Test de generación de trombina

El test de generación de trombina (TGT) es un ensayo global de la coagulación que mide la capacidad del plasma para generar trombina. La trombina es la piedra angular de la cascada de la coagulación, puesto que es capaz de activar al fibrinógeno y producir el coágulo de fibrina. Por lo tanto, el TGT tiene potencial utilidad para identificar individuos con una elevada capacidad protrombótica. Es muy común identificar la presencia de un coágulo en la zona de infección protésica, por lo que el TGT podría ayudar a identificar aquellos pacientes que presentan una infección subclínica o incluso diagnosticar la remisión de la misma (Bioanálisis, 2016).

5. Hipótesis

Actualmente no existe ningún método diagnóstico de infección protésica con una sensibilidad y especificidad al 100%. Por ello, numerosos diagnósticos se catalogan como dudosos, lo cual dificulta el manejo del paciente. En este estudio evaluamos el potencial de los NETs, alfa-defensina, IL-6 y el test de generación de trombina como marcadores de diagnóstico y pronóstico de las infecciones protésicas.

6. Objetivos

El objetivo general de nuestro estudio fue la identificación de nuevos marcadores inmunotrombóticos que permitan una identificar aquella subpoblación de pacientes con una infección protésica, con el fin de poder realizar una intervención terapéutica rápida y eficaz.

Los objetivos específicos son:

- Explorar el papel de los NETs en el desarrollo y resolución de las infecciones protésicas.
- Evaluar el valor diagnóstico y pronóstico de la alfa-defensina, IL-6 y del test de generación de trombina.
- Crear un algoritmo con valor diagnóstico-pronóstico que incluya variables clínicas y los nuevos marcadores estudiados.

7. Materiales y métodos

7.1. Sujetos de estudio:

Nuestro estudio incluyó 2 grupos clínicos:

- Pacientes consecutivos y prospectivamente recogidos con prótesis infectadas.
- Pacientes consecutivos y prospectivamente recogidos con prótesis no infectadas.

El esquema para la obtención de muestras de los pacientes fue el siguiente:

A los pacientes con prótesis infectadas se les recogió una muestra de sangre justo antes de la intervención quirúrgica de reemplazo de la prótesis por un espaciador. Se realizó un seguimiento clínico y, en un periodo de 6-8 semanas, se obtuvo la segunda muestra de sangre justo antes del remplazo del espaciador por la nueva prótesis.

A los pacientes sin infección protésica se les recogieron muestras de la misma forma que a los pacientes con infección protésica.

El diagnóstico de infección protésica está basado en los criterios establecidos en el *International Consensus on Prosthetic Joint Infection* del 2013. En este estudio excluimos aquellos pacientes que estaban en tratamiento antibiótico durante la

recogida de muestras de sangre o aquellos con una coagulopatía congénita o adquirida. En cada recogida de muestras, obtuvimos 2 tubos de sangre anticoagulada con citrato de cada uno de los pacientes.

7.2. Extracción y conservación de las muestras de plasma

La sangre se extrajo de la vena antecubital sin usar compresión con una aguja de calibre 21 en tubos Vacutainer (BD Diagnostics) con 0.109 M citrato de sodio, descartando los primeros 3 ml. Las muestras fueron procesadas durante la 1ª y 2ª hora después de la extracción. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1811g, durante 30 minutos a 4º C para la obtención de plasma y se alicuotaron y congelaron a -80ºC.

7.3. Cuantificación de los marcadores de NETs

Puesto que no existe un método directo para medir los NETs circulantes en el plasma, cuantificamos el nivel de nucleosomas, los nucleosomas son un complejo de DNA e histonas que representan los componentes básicos de la cromatina. Un nucleosoma comprende aproximadamente 150-200 pb de DNA envuelto alrededor de un núcleo de proteínas de histonas doble representadas H2A, H2B, H3 y H4. Un DNA enlazador de 10 a 100 pb conecta los nucleosomas y la histona H1 se une al DNA enlazador, es importante para la organización de la cromatina. Los nucleosomas plasmáticos se cuantificaron utilizando el kit (Cell Death Detection kit, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, los nucleosomas se cuantifican utilizando un anticuerpo de captura contra un epítopo compartido por todas las histonas y un anticuerpo de detección contra el DNA. La absorbancia se registró en un lector de placas de revelación MRXTC (Thermo Labsystems) (anexo 3).

El DNA libre circulante se midió como marcador del contenido nuclear del neutrófilo. (Quant-iT PicoGreen kit, Invitrogen) (anexo 4). El plasma se diluyó en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Se mezclaron cien microlitros de plasma diluido con 100 µl de TE que contenía Quant-iTTM PicoGreen (dilución de 200 veces) para marcar el DNA libre circulante. La fluorescencia se registró en un fluorómetro SpectraMax Gemini XS (Molecular Devices). Las concentraciones de

DNA libre circulante se calcularon en base a una curva estándar de concentraciones conocidas de λ DNA (Life Technologies) incluidas en cada placa.

La calprotectina se midió como marcador citoplasmático, pertenece a un grupo de proteínas S100 que se unen al calcio y es expresada principalmente por neutrófilos y monocitos circulantes, en los que representa el 50% de las proteínas citosólicas. La calprotectina se usa como marcador de diagnóstico de la inflamación en el plasma humano y se libera junto con el DNA durante la NETosis. La calprotectina plasmática se cuantificó utilizando el kit ELISA de calprotectina humana (Human Calprotectin ELISA kit, Hycultbiotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se registró en un lector de placas de revelación MRXTC (Thermo Labsystems) (anexo5).

Por último, la mieloperoxidasa se midió como marcador del contenido de los gránulos del neutrófilo. Es una hemoproteína almacenada en los gránulos de neutrófilos y monocitos, son conocidas por producir especies reactivas de oxígeno. La mieloperoxidasa es particularmente abundante en neutrófilos, representa el 25% de las proteínas granulares y el 5% de todas las proteínas, y se libera junto con el DNA durante la NETosis. La mieloperoxidasa plasmática se cuantificó utilizando el kit ELISA MPO (humano) (Abnova) siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se registró en un lector de placas de revelación MRXTC (Human MPO ELISA kit, Abnova) (anexo 6)

7.4. Cuantificación de la respuesta inflamatoria de los marcadores de neutrófilos

Cuantificamos la interleuquina proinflamatoria IL-6 plasmática. IL-6 es una citoquina multifuncional que regula las respuestas inmunitarias, las reacciones de fase aguda y la hematopoyesis y puede desempeñar un papel central en los mecanismos de defensa del huésped. Se cuantificó utilizando el kit (Human IL-6 High Sensitivity ELISA Kit, Diaclone) (anexo 7).

La alfa-defensina HNP1-3 proviene del neutrófilo. Las defensinas de los neutrófilos humanos (alfa-defensinas, HNP1-3) pertenecen a la familia de los péptidos microbicidas catiónicos que contienen trisulfuro, ejercen actividad microbicida, quimiotáctica, inmunomoduladora y citotóxica y participan en la defensa del huésped

y la inflamación. Se cuantificó mediante el kit (Human ELISA Kit, Hycultbiotech) (anexo 8). HNP1-3 representa el 99% del total de las defensinas provenientes del neutrófilo presentes en el plasma.

