



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

**Influència de la resposta immunitària innata en la malaltia pneumocòccica invasiva greu: polimorfismes genètics en la via de senyalització Toll-IL1R i expressió de la L-selectina en leucòcits**

Jaume Carrasco Colom



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



Facultat de Medicina

Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Medicina Física

Programa de Doctorat en Medicina

**INFLUÈNCIA DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA INNATA EN LA  
MALALTIA PNEUMOCÒCCICA INVASIVA GREU:  
POLIMORFISMES GENÈTICS EN LA VIA DE SENYALITZACIÓ TOLL-IL1R  
I EXPRESSIÓ DE LA L-SELECTINA EN LEUCÒCITS.**

Memòria de Tesi Doctoral per a l'obtenció del Títol de Doctor en Medicina per la  
Universitat de Barcelona.

**DOCTORAND:**

Jaume Carrasco Colom

**DIRECTORS DE TESI:** Dra. Iolanda Jordan Garcia, Dra. Carmen Muñoz-Almagro

**TUTOR DE TESI:** Prof. M<sup>a</sup> Anunciación Martín Mateos

**LÍNIA DE RECERCA:** Fisiopatologia de les Malalties Medicoquirúrgiques.

**GRUP DE RECERCA:** Fisiopatologia de les Malalties Fetals i Pediàtriques.

Barcelona, setembre 2015

Imatge de portada:

Adaptada de:

Center of Diseases Control and Prevention.

Recreació artística d'una imatge tridimensional generada electrònicament d'un grup de  
*Streptococcus pneumoniae* fàrmaco-resistents.

© CDC / James Archer.





## **AGRAÏMENTS**

A la meva Directora de Tesi, Iolanda Jordan, per la seva feina incansable, suport incondicional i ajuda a pesar de la distància. Perquè persones com ella no n'hi ha moltes: assoleixen tot el que es proposen i encara tenen temps per ajudar els que l'envolten.

A la meva altra Directora de Tesi, Carmen Muñoz Almagro, pel seu suport i il·lusió pel projecte, sempre buscant noves línies de recerca en aquest apassionant món de la Infectologia Pediàtrica.

A la meva Tutora de Tesi, Anunciación Martín Mateos, per la seva disposició i bons consells durant el llarg procés d'el·laboració de la Tesi.

A na Laia Alsina, de la secció d'Immunologia Clínica i Al·lèrgia Pediàtriques de l'Hospital Sant Joan de Déu, per l'ajuda i orientació des de l'inici d'aquest projecte.

A en Manel Juan, del Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic, per guiar-me en l'apassionant -i sovint complicat- món de la Immunologia Clínica i dels estudis genètics, i ajudar-me a aprendre moltíssim.

A en Josep Lluís Carrasco, de la Unitat de Bioestadística del Departament de Salut Pública de la Universitat de Barcelona, per la seva inestimable ajuda en les anàlisis estadístiques de la Tesi i per la seva infinita paciència en contestar totes les meves qüestions.

A tot el personal dels laboratoris d'Hematologia i Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu, per la seva ajuda en les tècniques de laboratori (especialment a Teresa Toll, Montserrat Torrebaddell, Mireia Camós, Rosa Vilella, Araceli Montserrat, Cristina Esteva i Laura Selva).

Als serveis de Pediatria i Urgències Pediàtriques de l'Hospital Sant Joan de Déu, per haver-me format com a Pediatre i per tot el que m'han ensenyat. Especialment a en Juanjo Garcia, pel seu suport des del principi de la meva formació i per introduir-me en el món de la Infectologia Pediàtrica i animar-me a seguir per aquest camí.

A tots els companys, molts d'ells amics, de l'Hospital Sant Joan de Déu. Per tant temps passat junts, guàrdies, complicitat i recolzament.

Als pacients i les seves famílies, per accedir a col·laborar en aquest estudi. Tota aquesta feina va dedicada a ells.

Als meus amics de tota la vida i els que he anat fent, per fer-me costat sempre que ho necessito.

Als meus pares, pel seu amor i suport incondicional des de sempre. Per l'educació rebuda i els valors familiars inculcats. Per animar-me a iniciar els estudis de Medicina fora de casa. Per deixar-me desenvolupar-me en llibertat, però sabent que estan sempre al meu costat quan els necessiti. Gràcies, de tot cor.

A la meva germana, sempre còmplice des de que tinc ús de raó. Per tota una infància junts, plena de records. Per estar sempre al meu costat quan la necessito, a pesar de la distància. Per la seva inestimable ajuda en molts moments de la meva vida. Per ser com és, en definitiva.

I finalment, a na Mariajo. No tinc paraules per agrair tot el que ha suposat la seva entrada en la meva vida. Pel seu amor, pel seu recolzament infinit, per fer-me millor persona. Per la seva ajuda i recolzament amb aquest projecte, per les hores i dies robats a causa d'aquest projecte. Aquesta Tesi també és teva. I per donar-me una filla preciosa, na Cecília, font d'inspiració des de que va arribar fa dos anys i centre de les nostres vides. També va per tu, petitona.

## **RESUM**

### **Introducció:**

La malaltia pneumocòccica invasiva (MPI) pot tenir una elevada morbimortalitat, condicionada pel pneumococ i per factors de l'hoste com els receptors Toll-like (TLRs) i la seva via de senyalització intracel·lular comuna Toll-IL1R (TIR). El desenvolupament d'una MPI greu (MPIG) podria estar condicionat per polimorfismes genètics (SNPs) en regions crítiques de la via de senyalització comuna TIR. Aquests SNPs podrien influenciar també l'evolució i el pronòstic de la MPI.

La determinació de la pèrdua d'expressió de la L-selectina (CD62L) "in vivo" en la superfície dels granulòcits podria ser útil en l'avaluació de la via de senyalització TIR en pacients amb MPIG.