7.5. Test de generación de trombina

El test de generación de trombina se llevó a cabo por medio de un ensayo automatizado (CAT, Thrombinoscope BV). La generación de trombina en el plasma a analizar se inició mediante la adición de factor tisular, fosfolípidos y calcio, y la trombina generada se cuantificó mediante un sustrato fluorogénico. La fluorescencia se midió en un lector de fluorescencia (Fluoroskan Ascent, Thermo Labsytems) equipado con filtros de 390/460 nm. Los parámetros a partir de las curvas de trombina generada se obtuvieron mediante el Thrombinoscope sofware (Thorombinoscope BV): tiempo de latencia (LT), que es el tiempo en min que tarda en comenzar a aparecer la trombina; potencial endógeno de trombina (ETP), que es el áre bajo la curva de generación de trombina y se expresa en nM*min); la altura máxima del pico (PK; nM), el tiempo al pico (ttPeak) que es el tiempo en min que se tarda en llegar al pico máximo; velocidad de generación de trombina (velIndex), que corresponde a la pendiente de la curva y se expresa en nM/min).

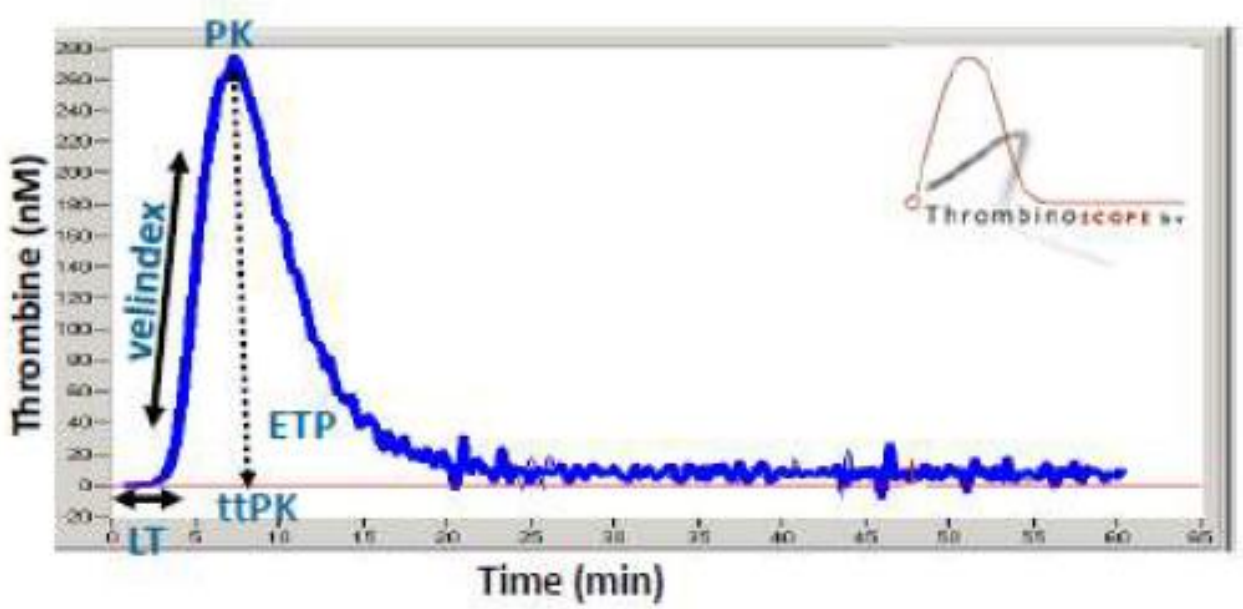


Figura 6. Curva obtenida con el TGT en la que podemos observar las diferentes variables: LT, ETP, PK, ttPeak, vellndex.

7.6. Análisis estadístico

Realizamos el análisis estadístico utilizando R (versión v3.6). Presentamos las variables continuas como media y desviación estándar (DS) y mediana y rango intercuartílico, y las variables categóricas como recuento y porcentaje. Evaluamos la asociación de los marcadores de NETs, alfa-defensinas, IL-6 y parámetros del TGT con la infección protésica, comparando los niveles de cada marcador entre los tres grupos clínicos (con y sin infección protésica y dudosos) mediante el test Wilcoxon-Mann-Whitney. Ajustamos un modelo de regresión logística elastic net (Zou, H., and Hastie, T.,2005) para predecir el riesgo de infección protésica utilizando los niveles de los marcadores de NETs, alfa-defensinas, IL-6 y test de generación de trombina antes de la cirugía. La fórmula para calcular el riesgo de infección protésica en cada paciente se construyó con los coeficientes resultantes del modelo para cada variable predictiva. La capacidad predictiva del modelo se evaluó mediante la estimación del área bajo la curva (AUC) ROC (*Receiver Operating Characteristic*) corregida por optimismo utilizando 1000 repeticiones *bootstrap*. Consideramos los resultados estadísticamente significativos cuando P <0,05.

8. Resultados

Realizamos un análisis descriptivo de todos los parámetros estudiados (marcadores de NETs, alfa-defensina, IL-6 y parámetros del TGT) comparando los tres grupos clínicos de pacientes: pacientes con y sin infección protésica y los de diagnóstico dudoso por no cumplir los criterios establecidos en el *International Consensus Meeting on periprosthetic joint infection (Tabla 1)*.

Tabla 1. Análisis descriptivo de los parámetros estudiados en los diferentes grupos clínicos: marcadores de NETs, alfa-defensina, IL-6 y parámetros del TGT.

Variable	infección n:24	no infección n:27	dudoso n:9
	Media (SD) / n(%)	Media (SD) / n(%)	Media (SD) / n(%)
	Mediana (1st, 3rd Q.)	Mediana (1st, 3rd Q.)	Mediana (1st, 3rd Q.)
Edad (años)	70.28 (10.51)	67.67 (12.17)	70.82 (7.01)

	72.4 (64.98, 77.43)	70.6 (61.1, 76.15)	71.2 (64.6, 72.7)
Calprotectina (ng/ml)	2768.29 (1719.66)	1379.01 (868.16)	2342.14 (1374.96)
	2177.65 (1668.62, 3603.43)	1241.9 (770.5, 1731.2)	2245.5 (1383, 2759.7)
DNA (ng/ml)	1083.24 (230.88)	865.76 (107.15)	955.43 (117.25)
	1020 (938.9, 1139.77)	865.7 (814.65, 912.7)	985.6 (853.5, 1033.8)
Mieloperoxidasa (ng/ml)	112.45 (71.38)	150.53 (158.85)	115.19 (78.93)
	106 (73.33, 125.2)	98.2 (66.88, 129.98)	90.3 (78.8, 113.7)
Alfa-defensina (ng/ml)	9.03 (12.03)	6.14 (6.19)	10.33 (8.31)
	5.6 (3, 9.72)	6 (0, 8.5)	8.7 (5.5, 12.4)
IL-6 (pg/ml)	19.87 (37.56)	7.39 (8.25)	6.42 (7.3)
	8.77 (4.47, 19.19)	4.91 (2.72, 7.87)	4.22 (3.2, 5.65)
Nucleosomas (UI)	0.08 (0.08)	0.08 (0.06)	0.08 (0.07)
	0.05 (0.04, 0.07)	0.07 (0.04, 0.1)	0.05 (0.04, 0.13)
Lagtime (min)	6.3 (2.11)	5.19 (0.96)	6.14 (0.87)
	5.65 (4.97, 6.95)	5 (4.4, 5.8)	6.1 (5.7, 6.6)
ETP (nm*min)	1541.17 (422.56)	1667.63 (414.63)	1494.7 (443.83)
	1589.45 (1369.9, 1745.5)	1670.9 (1398.6, 1986.3)	1479.9 (1250.9, 1834.7)
Peak (nm)	135.62 (58.19)	159.63 (56.73)	127.44 (47.7)
	128.25 (99.1,	154.1 (125.45,	129.1 (90.4,

	174.33)	199.65)	151.9)
ttpeak (min)	12.47 (3.17)	11.52 (4.79)	12.27 (1.57)
	11.95 (10.12, 13.93)	10.6 (9.45, 11.85)	12 (11.4, 13.9)
Velindex (min)	25.31 (17.13)	31.06 (16.75)	21.94 (9.83)
	22.05 (12.67, 33.62)	28 (18.8, 40.25)	22.9 (12.5, 27.8)
Starttail (min)	36.6 (5.85)	30.74 (7.59)	35.74 (3.69)
	36.5 (32.6, 40.52)	31.8 (29, 35.2)	35 (33.6, 36)
sexo			
hombre	12 (50%)	12 (44.44%)	5 (55.56%)
mujer	12 (50%)	15 (55.56%)	4 (44.44%)

Seguidamente, analizamos las diferencias de los niveles de cada una de las variables estudiadas entre los pacientes con infección protésica y los pacientes sin infección protésica. Así, encontramos diferencias significativas en los niveles de DNA libre circulante entre los pacientes con infección protésica (865,76 ng/ml ± 107,15) y los pacientes sin infección protésica (1083,24 ± 230,88) (*P*<0,001) (Figura 7B), calprotectina entre los pacientes con infección protésica (1379.01 ng/ml ± 868.16) y sin infección (2768.29 ± 1719.66) (P<0,001) (Figura 7A), lagtime entre los pacientes con infección protésica (5.19 min ± 0.96) y sin infección protésica (6.3 ± 2.11) (P=0,0291) (Figura 9A), y Starttail entre los pacientes con infección protésica (35.74 min ± 3.69) y sin infección (36.6 ± 5.85) (P=0,0067) (Figura 9F).

Por el contrario, no encontramos diferencias entre los niveles de mieloperoxidasa entre los pacientes con infección protésica (150.53 ng/ml ± 158.85) y sin infección protésica (112.45 ± 71.38) (P=0,8536) (Figura 7C), IL-6 entre los pacientes con infección protésica (7.39pg/ml ± 8.25) y sin infección protésica (19.87 ± 37.56) (P=0,7530) (Figura 8B), nucleosomas entre los pacientes con infección protésica

(0.08 ng/ml ± 0.06) y sin infección protésica (0.08 ± 0.08) (P=0, 0,4428) (Figura 7D), ETP entre los pacientes con infección protésica (1667.63 nM/min ± 414.63) y sin infección protésica (1541.17 ± 422.56) (P=0,3533) (Figura 9B), peak entre los pacientes con infección protésica (159.63 nM ± 56.73) y sin infección protésica (135.62 ± 58.19) (P=0,1247) (Figura 9C), ttpeak entre los pacientes con infección protésica (11.52 min ± 4.79) y sin infección protésica (12.47 ± 3.17) (P=0,0875) (Figura 9D), velinde entre los pacientes con infección protésica (31.06 min ± 16.75) y sin infección protésica (25.31 ± 17.13) (P=0,1286) (Figura 9E) y las representamos mediante diagramas de cajas (Figura 7,8 y 9).