### **Objectius:**

Descriure els SNPs en proteïnes de la via de senyalització TIR (IRAK1, IRAK4, IRAKM i MyD88) en pacients amb MPIG. Determinar si aquests SNPs s'associen a la presència de MPIG. Determinar si aquests SNPs condicionen l'evolució dels pacients amb MPIG. Analitzar si la determinació de CD62L "in vivo" és útil com a cribratge inicial de les variacions de funció de la via de senyalització TIR en pacients amb MPIG.

### **Metodologia:**

Estudi prospectiu observacional de casos i controls. Casos: 60 pacients amb MPI i síndrome de resposta inflamatòria sistèmica. Controls: 120 pacients sense infecció aguda ni antecedent d'infecció greu. Criteris d'exclusió: immunodeficiència coneguda. Variables independents: 1) freqüències genotípiques i al·lèliques dels SNPs rs1059701, rs1059702, rs1059703 (IRAK1); rs1624395, rs1370128 (IRAKM); rs1141168, rs4251513, rs1461567 (IRAK4); rs7744, rs6853 (MyD88). 2) Nivell d'expressió de CD62L en superfície de neutròfils, limfòcits i monòcits en fase aguda de la infecció i en fase basal. Altres variables: demogràfiques, antecedents personals i dades evolutives clíniques, analítiques i microbiològiques de la MPIG.



## **Resultats:**

Associació significativa entre la presència de MPIG i: rs1059701-CC (IRAK1) [p=0,0067, OR 1,430 (IC95%: 1,140-1,795)], rs4251513-CC (IRAK4) [p<0,0001, OR 2,183 (IC95%: 1,578-3,019)], rs4251513-C (IRAK4) [p<0,0001, OR 1,468 (IC95%: 1,404-1,535)], rs1461567-T (IRAK4) [p=0,0158, OR 1,500 (IC 95%: 1,132-1,987)], rs6853-AA (MyD88) [p<0,0001, OR 2,125 (IC95%: 1,787-2,526)] i rs6853-A (MyD88) [p<0,0001, OR 1,935 (IC95%: 1,462-2,563)].

En els pacients amb MPIG: associació significativa entre leucocitosi >15000/mm<sup>3</sup> i rs1059702-noTT (IRAK1) [p=0,0460, OR 7,500 (IC95%: 1,862-30,214)], pleuropneumònia i rs1624395-G (IRAKM) [p=0,0147, OR 1,834 (IC95%: 1,230-2,736)] i rs1370128-C (IRAKM) [p=0,0055, OR 2,060 (IC95%: 1,367-3,105)], seqüeles i rs4251513-noGG (IRAK4) [p=0,0010, OR 7,066 (IC95%: 2,645-18,872)], *exitus* i rs6853-noAA (MyD88) [p=0,0054, OR 16,086 (3,336-77,574)] i rs6853-G (MyD88) [p=0,0064, OR 8,388 (IC95%: 2,472-28,455)].

Estudi d'expressió de CD62L : només s'han obtingut dades completes en 21 pacients. Entre els 3 grups cel·lulars, diferències significatives en el grup de monòcits entre fase aguda i basal (p=0,0343). En els monòcits, diferències significatives en rs4251513-CG (IRAK4) entre fase aguda i basal (p=0,0391).

## **Conclusions:**

Alguns SNPs d'IRAK1, IRAK4 i MyD88 estan associats a un risc incrementat de desenvolupar MPIG en comparació amb la població general. Altres SNPS d'IRAK1, IRAKM, IRAK4 y MyD88 condicionen l'evolució de la MPIG. La identificació de SNPs que predisposin a malalties infeccioses greus com la MPIG podria ajudar a estratificar els pacients i dissenyar tractaments específics. Nous estudis amb mida mostral major podrien ajudar a entendre les conseqüències funcionals d'aquestes associacions a través de la determinació dels nivells de CD62L en monòcits abans i després de la MPIG.

## ÍNDEX

<b>1. LLISTAT D'ABREVIATURES UTILITZADES .....</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>7</b>
2.1. MALALTIA PNEUMOCÒCCICA INVASIVA.....	7
2.2. EL SISTEMA IMMUNITARI INNAT.....	10
2.2.1. Generalitats del sistema immunitari innat.....	10
2.2.2. Els receptors Toll-like i la seva via de senyalització.....	13
2.3. LES VARIACIONS EN LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA.....	17
2.4. LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA FRONT EL PNEUMOCOC .....	26
2.5. ELS ESTUDIS FUNCIONALS DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ TOLL-IL1R .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓ.....</b>	<b>31</b>
<b>4. HIPÒTESI.....</b>	<b>33</b>
<b>5. OBJECTIUS.....</b>	<b>35</b>
<b>6. METODOLOGIA .....</b>	<b>37</b>
6.1. TIPUS D'ESTUDI I DEFINICIONS .....	37
6.2. VARIABLES RECOLLIDES.....	41
6.3. MÈTODE.....	43
6.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	49
6.5. ASPECTES ÈTICS .....	50
<b>7. RESULTATS.....</b>	<b>53</b>
7.1. ANÀLISI DESCRIPTIVA .....	53
7.1.1. Anàlisi dels controls .....	54
7.1.2. Anàlisi dels casos .....	54

7.1.3. Descripció dels SNPs de les molècules de la via de senyalització TIR (IRAK1, IRAK4, IRAKM i MyD88) en els pacients que han desenvolupat una MPI greu ( <i>objectiu 1.1</i> ) .....	61
7.2. ANÀLISI COMPARATIVA .....	64
7.2.1. Determinar si aquests SNPs s'associen a la presència de MPIG ( <i>objectiu 1.2</i> ) .....	64
7.2.2. Conèixer si aquests SNPs determinen l'evolució dels pacients amb MPIG ( <i>objectiu 1.3</i> ).....	68
7.2.3. Analitzar si la determinació de CD62L és útil com a cribratge inicial dels defectes de senyalització dels TLRs ( <i>objectiu 2.1</i> ).....	79
<b>8. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>83</b>
8.1. ASSOCIACIÓ DE SNPs DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ TIR AMB LA PRESENCIA DE MPIG I AMB PARÀMETRES EVOLUTIUS DELS PACIENTS AMB MPIG .....	83
8.2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE L-SELECTINA .....	91
8.3. LIMITACIONS DE L'ESTUDI .....	93
<b>9. CONCLUSIONS .....</b>	<b>95</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>
<b>11. ANNEXOS.....</b>	<b>111</b>
ANNEX 1: Definicions de Síndrome de Resposta Inflammatory Sistèmica, Infecció, Sèpsia, Sèpsia greu i Xoc sèptic. ....	111
ANNEX 2. <i>Pediatric Risk Mortality Score</i> , versió III (PRISM-III).....	115
ANNEX 3: Formulari de consentiment informat (casos).....	117
ANNEX 4: Formulari de consentiment informat (controls).....	119
ANNEX 5: Certificat d'aprovació del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC). 121	

ANNEX 6: Resultats complets de l'objectiu 1.3 (conèixer si aquests SNPs determinen l'evolució dels pacients amb MPIG).....	123
ANNEX 7: Publicacions i comunicacions derivades de la Tesi.....	145



## **1. LLISTAT D'ABREVIATURES UTILITZADES**

<b>MPI:</b> malaltia pneumocòccica invasiva	<b>ARN:</b> àcid ribonucleic
<b>MPIG:</b> malaltia pneumocòccica invasiva greu	<b>MBL:</b> lecitina d'unió a manosa
<b>SNPs:</b> polimorfismes de nucleòtids simples	<b>LPS:</b> lipopolisacàrid
<b>TLRs:</b> receptors <i>Toll-like</i>	<b>IL-1:</b> interleucina-1
<b>TIR:</b> via de senyalització receptors Toll-like – receptor de la interleucina 1	<b>TNF:</b> factor de necrosi tumoral
<b>IRAK1:</b> quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 1	<b>HSPs:</b> proteïnes de xoc tèrmic
<b>IRAK4:</b> quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 4	<b>HMGB1:</b> factor nuclear <i>high mobility box</i> 1
<b>IRAKM:</b> quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus M	<b>TAK1:</b> quinasa-1 activada pel factor de transformació del creixement
<b>MyD88:</b> proteïna 88 de resposta primària per a la diferenciació mieloide	<b>MAPK:</b> quinasa activada per mitògens
<b>CD62L:</b> L-selectina	<b>SOCS1:</b> proteïna supressora dels senyals citoquímics
<b>SRIS:</b> síndrome de resposta inflamatòria sistèmica	<b>Tollip:</b> proteïna interactiva amb <i>Toll</i>
<b>PRISM-III:</b> Pediatric Risk Score of Mortality, versió III	<b>MyD88s:</b> proteïna 88 de resposta primària per a la diferenciació mieloide (forma alternativa, soluble)
<b>CEIC:</b> comitè ètic d'investigació clínica	<b>TRAF6:</b> factor 6 associat al receptor de TNF
<b>PMAPs:</b> patrons moleculars associats a patògens	<b>TAB2:</b> proteïna 2 lligada a TAK1
<b>RRP:</b> receptor de reconeixement de patrons	<b>NF-κB:</b> factor nuclear kappa B
<b>ADN:</b> àcid desoxiribonucleic	<b>IDP:</b> immunodeficiència primària
	<b>NEMO:</b> modulador essencial del factor nuclear kappa B
	<b>PrCR:</b> proteïna C-reactiva

**PCT:** procalcitonina

**Mal/TIRAP:** proteïna adaptadora similar a MyD88/proteïna adaptadora que conté un domini TIR

**UCIP:** unitat de cures intensives pediàtriques

**CMSP:** cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

**CMI:** concentració mínima inhibidora

**PCR:** reacció en cadena de la polimerasa

**ELISA:** assaig d'immunoabsorció enzimàtica

**p-cru:** valor de p sense ajustar

**p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate*

**DE:** desviació estàndard

**LT:** limfòcits T

**CD4:** subclasse CD4 dels limfòcits T

**CD8:** subclasse CD8 dels limfòcits T

**NK:** limfòcits *natural killer*

**LB:** limfòcits B

**Ig:** immunoglobulina

**C3:** fracció 3 del complement

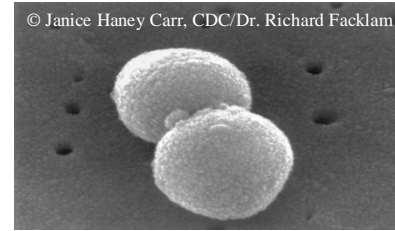
**C4:** fracció 4 del complement

**CH50:** activitat total del complement

**OR:** *odds ratio*

**IC95%:** interval de confiança del 95%

## **2. INTRODUCCIÓ**



### **2.1. MALALTIA PNEUMOCÒCCICA INVASIVA**

La **malaltia pneumocòccica invasiva** (MPI), causada per *Streptococcus pneumoniae* (pneumococ), és una patologia freqüent en el nostre medi. Pot cursar en forma de bacterièmia oculta o formes més greus que comporten una elevada morbi-mortalitat, amb evolució a *exitus* o a seqüeles greus. La incidència de MPI és especialment elevada en menors de 2 anys (51,3 casos/100.000 habitants en el nostre entorn), disminueix dels 2 als 4 anys (26,5 casos/100.000 habitants) i encara més a partir dels 5 anys (4 casos/100.000 habitants), tornant a augmentar en adults majors de 65 anys (1). Habitualment cursa en forma de bacterièmia oculta i té una evolució autolimitada, però quan cursa en forma de pneumònia, sèpsia o meningitis pot comportar una elevada morbi-mortalitat i evolucionar a *exitus* o a seqüeles greus.

El pneumococ és un coc Gram positiu encapsulat. Habitualment es disposa en parelles (diplococ) o en petites cadenes. Aquest bacteri té una àmplia diversitat genètica. Es coneixen més de 94 serotips diferents.