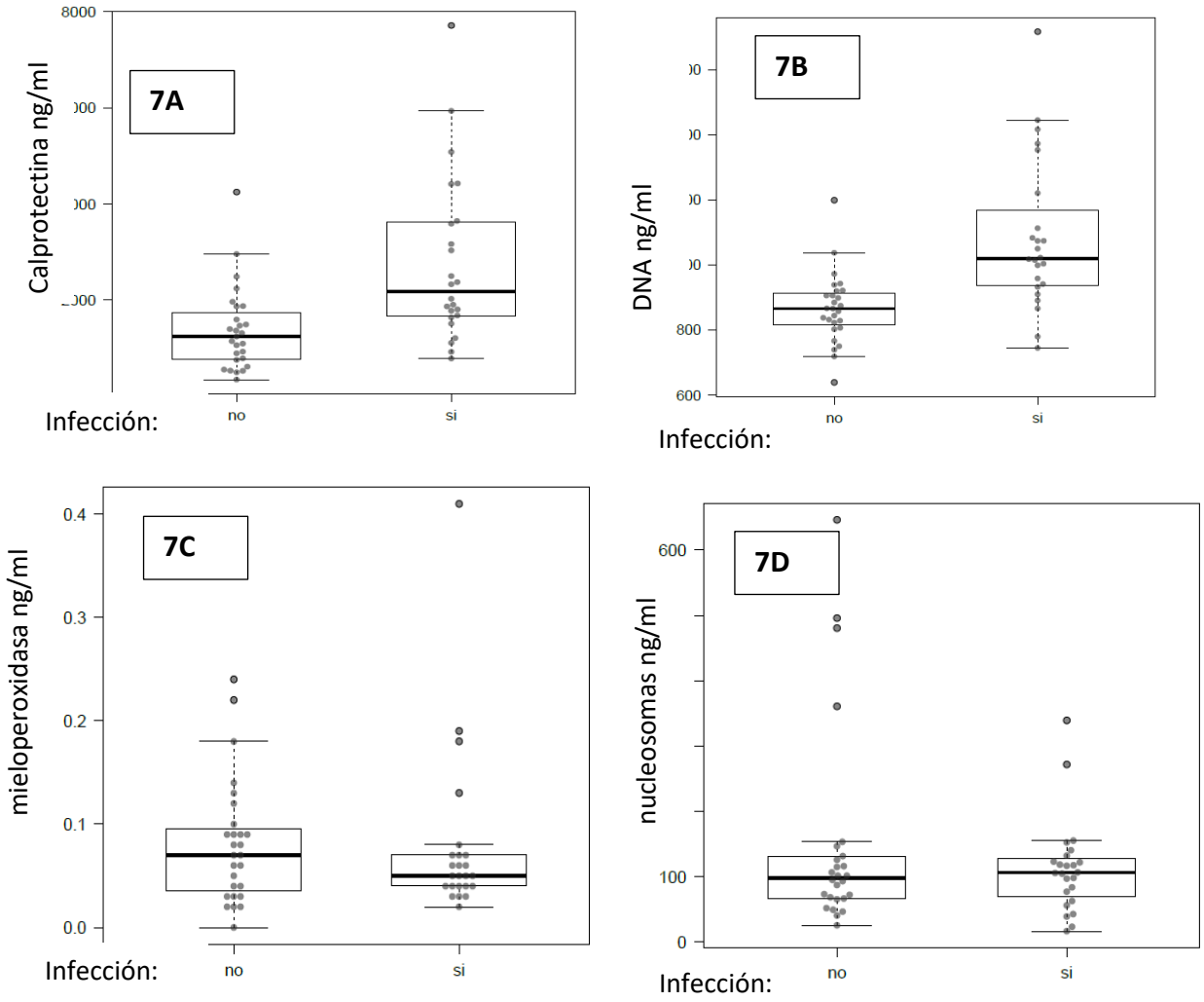


Figura 7. Boxplots de los parámetros de NETs estudiados; calprotectina, mieloperoxidasa, DNA y nucleosomas.

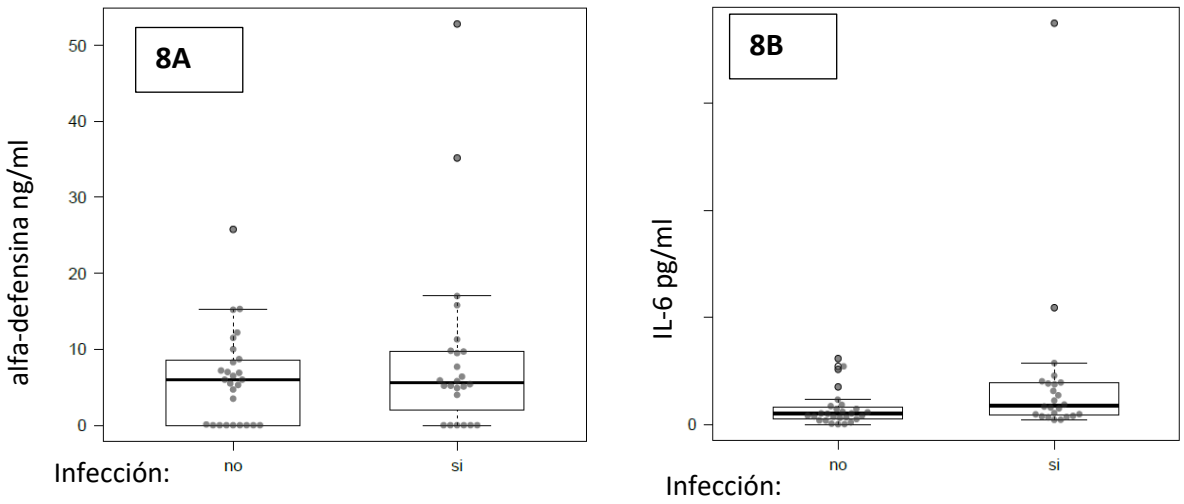
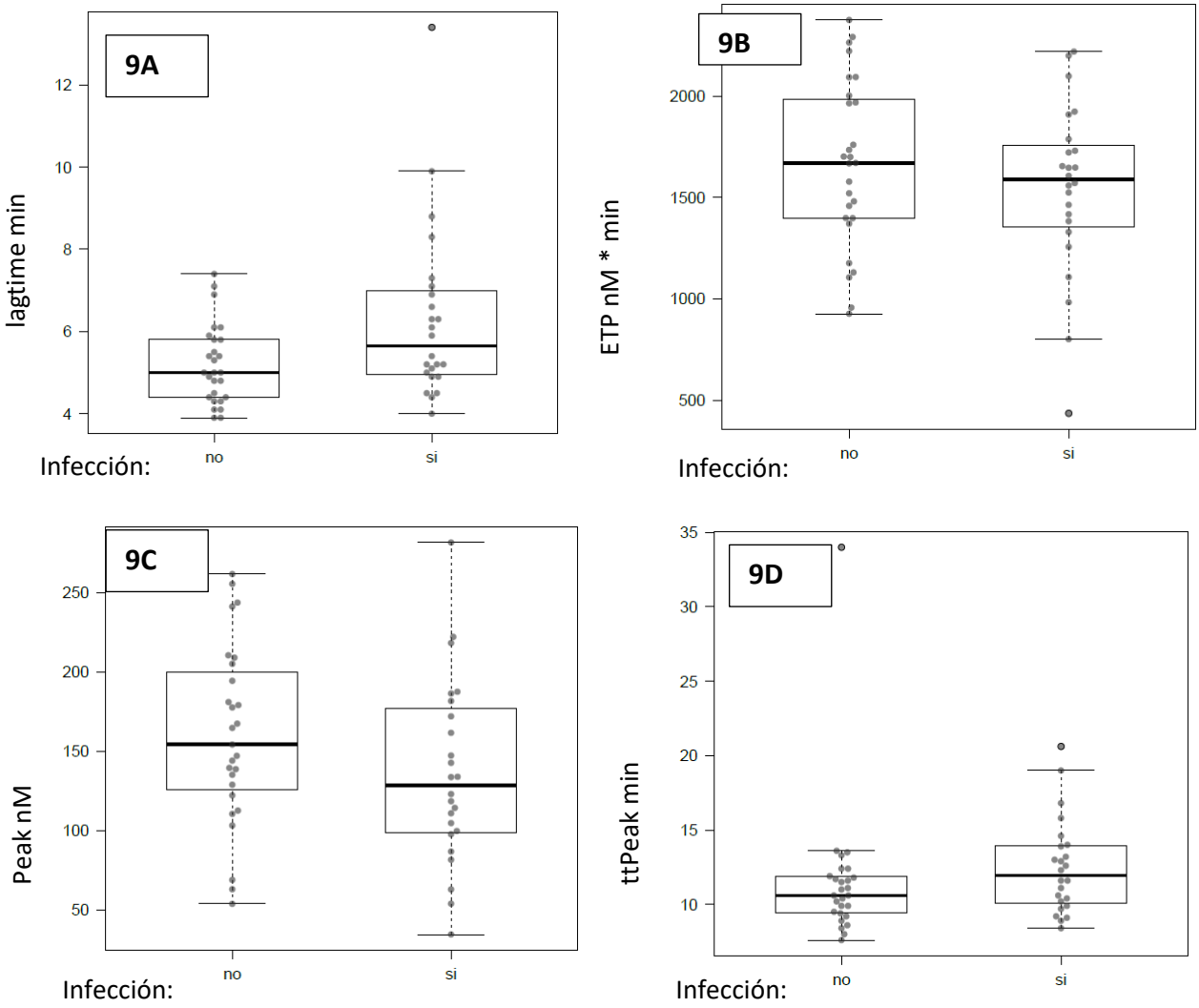


Figura 8. Boxplots de alfa-defensina e IL-6



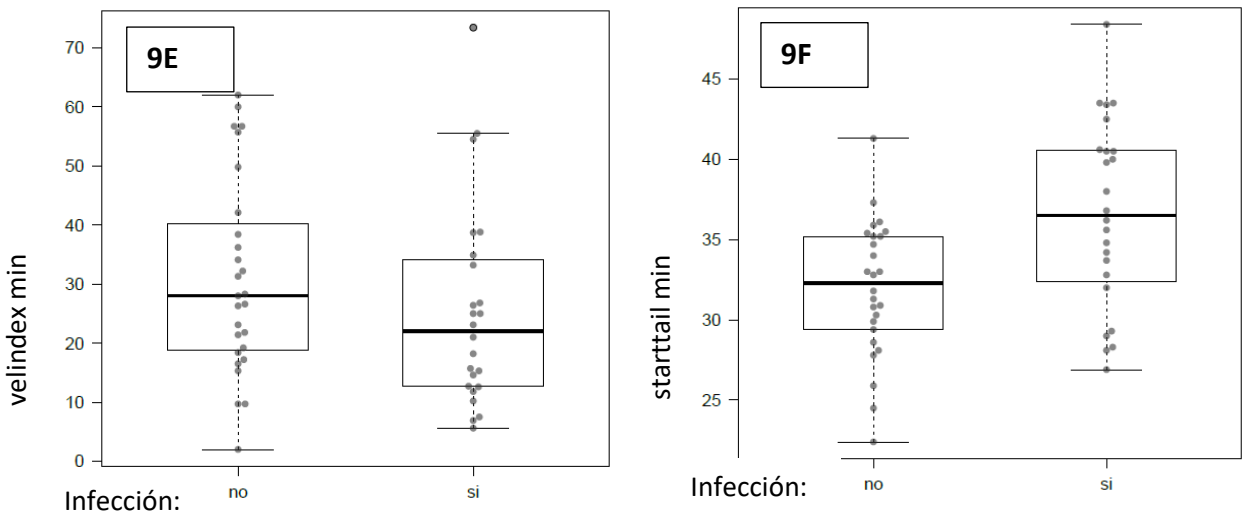


Figura 9. Boxplots de los parámetros del TGT.

Finalmente, hemos evaluado la capacidad predictiva de infección protésica de los marcadores estudiados. Mediante un análisis de regresión logística elastic net, ajustamos un modelo predictivo de infección protésica con la calprotectina, el DNA y el starttail como variables predictoras (AUC=0,905, Intervalo Confianza 95% [0,822, 0,989], P<0.001) (Figura 10). Así, con nuestro modelo podemos calcular el riesgo de infección protésica de cada paciente con la siguiente fórmula:

$$Prob(IP) = \frac{e^{-4.83671+0.00015*calprotectina+0.00284*DNA+0.05156*starttail}}{1+e^{-4.83671+0.00015*calprotectina+0.00284*DNA+0.05156*starttail}}$$

La sensibilidad y especificidad de nuestro modelo predictivo se puede calcular en la figura 11.

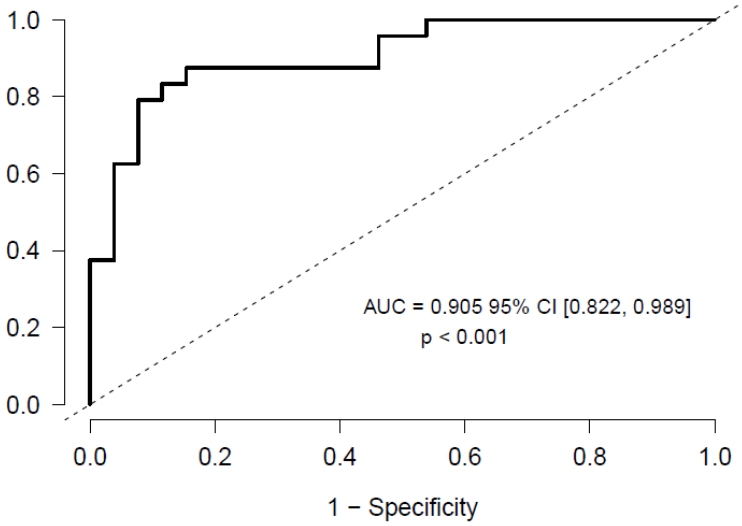


Figura 10. Área bajo la curva del modelo estadístico, curva ROC.

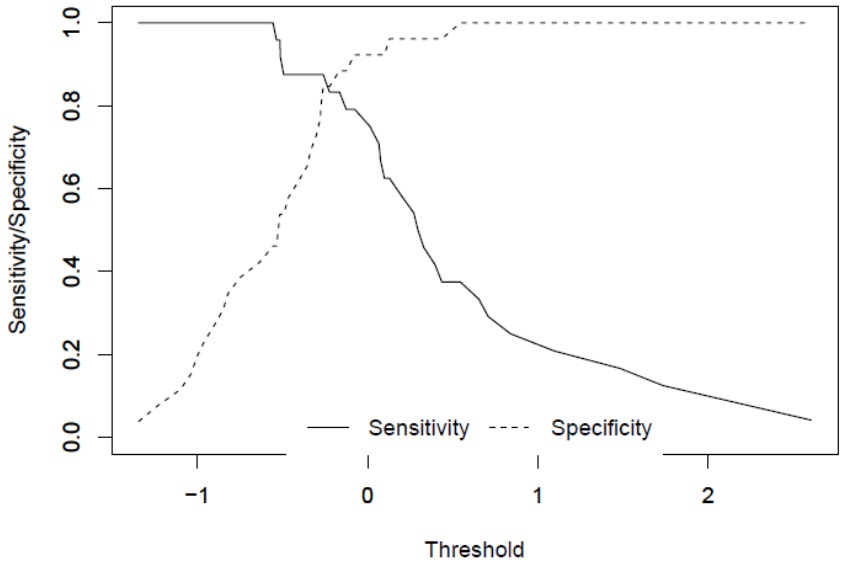


Figura 11. Especificidad y sensibilidad del modelo estadístico.

Con nuestra fórmula, calculamos la probabilidad de infección protésica de cada paciente incluido en el estudio, y observamos que nuestro modelo tiene un alto poder predictivo (Tabla 2)

Tabla 2. Resultados de la clasificación de los pacientes en el grupo de infección o no infección según la ecuación obtenida.

Observado	Pronosticado		Porcentaje de acierto diagnóstico
	No	Si	
Infección protésica	6	18	75%
No infección protésica	24	2	92.3%
Porcentaje global de acierto diagnóstico			83.65%

9. Discusión

El diagnóstico de infección protésica sigue siendo un verdadero desafío, ya que actualmente no existe ninguna prueba diagnóstica o combinación de las mismas, que permita diagnosticar con precisión la infección antes de una cirugía. Actualmente, para el diagnóstico de una infección protésica se utiliza el protocolo establecido en el último International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infection. A pesar de llevar a cabo este árbol diagnóstico, existen muchos casos en los que no es nada fácil llegar a una conclusión que permita actuar con seguridad diagnóstica. Son casos en los que no se cumplen los criterios suficientes para diagnosticar una infección protésica, pero la sospecha clínica y la experiencia llevan al cirujano a tratarlos como tal. Por esta razón, existe una necesidad de identificar nuevos modelos y marcadores que puedan ayudar a realizar un diagnóstico de infección protésica rápido y preciso.