En els últims anys s'han desenvolupat vacunes polisacàrides conjugades contra diversos serotips de pneumococ. L'any 2001 es va comercialitzar la vacuna heptavalent (serotips 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F i 23F). L'any 2009 es va comercialitzar la vacuna decavalent (serotips de l'heptavalent i, a més, serotips 1, 5 i 7F). A partir de l'any 2010 es va comercialitzar la vacuna tridecavalent (serotips de l'heptavalent i, a més, serotips 1, 3, 5, 6A, 7F i 19A).

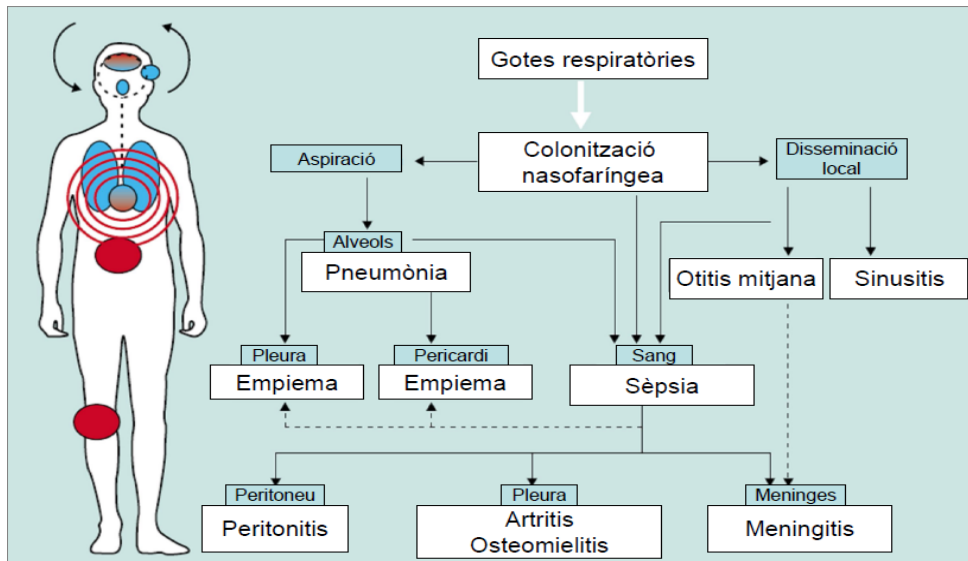


Els serotips del pneumococ estan definits per la càpsula bacteriana, el principal factor de virulència del pneumococ.

La càpsula determina la resistència del pneumococ a la fagocitosi, a l'autòlisi i a la lisi induïda per antibiòtics (2). Altres factors de virulència són: la pneumolisina, una proteïna citotòxica que destrueix les membranes cel·lulars de l'hoste i activa la resposta inflamatòria (2,3); el pilus, que intervé en l'adhesió del pneumococ a les cèl·lules de l'hoste i activa la resposta inflamatòria (4); i les proteïnes de superfície, com la proteïna de superfície A, que actua inhibint l'activació del complement (5), i la PsrP (proteïna pneumocòccica rica en serina), una adhesina que actua en la formació d'agregats bacterians a la nasofaringe i en l'adhesió a les cèl·lules pulmonars (6,7).

No tots els serotips tenen la mateixa capacitat de produir malaltia invasiva. La transmissió del pneumococ es realitza persona a persona, a través de les gotes de les secrecions respiratòries i colonitzant la nasofaringe (**figura 1**). La colonització nasofaríngea és molt freqüent a l'edat pediàtrica, i el pas de colonització a MPI continua essent una incògnita en la qual intervenen components de l'equilibri hoste-patogen. Aquest equilibri varia en funció de la diversitat genètica del pneumococ i de la resposta immunitària de l'hoste, entre altres factors (8).

**Figura 1. Esquema patogènic de la infecció per pneumococ**



Adaptada de: Bogaert D, de Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004;4:144–54. Figura 1, pàgina 145. Modificada de: Obaro S, Adegbola R. *The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. J Med Microbiol* 2002; 51: 98–104

Tot i ésser una malaltia ben coneguda i profundament estudiada, romanen encara moltes incògnites sobre el perquè de la gravetat de la MPI en alguns casos. Probablement un factor determinant siguin les alteracions del sistema immunitari innat (2-4).

## 2.2. EL SISTEMA IMMUNITARI INNAT

### 2.2.1. Generalitats del sistema immunitari innat

Els mecanismes de defensa que es desencadenen al nostre organisme enfront als diferents tipus d'infeccions es concreten en la resposta immunitària innata i l'adquirida. El **sistema immunitari innat** ha estat tradicionalment infravalorat, donat que la seva participació en la resposta immunitària semblava poc rellevant i específica al compararlo amb el sistema immunitari adaptatiu. En l'actualitat, la seva importància, complexitat i especificitat estan ben documentades.

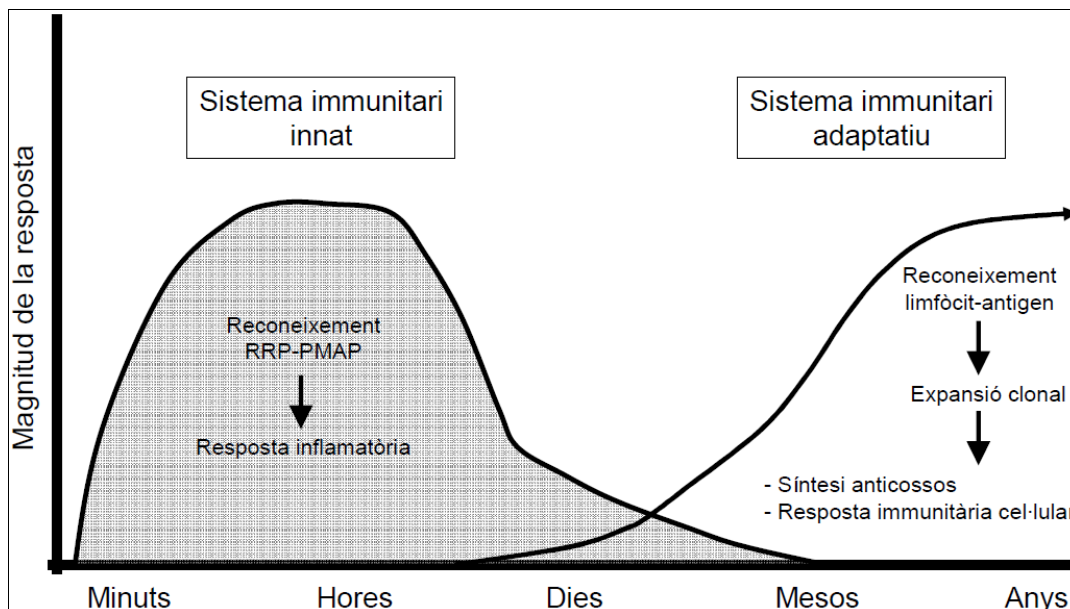
El sistema immunitari innat va aparèixer abans que l'adaptatiu en l'evolució dels éssers vius i, des d'aleshores, la selecció natural s'ha encarregat de modelar una resposta immunitària que és específica front als microorganismes infecciosos aliens a l'hoste. Es creu que la majoria dels éssers vius pluricel·lulars tenen alguna forma de sistema immunitari innat.