Así, en nuestro estudio hemos evaluado la capacidad diagnóstica de marcadores de NETs (DNA libre circulante, nucleosomas, calprotectina y mieloperoxidasa), alfa-defensinas de neutrófilos, IL-6 y los parámetros del TGT. Hemos identificado diferencias significativas en la concentración de DNA libre circulante, calprotectina e

IL-6 en pacientes con infección protésica comparado con los pacientes sin infección protésica. Asimismo, encontramos diferencias significativas en el lagtime y el starttail del TGT. Estos marcadores podrían mejorar el algoritmo diagnóstico actual para diagnosticar con mayor precisión las infecciones protésicas. Nuestro estudio refuerza la hipótesis de que los neutrófilos parecen jugar un papel importante en las infecciones protésicas, posiblemente a través de la liberación de NETs. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún estudio en el que se haya evaluado el papel de los NETs en el escenario de las infecciones protésicas. Además, también hemos observado un aumento significativo de la interleuquina proinflamatoria IL-6 en plasma de pacientes con infección protésica. A pesar de que en estudios previos se han observado diferencias en la concentración de alfa-defensina en líquido sinovial de pacientes con infección protésica (Bingham, J., et al, 2014), en nuestro estudio hemos observado que la concentración de alfa-defensina en plasma de pacientes con infección protésica es muy baja (incluso en ocasiones indetectable) salvo en una pequeña ventana temporal durante la fase aguda de la infección. Por ello, la alfa-defensina no se postula como un buen marcador no invasivo de infección protésica.

Finalmente, hemos evaluado la capacidad predictiva de infección protésica de los marcadores estudiados. Hemos obtenido un modelo predictivo de infección protésica con el DNA libre circulante, la calprotectina y el starttail como variables predictoras, el cual ha alcanzado una AUC de 0,905 (IC 95% [0,822, 0,989], P<0.001). Seguidamente, hemos calculado el riesgo de infección protésica de cada paciente. Con nuestro modelo predictivo hemos clasificado correctamente un 83,65% de los pacientes, un 92,3% de pacientes sin infección y un 75% con infección, lo cual muestra que nuestro modelo tiene una elevada capacidad predictiva, así como una elevada sensibilidad y especificidad.

La validación de nuestro modelo diagnóstico en una población independiente de pacientes, permitirá realizar un diagnóstico temprano eficaz de infección protésica e iniciar el tratamiento en estos pacientes para minimizar efectos colaterales de la infección protésica como daño tisular, degradación ósea y una cirugía de reemplazo

10. Conclusión

Los neutrófilos juegan un papel fundamental en los procesos infecciosos a través de la inmunotrombosis. En nuestro estudio hemos evidenciado que marcadores de

NETs y del TGT pueden ayudar al diagnóstico de la infección protésica. Así, hemos ajustado un modelo capaz de diagnosticar la infección protésica que incluye el DNA libre circulante, la calprotectina y el starttail como variables predictoras. Nuestro modelo tiene una elevada capacidad diagnóstica, puesto que ha sido capaz de clasificar correctamente a un 83,65% de los pacientes estudiados (un 92,3% de pacientes sin infección y un 75% con infección). Nuestro modelo podría implementarse en las guías clínicas para mejorar el algoritmo diagnóstico empleado actualmente para poder diagnosticar con más precisión a los pacientes con infección protésica.

11. Referencias

Ariza, J., Euba, G., & Murillo, Ó. (2008). Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 26(6), 380-390.

Bingham, J., Clarke, H., Spangehl, M., Schwartz, A., Beauchamp, C., & Goldberg, B. (2014). The alpha defensin-1 biomarker assay can be used to evaluate the potentially infected total joint arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 472(12), 4006-4009.

Dapunt, U., Gaida, M. M., Meyle, E., Prior, B., & Hänsch, G. M. (2016). Activation of phagocytic cells by Staphylococcus epidermidis biofilms: effects of extracellular matrix proteins and the bacterial stress protein GroEL on netosis and MRP-14 release. Pathogens and disease, 74(5).

Dapunt, U., Hänsch, G., & Arciola, C. (2016). Innate immune response in implant-associated infections: Neutrophils against biofilms. Materials, 9(5), 387.

Franco Arenaz, María, autor.; Benito Hernández, M. Natividad de, supervisor acadèmic.; Gurguí Ferrer, Mercè, supervisor acadèmic. Epidemiología de la infección de prótesis articular en España en la última década: Análisis de la evolución de la etiología en el tiempo. 1 recurs en línia (118 pàgines). ISBN 9788449076831. <https://ddd.uab.cat/record/188121> [Consulta: 16 maig 2019].

Hahn, J., Knopf, J., Maueroder, C., Kienhofer, D., Leppkes, M., & Herrmann, M. (2016). Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation. Clin Exp Rheumatol, 34(4 Suppl 98), 6-8.

Lemos Luengas, E., & Sarmiento, M. Defensinas: una nueva perspectiva en antibioticoterapia. Revista De La Facultad De Medicina. doi: 10.15446/revfacmed.

Parvizi, J., Tan, T. L., Goswami, K., Higuera, C., Della Valle, C., Chen, A. F., & Shohat, N. (2018). The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: an evidence-based and validated criterion. The Journal of arthroplasty, 33(5), 1309-1314.

Parvizi, J., Zmistowski, B., Berbari, E. F., Bauer, T. W., Springer, B. D., Della Valle, C. J., … Zalavras, C. G. (2011). New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. Clinical orthopaedics and related research, 469(11), 2992–2994. doi:10.1007/s11999-011-2102-9

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. salud pública de méxico, 48, 62-71.

Saavedra Ramírez, Publio Giovanni; Vásquez Duque, Gloria María; González Naranjo, Luis Alonso. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. Iatreia, [S.l.], v. 24, n. 2, p. pág. 157- 166, mar. 2011. ISSN 2011-7965.

Stone, W. Z., Gray, C. F., Parvataneni, H. K., & Prieto, H. A. (2019). Clinical Evaluation of Alpha Defensin Test following Staged Treatment of Prosthetic Joint Infections. The Journal of Arthroplasty.

Utilidad diagnóstica del ensayo de generación de trombina. (2016). Bioánalisis, [online] 69, pp.13-14. Available at: http://revistabioanalisis.com/index.php/revistas/edicion-digital/book/10-mayo-junio-2016/1-default-category [Accessed 16 May 2019].

Zou, H., & Hastie, T. (2005). Regularization and variable selection via the elastic net. Journal of the royal statistical society: series B (statistical methodology), 67(2), 301-320.

12. Autoevaluación

He realizado el trabajo de final de grado sobre las prácticas en el Grupo Acreditado de Investigación en Hemostasia, Trombosis Arteriosclerosis y Biología Vascular del Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital La Fe en Valencia, en el periodo de enero a mayo. En este periodo he adquirido experiencia, formación y una mejora de la adaptación en el laboratorio. He tenido la suerte de contar con un grupo de apoyo que me ha ayudado en todo y me han enseñado la vida de un investigador en el ámbito biomédico. He podido ver el rol como biotecnólogo y el funcionamiento del que ha sido mi centro de destino. Además, en cuanto a mi proyecto de final de grado he podido participar y buscar soluciones a los problemas que se me iban presentado, además, me he encargado de la optimización de los protocolos de los ELISAS de IL-6 y alfa-defensina. En definitiva, he podido aplicar los conocimientos y habilidades adquiridas durante las asignaturas de la carrera. En general, ha sido una estancia muy satisfactoria.

13. Anexos

Anexo 1.

Criterios de infección protésica según la *Musculoskeletal Infection Society* de 2011

- Hay un tracto sinusal que se comunica con la prótesis
- Un patógeno se aísla mediante cultivo a partir de al menos dos muestras separadas de tejido o líquido obtenidas de la articulación protésica afectada
- Cuatro de los siguientes seis criterios existen:
    - Aumento de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y de la concentración de proteína C reactiva (CRP) sérica.
    - Recuento elevado de leucocitos sinoviales
    - Elevado porcentaje de neutrófilos en líquido sinovial (%PMN)
    - Presencia de purulencia en la articulación afectada.
    - Aislamiento de un microorganismo en un cultivo de tejido o líquido periprotésico

- Más de cinco neutrófilos por campo de alta potencia en cinco campos de alta potencia observados a partir del análisis histológico del tejido periprotésico a × 400 aumentos.

Anexo 2.

Criterios de definición protésica según el *International Consensus Meeting on periprosthetic joint infection* de 2018

Criterios mayores (al menos uno de ellos)	Decisión
Dos cultivos positivos del mismo organismo	Infectado
Un tracto sinusal que se comunica con la articulación o visualización de la prótesis	

		Criterios menores	Puntuación	Decisión
Diagnostico preoperatorio	Serum	Elevada proteina C reactiva o díameros-D	2	≥ 6 infectado 2-5 posible infectado 0-1 no infectado
		Elevada velocidad de sedimentación globular	1	
	Líquido sinovial	Elevado numero de leucocitos o esterasa leucocitaria	3	
		Positivo en alfa-defensina	3	
		Elevado numero de polimorfonucleares	2	
		Elevada velocidad de sedimentación globular	1	

Diagnostico intraoperativo	Pre-operatorio inclusivo	Puntuación	Decisión
	Puntuación pre-operatorio	-	≥ 6 infectado
	Histologia positiva	3	4-5 posible infectado
	Purulencia positiva	3	≤ 3 no infectado
	Un cultivo positivo	2	

Anexo 3

Protocolo ELISA nucleosomas

1. Preparar las tiras deseadas y devolver inmediatamente las tiras no usadas a la bolsa y cerrar.
2. Añadir 20 µl muestra, control positivo y tampón de incubación (para control de ruido de fondo) por duplicado, justo en el centro del pocillo sin tocar las paredes ni el fondo.
3. Añadir 80 µl de inmunorreactivo a cada pocillo, justo en el centro del pocillo.
4. Tapar la placa con un film adhesivo. Incubar 2 horas a RT en agitación a 300 rpm.
5. Lavar 3 veces con 300 µl de tampón de incubación, eliminar la solución con cuidado.
6. Añadir 100 µl de solución ABTS a cada pocillo.
7. Incubar 10-20 min a RT en agitación a 250 rpm, hasta que se desarrolle el color.
8. Parar la reacción con 100 µl de Solución Stop ABTS. Si la solución está turbia o hay precipitados, calentar a 37ºC agitando hasta que se disuelvan.
9. Leer la placa a 405 nm vs. 490 nm.
10. Calcula la media de cada duplicado.
11. Restar la absorbancia del ruido de fondo (tampón de incubación + inmunorreactivo + sol. ABST + sol. Stop ABST) a cada media.

La señal del ruido de fondo debe ser < 100 mU tras revelar 15 min. La señal del control positivo debe ser > 600 mU tras restar el ruido de fondo y revelar 15 min.

Anexo 4

Protocolo PicoGreen DNA

1. En el día, diluir las muestras en tubos/placas de polipropileno.
2. Añadir 100 µl de o estándar muestra por duplicado en la placa del fluorímetro.
3. Verter el reactivo PicoGreen (paso B) en un reservorio de polipropileno libre de DNasa.
4. Añadir a cada pocillo 100 µl del reactivo PicoGreen, con multicanal.
5. Incubar 2-5 min a RT en oscuridad.
6. Medir fluorescencia a 480 nm excitación y 520 nm de emisión, tiempo de adquisición constante para todas las muestras. Fluorímetro SpectraMax Gemini XS (Molecular Devices**).**
7. Calcula la media de cada duplicado.
8. Restar la fluorescencia del blanco a cada muestra.
9. Generar una curva estándar de fluorescencia vs. concentración de DNA, y calcular la concentración de DNA de cada muestra (multiplicando por el factor de dilución).

Anexo 5

Protocolo ELISA calprotectina

1. Centrifugar el plasma 1500xg a 4ºC 15 min para eliminar contaminaciones de glóbulos blancos. Atemperar a RT y mezclar sin formar espuma.
2. En el día, diluir el plasma en tubos/placas de polipropileno, no en poliestireno.
3. Preparar las tiras deseadas y devolver inmediatamente las tiras no usadas a la bolsa con el desecante y cerrar. Duración 1 mes a 4ºC.

4. Añadir 100 µl muestra o estándar a cada pocillo por duplicado, sin tocar las paredes ni el fondo.
5. Tapar y golpear la placa suavemente para eliminar burbujas. Incubar 1 hora a RT.
6. Lavar 4 veces con 200 µl de tampón de lavado, incubando 20 segundos y vaciando por decantación.
7. Añadir 100 µl de trazador diluido (Ab 2º), sin tocar las paredes ni el fondo.
8. Tapar la placa. Incubar 1 hora a RT.
9. Lavar 4 veces con 200 µl de tampón de lavado, incubando 20 segundos y vaciar por decantación
10. Añadir 100 µl de estreptavidina-peroxidasa diluida, sin tocar las paredes ni el fondo.
11. Tapar la placa. Incubar 1 hora a RT.
12. Lavar 4 veces con 200 µl de tampón de lavado, incubando 20 segundos y vaciar por decantación.
13. Añadir 100 µl sustrato TMB, sin tocar las paredes ni el fondo.
14. Tapar la placa y cubrir con papel de plata. Incubar 30 min a RT. Controlar el color y parar la reacción antes si es necesario.
15. Parar la reacción con 100 µl de solución stop. Mezclar bien y golpear la placa suavemente para eliminar burbujas.
16. Leer la placa a 225 nm, en los 30 min siguientes.
17. Calcular las medias de cada duplicado (cada valor debe ser <15% de su media, si no repetir).
18. Restar la absorbancia del blanco a cada muestra. La absorbancia media del blanco debe ser < 0,3.