A diferència del sistema immunitari adaptatiu, l'especificitat del sistema immunitari innat està codificada genèticament i, per tant, actua de manera immediata, mentre que el primer necessita que els limfòcits es posin en contacte amb l'antigen i es generi una selecció i expansió clonals que tarden dies en produir-se. Per tant, la importància del sistema immunitari innat és cabdal per a contenir la infecció fins que els limfòcits puguin entrar en acció (**figura 2**). Dit d'una altra forma, l'especificitat del sistema immunitari innat s'ha desenvolupat al llarg de l'evolució dels éssers vius, mentre que l'especificitat del sistema immunitari adaptatiu s'ha de desenvolupar *de novo* a cada

individu concret al llarg de la seva vida. També s'ha descobert que el sistema immunitari innat és necessari per orientar la resposta immunitària adaptativa dirigida específicament als microorganismes que no s'hagin neutralitzat en el moment inicial.

L'estratègia del sistema immunitari innat consisteix en reconèixer elements estructurals comuns a diversos microorganismes, anomenats patrons moleculars associats a patògens (PMAPs). Els exemples de PMAPs més coneguts són el lipopolisacàrid, el peptidglicà, l'àcid lipoteicoic, l'àcid desoxirribonucleic (ADN) bacterià, l'àcid ribonucleic (ARN) viral de doble cadena, els manans i els glucans.

**Figura 2. Cronologia i característiques bàsiques de les respostes immunitàries innata i adaptativa.**



Adaptada de: Ishii KJ, Akira S. *Innate Immunity*. A: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, editors. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. Figura 3.1, pàgina 40.

Els receptors del sistema immunitari innat encarregats de reconèixer els PMAPs s'anomenen receptors de reconeixement de patrons (RRP). Aquests receptors són proteïnes que es classifiquen en dos grans grups: RRP secretats circulants i RRP cel·lulars (**taules 1 i 2) (9-12)**).

**Taula 1. RRP secretats circulants.**

<b>RRP</b>	<b>PMAP RECONEGUT</b>	<b>FUNCIÓ</b>
<b>Pèptids antimicrobians</b>		
Defensines	Membrana microbiana	Lisi microbiana, opsonització
Catelicidina		
<b>Colectines</b>		
Lectina d'unió a manosa (MBL)	Manosa microbiana	Activació complement
Proteïna de surfactant A i D	Membrana microbiana	Activació complement
<b>Pentraxines</b>		
Proteïna C-reactiva (PrCR)	Carbohidrats bacterians, fosfolípids	Activació complement

**Taula 2. RRP cel·lulars.**

RRP	PMAP RECONEGUT	FUNCIO
<b>Membrana plasmàtica</b>		
Receptors <i>Toll-like</i> (TLRs) 1, 2, 4, 5, 6	<i>Veure taula 3</i>	Síntesi citocines, activació cèl·lules immunitàries
Receptors escombraire dels macròfags	Paret cel·lular bacteriana	Opsonització
Receptors de manosa dels macròfags	Manosa microbiana	Opsonització
Receptor formil-pèptid	Membrana bacteriana	Opsonització
<b>Membrana endosòmica</b>		
TLR 3, 7, 8, 9, 10	<i>Veure taula 3</i>	Síntesi citocines, activació cèl·lules immunitàries
<b>Citosol</b>		
Receptors <i>NOD-like</i> 1, 2	Peptidoglicans bacterians	Síntesi citocines, activació cèl·lules immunitàries
Receptors <i>RIG-I-like</i>	ARN viral de doble cadena	Síntesi citocines, activació cèl·lules immunitàries

Adaptades de: Liu, AH, Zasloff, MA, Johnston, RB Jr. *Innate immunity. A: Middleton's Allergy: Principles and Practice, 7th ed, Adkinson, NF Jr, Busse, WW, Bochner, BS, et al (Eds), Elsevier 2008. Taula 2.1, pàgina 21.*

**Acrònims:**

**RIG-I:** gen I induïble per àcid retinoic

**2.2.2. Els receptors Toll-like i la seva via de senyalització**

Els **receptors Toll-like (TLRs)** són un tipus de RRP cel·lular (veure **taula 2**). La família dels TLRs té un paper clau en l'inici de la resposta immunitària innata i és el paradigma del binomi de reconeixement RRP-PMAP. En l'espècie humana s'han descrit 10 TLRs diferents, cadascun dels quals reconeix un repertori diferent i limitat d'epítops microbians (PMAP) (**taula 3**). De forma conjunta, els TLRs són capaços de reconèixer pràcticament qualsevol microorganisme patogen.

**Taula 3. Els TLRs i els seus lligands.**

TLR	LOCALITZACIÓ	LLIGANDS (PMAP RECONEGUTS)
TLR1	Membrana plasmàtica	Triacil lipopèptids
TLR2	Membrana plasmàtica	Peptidoglicans Hemaglutinina Fosfolipomanà Zymosan
TLR3	Endosoma	ARN viral
TLR4	Membrana plasmàtica	Lipopolisacàrid Fosfolípids Proteïna de fusió (VRS) Pneumolisina (pneumococ)
TLR5	Membrana plasmàtica	Flagelina
TLR6	Membrana plasmàtica	Diacil lipopèptids Àcid lipoteicoic
TLR7	Endosoma	ARN viral i bacterià Anàlegs purínics
TLR8	Endosoma	ARN viral Anàlegs purínics
TLR9	Endosoma	ADN viral i bacterià
TLR10		Desconegut

Adaptada de: Kumar H, Kawai T, Akira S. *Pathogen recognition by the innate immune system. Int Rev Immunol 2011 Feb;30(1):16-34. Taula 1, pàgina 18*

**Acrònims:**

**TLR:** receptor *Toll-like*; **PMAP:** patrons moleculars associats a patògens; **ARN:** àcid ribonucleic; **ADN:** àcid desoxiribonucleic; **VRS:** virus respiratori sincitial

Els TLRs reconeixen els PMAP del microorganisme en qüestió, fet que genera una traducció de senyal a nivell intracel·lular on s'inicia la cascada de senyalització per a començar la resposta. Aquesta via de senyalització (comuna a tots els TLRs a excepció de TLR3 i, parcialment, TLR4) rep el nom de **via de senyalització Toll-IL1R (TIR)**, degut a la similitud entre la via de senyalització dels TLRs i la del receptor de la interleucina 1 (IL1R) (**figura 3**) (**13**).

Aquesta cascada precisa d'altres molècules:

1. Adaptadores: MyD88
2. Activadores: proteïn-kinases activadores com IRAK1, IRAK2 i IRAK4
3. Transductores: TRAF6
4. Efectores: NF-kB, MAPK

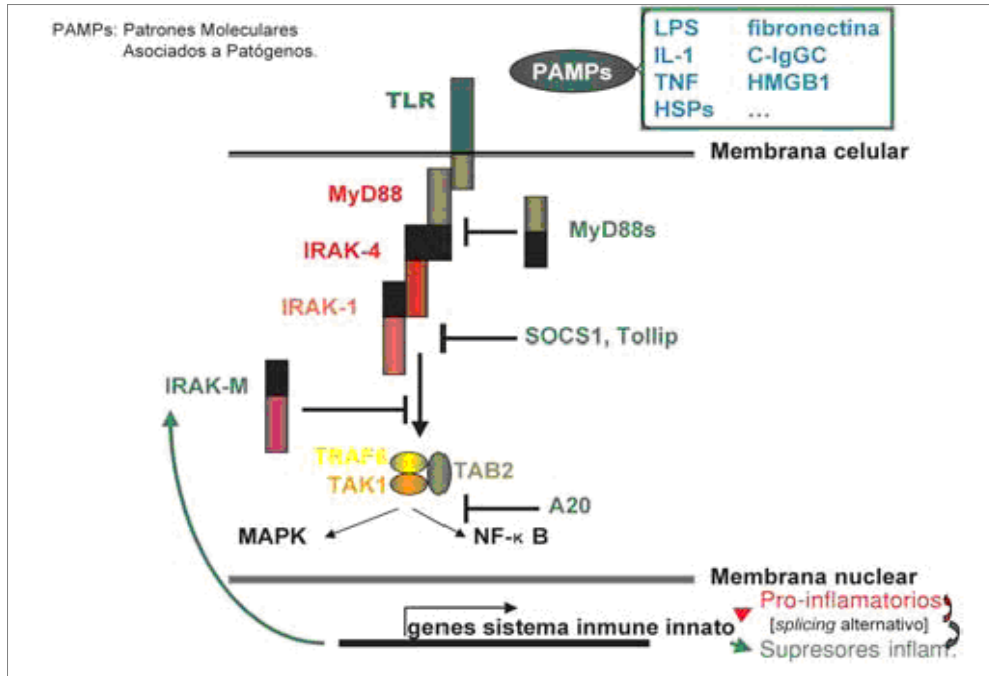
Les fases d'aquesta resposta són:

1. Multimerització dels TLRs pels PMAPs (LPS, IL-1, TNF, fibronectina...) que recluten a MyD88 i IRAK.
2. Formació de complexos de proteïn-kinases fosforilades (IRAK4-IRAK1) que els allibera de MyD88
3. Activació de proteïnes transductores TRAF6-TRAK1-TAB2, les quals estimulen NF-kB (factors de transcripció de citocines pro-inflamatòries) i MAPK (anti-inflamatòries)

Els limitadors d'aquesta resposta són: MyD88s, SOCS, Tollip, IRAKM i A20.



**Figura 3. Esquema de la via de senyalització intracel·lular dels TLRs (via de senyalització Toll-IL1R o TIR).**



Adaptada de:

García Barreno P. *Inflamación e inmunidad innata*. A: Cascales Angosto M, García Barreno P (eds). *Bioquímica y Fisiopatología del Sistema Inmune*. Madrid: Instituto de España, 2007: pag 89. Modificada de: Kobayashi KS, Flavell RA. *Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system*. *J Leukoc Biol* 2004;75: fig 1, pag 429.

#### Acrònims:

**LPS:** lipopolisacàrid; **IL-1:** interleucina-1; **TNF:** factor de necrosi tumoral; **HSPs:** proteïnes de xoc tèrmic; **HMGB1:** factor nuclear *high mobility box 1*; **TLR:** receptor *toll-like*; **MyD88:** proteïna 88 de resposta primària per a la diferenciació mieloide; **TAK1:** quinasa-1 activada pel factor de transformació del creixement; **MAPK:** quinasa activada per mitògens; **IRAK1:** quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 1; **IRAKM:** quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus M (inhibidora); **IRAK4:** quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 4; **SOCS1:** proteïna supressora dels senyals citoquímics; **Tollip:** proteïna interactiva amb *Toll*; **TRAF6:** factor 6 associat al receptor de TNF; **MyD88s:** proteïna 88 de resposta primària per a la diferenciació mieloide (forma alternativa, soluble); **TAB2:** proteïna-2 lligada a TAK1; **NF-κB:** factor nuclear-κB

### 2.3. LES VARIACIONS EN LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA

El sistema immunitari es desenvolupa al llarg dels primers mesos i anys de vida, per la qual cosa el tipus i la magnitud de la resposta immunitària varien amb l'edat. Diferents estudis i revisions han constatat que la lluita contra les infeccions recau en el sistema immunitari innat en el període neonatal i primers anys de vida, ja que el sistema immunitari adaptatiu tarda més temps en estructurar-se de forma eficient. D'altra banda, també s'ha vist que el sistema immunitari innat encara és immadur en el període neonatal i que madura posteriorment. Finalment, el sistema immunitari acaba de desenvolupar-se de forma completa cap els 10 anys d'edat. **(14-22)**.