19. Generar una curva estándar de absorbancia vs. concentración de calprotectina en escala logarítmica, y calcular la concentración de cada muestra (multiplicando por el factor de dilución).

20. Si la concentración media de alguna muestra es mayor que el valor más alto de la curva estándar, hay que diluirla más y volverla a medir.

Anexo 6

Protocolo ELISA mieloperoxidasa

1. Si hubiera partículas en el plasma, centrifugar el plasma 1500 x g a 4ºC 15. Atemperar a RT y mezclar sin formar espuma.

2. En el día, diluir el plasma en tubos/placas de polipropileno, no en poliestireno.

3. Preparar las tiras deseadas en el marco (fijar con cinta para los lavados). Devolver inmediatamente las tiras no usadas a la bolsa con el desecante, cerrar, y guardar a 4ºC.

4. Añadir 300 µl tampón incubación a cada pocillo e incubar 5 min a RT.

5. Decantar y lavar 2 veces con 300 µl tampón de lavado incubando 1-3 min en cada lavado.

6. Añadir 100 µl muestra o calibrador a cada pocillo por duplicado, sin tocar las paredes ni el fondo.

7. Tapar y golpear la placa suavemente para eliminar burbujas. Incubar 2 horas a RT.

8. Decantar y lavar 3 veces con 300 µl tampón de lavado incubando 1-3 min en cada lavado.

9. Añadir 100 µl de 2º Ab, sin tocar las paredes ni el fondo.

10. Tapar la placa. Incubar 1 hora a RT.

11. Decantar y lavar 3 veces con 300 µl tampón de lavado incubando 1-3 min en cada lavado.

12. Añadir 100 µl AV-HRP, sin tocar las paredes ni el fondo.
13. Tapar la placa. Incubar 30 min a RT.
14. Decantar y lavar 3 veces con 300 µl tampón de lavado incubando 1-3 min en cada lavado.
15. Añadir 100 µl sustrato, sin tocar las paredes ni el fondo (Debe volverse azul). Incubar 5-10 min RT.
16. No tapar con papel de plata para que no desarrolle color.
17. Parar la reacción con 100 µl de solución stop. Mezclar bien y golpear la placa suavemente para eliminar burbujas. Los pocillos deben virar de azul a amarillo.
18. Leer la placa a 450 nm, en los 20 min siguientes.
19. Calcula la media de cada duplicado.
20. Restar la absorbancia del blanco a cada muestra.
21. Generar una curva estándar de absobancia vs. concentración de MPO, y calcular la concentración de cada muestra (multiplicando por el factor de dilución).

Si la concentración media de alguna muestra es mayor que el valor más alto de la curva estándar, hay que diluirla más y volverla a medir.

Anexo 7

Protocolo ELISA IL-6

1. Descongelar el plasma a RT y centrifugar 1500xg a 4ºC 15 min para eliminar debris. Mezclar sin formar espuma.
2. Diluir el plasma según se indica en la planilla en placas de polipropileno, no en poliestireno.
3. Preparar las diluciones seriadas del estándar según se indica en la planilla en tubos de 1,5 ml.
4. Preparar las tiras deseadas y devolver inmediatamente las tiras no usadas a la bolsa con el desecante y cerrar.

5. Añadir 100 µl de estándar, muestra o control positivo a cada pocillo, por duplicado, sin tocar las paredes ni el fondo.
6. Añadir 50 µl del Anti-IL-6HS biotinilado diluido (Ab 2º) a cada pocillo.
7. Cubrir la placa e incubar 3 horas RT.
8. Preparar la Estreptavidina-HRP diluida (poco antes de los lavados).
9. Vaciar y lavar 3 veces con tampón de lavado:

A. Aspirar el líquido de cada pocillo (la primera vez, luego decantar)

B. Añadir 300 µl del tampón de lavado 1X a cada pocillo

C. Decantar y secar la placa

D. Repetir B y C dos veces

10. Añadir 100 µl de Estreptavidina-HRP diluida a cada pocillo.
11. Cubrir la placa e incubar 30 min RT
12. Vaciar y lavar la placa 3 veces con tampón de lavado (de la misma manera que el paso 9)
13. Añadir 100 µl de la solución TMB a cada pocillo.
14. Tapar con papel de plata e incubar 12-15 min RT. Controlar el color y parar la reacción antes si es necesario.
15. Añadir 100 µl H_2SO_4: solución STOP a cada pocillo. Golpear la placa suavemente para eliminar burbujas.
16. Leer la placa a 450 nm y 620 nm (longitud de onda de referencia).
17. Calcular las medias de cada duplicado (cada valor debe ser <20% de su media, si no repetir).
18. Restar la absorbancia del blanco a cada muestra. La absorbancia media del blanco debe ser < 0,3.

19. Generar una curva estándar de absorbancia vs. concentración de IL-6 en escala lineal, y calcular la concentración de cada muestra (multiplicando después por el factor de dilución, si se han diluido las muestras).

Si la concentración media de alguna muestra es mayor que el valor más alto de la curva estándar, hay que diluirla más y volverla a medir.

Anexo 8

Protocolo ELISA alfa-defensina

1. En el día: Diluir el plasma en tubos/placas de polipropileno.
2. Preparar las tiras deseadas en el marco. Devolver inmediatamente las tiras no usadas a la bolsa con el desecante, cerrar y guardar a 4ºC.
3. Añadir 100µL por duplicado de estándar, de muestra o de control en su correspondiente pocillo sin tocar las paredes ni el fondo.
4. Tapar y golpear la placa suavemente para eliminar burbujas. Incubar 1 hora a RT.
5. Quitar la muestra con pipeta multicanal y lavar 4 veces con 200µL de tampón de lavado, incubando 20 segundos en cada lavado.
6. Añadir 100µL de trazador a cada pocillo, sin tocar las paredes ni el fondo.
7. Tapar la placa. Incubar 1h a RT.
8. Decantar y lavar 4 veces con 200µL de tampón de lavado, incubando 20 segundos en cada lavado.
9. Añadir 100µL de estreptavidina-peroxidasa a cada pocillo, sin tocar las paredes ni el fondo.
10. Tapar la placa. Incubar 1h a RT.
11. Decantar y lavar 4 veces con 200µL de tampón de lavado, incubando 20 segundos en cada lavado.
12. Añadir 100µL de TMB a cada pocillo, sin tocar las paredes ni el fondo.
13. Tapar la placa con papel aluminio. Incubar 30 minutos a RT.

14. Parar la reacción con 100µL de solución STOP a cada pocillo, sin tocar las paredes ni el fondo. Mezclar bien y golpear la placa suavemente para eliminar las burbujas.
15. Leer la placa a 450nm