Per una altra banda, el sistema immunitari està sotmès a variacions genètiques interindividuais que poden tenir conseqüències funcionals. En concret, la resposta immunitària innata està directament relacionada amb la funció de diferents elements com els descrits prèviament, la disfunció dels quals condicionarà una susceptibilitat a certes malalties infeccioses dels humans. Algunes infeccions que es presenten en pacients prèviament sans han demostrat, en alguns casos, una agregació familiar que posteriorment ha permès la identificació de defectes genètics en el sistema immunitari, amb herència mendeliana simple, que s'engloben dins els concepte de les immunodeficiències primàries (IDP). Aquesta base genètica d'algunes infeccions ha introduït l'anomenada "teoria genètica de les malalties infeccioses" en el món de la immunologia i de les malalties infeccioses. Aquesta teoria, promoguda pel Dr. Jean-Laurent Casanova **(23)**, busca identificar la base genètica de les formes greus de malalties infeccioses comunes.

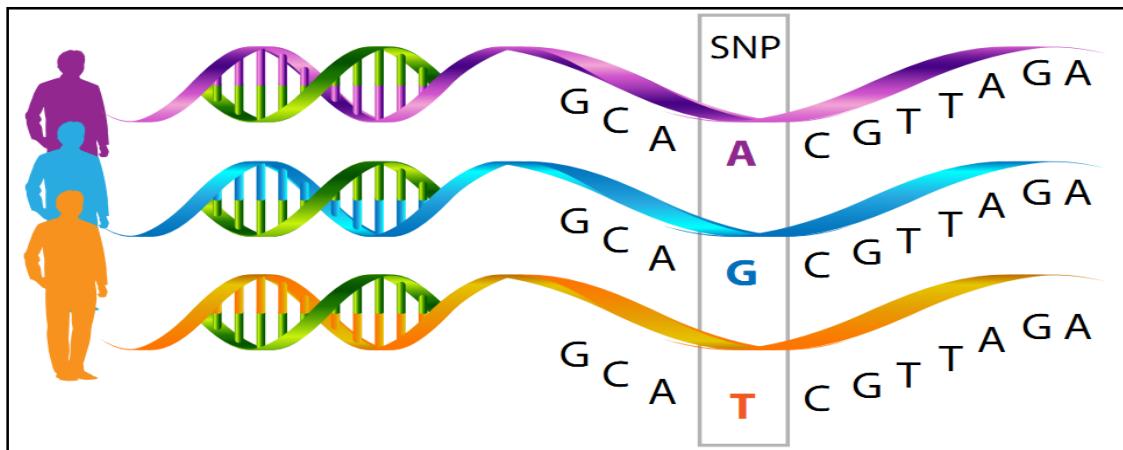
En les formes clàssiques d'IDP, els nens són susceptibles a una gran varietat de microorganismes i solen ser pacients greument simptomàtics (un gen, múltiples infeccions).

Alguns exemples d'aquestes formes clàssiques d'IDP són l'asplènia congènita, els defectes a la via d'activació clàssica del complement i defectes en la resposta dels anticossos vers antígens polisacàrids (24). Aquestes IDP afecten la fagocitosi esplènica dels bacteris encapsulats. Per aquest motiu, predisposen a MPI però també a infeccions greus causades per altres bacteris encapsulats (*Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae* tipus B, *Salmonella*, *Neisseria meningitidis*).

Darrerament s'han descobert altres IDP degudes a mutacions genètiques que impliquen a la via de senyalització intracel·lular TIR. Els exemples més importants d'aquestes IDP són la displàsia ectodèrmica anhidròtica amb immunodeficiència (causada per defectes del modulador essencial del factor nuclear  $\kappa$ B (NEMO) o per increment en la funció de l'inhibidor del factor nuclear  $\kappa$ B); el defecte de quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 4 (IRAK4) o el defecte de la proteïna 88 de resposta primària per a la diferenciació mieloide (MyD88). Aquestes noves immunodeficiències, a diferència de les formes clàssiques abans descrites, condicionen una susceptibilitat a un espectre estret d'infeccions per bacteris Gram-positius: concepte d'un gen, poques infeccions (14-17,25), essent el pneumococ el microorganisme implicat amb més freqüència i la causa principal de mort dels pacients afectes.

Les variacions genètiques més freqüents que existeixen són els **polimorfismes genètics** (*single nucleotide polymorphisms*, en endavant SNPs) (**figura 4**):

**Figura 4. Polimorfisme genètic.**



Adaptada de: <http://www.biogeniq.ca/snp>

Els SNPs es defineixen com a posicions del genoma on existeix variació d'un nucleòtid amb una freqüència d'almenys un 1% de la població. De manera conceptual, els SNPs es diferencien de les mutacions en què els primers no causen una malaltia *per se*. S'estima que existeixen milions de SNPs en els éssers humans. En els darrers anys s'està treballant per catalogar aquestes variacions genètiques amb l'objectiu de conèixer quines d'elles causen una alteració de l'expressió i/o de la funció d'un gen, la qual cosa podria estar relacionada amb predisposició a malalties o a diferències en l'evolució clínica de les mateixes. La base de dades de SNPs més gran és la del *National Center for Biotechnology Information, United States National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Els SNPs poden estar localitzats als exons (zones codificants del gen), introns (zones no codificants del gen), regions promotores, amplificadores i regions intergèniques. Només una petita proporció dels SNPs està situada als exons, i d'entre ells, només la meitat causen canvis d'aminoàcids a la proteïna expressada. Aquests SNPs s'anomenen “no-sinònims” (nsSNP). Els SNPs que no causen canvis d'aminoàcids a la proteïna expressada s'anomenen “sinònims” (sSNP). A pesar de no canviar l'estructura de la proteïna, els sSNP també poden causar canvis en l'expressió genètica.

Els **haplotips** són combinacions de SNPs que es transmeten a la vegada. Es poden determinar a través de les anomenades anàlisis de desequilibri de lligament. Aquestes anàlisis són una mesura estadística de l'associació existent a la població entre SNPs de diferents *loci*. Aleshores, es diu que hi ha desequilibri de lligament quan s'observen determinades combinacions de SNPs amb una freqüència major a la que s'esperaria observar en una associació aleatòria.

El consorci internacional HapMap (<http://www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) ha creat un mapa d'haplotips mitjançant l'estudi de milions de SNPs a centenars d'individus de procedència geogràfica diversa. Gràcies a aquest projecte s'han pogut determinar SNPs que són representatius de molts haplotips. Aquests SNPs reben el nom de *tag*-SNP (de l'anglès, SNP “etiqueta”) (26).

A la via intracel·lular de la resposta immunitària mediada pels TLRs (via de senyalització TIR) (**figura 3**) hi ha determinades proteïnes que es consideren punts clau en la senyalització. Per aquest motiu, qualsevol variació d'aquestes proteïnes pot condicionar l'esmentada senyalització. De fet, les noves IDP, recentment descrites,

causades per mutacions a les proteïnes IRAK4 i MyD88 (les quals causen una abolició de la funció de la via TIR), condicionen una susceptibilitat major a un espectre sorprenentment estret d'agents infecciosos i reforcen el concepte novedós “un gen, poques infeccions”. D'entre aquestes infeccions, destaca la susceptibilitat descrita a la MPI (14-17,25). Aquesta abolició de la funció de la via TIR és deguda necessàriament a la presència de mutacions en ambdós al·lells (malaltia autosòmica recessiva). Tot i així, l'impacte de defectes funcionals més parcials, com podria ser el cas dels SNPs, no ha estat avaluada de forma sistemàtica en la MPIG en pacients en edat pediàtrica.

A continuació s'exposen els gens d'algunes de les proteïnes amb major importància en la via de senyalització TIR. També s'exposen alguns SNPs d'aquests gens, freqüents en la població europea, amb transcendència clínica descrita a la bibliografia.

La informació sobre els SNPs està disponible a la base de dades de SNPs del *National Center for Biotechnology Information, United States National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Per a les freqüències al·lèliques, s'ha tingut en compte la població de referència d'origen europeu (HapMap CEU, del *HapMap Project*, disponible a <http://www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **Gen IRAK1:**

El gen IRAK1 està situat al cromosoma X, concretament a la localització Xq28. Codifica la proteïna IRAK1 (quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 1), la qual forma part del complex IRAK dins la via de senyalització TIR (**figura 3**). La

importància de les proteïnes del complex IRAK com a punt crític d'aquesta via de senyalització està ben definida a la bibliografia (27).

Els SNPs **rs1059701**, **rs1059702** i **rs1059703** formen part d'un haplotip. Tots tres estan situats a regions codificants del gen (exons). Diversos treballs han descrit que la variabilitat d'aquest haplotip condiciona una major activació de NF- $\kappa$ B i una major gravetat del xoc sèptic en adults (28-30). De cadascun d'ells en destaca:

**- rs1059701:**

Està situat a la posició 153284483 del cromosoma. Es defineix per un canvi de citosina per timina. És sinònim, és a dir, no modifica la seqüència d'aminoàcids de la proteïna. Al·lels possibles: C, T. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: C=0,280.

**- rs1059702:**

Està situat a la posició 153284192 del cromosoma. Canvia citosina per timina. Aquest SNP és no-sinònim, ja que modifica la seqüència d'aminoàcids de la proteïna canviant una fenilalanina per una serina a la posició 196 (Phe196Ser). Al·lels possibles: C, T. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: T=0,204.

**- rs1059703:**

Està situat a la posició 153278829 del cromosoma. Canvia citosina per timina. També és no-sinònim, ja que modifica la seqüència d'aminoàcids de la proteïna canviant una serina per una leucina a la posició 532 (Ser532Leu). Al·lels possibles: C, T. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: C=0,225.

**Gen IRAKM:**

Situat al cromosoma 12 (12q14.3). Codifica la proteïna IRAKM (quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus M), la qual forma part del complex IRAK dins la via de

senyalització TIR (**figura 3**). La importància de les proteïnes del complex IRAK com a punt crític d'aquesta via de senyalització està ben definida a la bibliografia (**27**).

Els SNPs **rs1624395** i **rs1370128** formen part d'un haplotip. S'ha descrit la influència que té la variabilitat d'aquest haplotip en el desenvolupament d'asma d'inici precoç (**31,32**).

**- rs1624395:**

Situat a la posició 66618216 del cromosoma. Canvia una adenina per una guanina. Està localitzat a un intró. Al·lels possibles: A, G. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: A=0,434.

**- rs1370128:**

Situat a la posició 66618638 del cromosoma. Canvia una citosina per una timina. Està localitzat a un intró. Al·lels possibles: C, T. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: T=0,442.

**Gen IRAK4:**

Situat al cromosoma 12 (12q12). Codifica la proteïna IRAK4 (quinasa associada al receptor de la IL-1 tipus 4), la qual forma part del complex IRAK dins la via de senyalització TIR (**figura 3**). La importància de les proteïnes del complex IRAK com a punt crític d'aquesta via de senyalització està ben definida a la bibliografia (**27**).

Concretament, en el cas d'IRAK4, s'han definit mutacions que en condicionen un dèficit i, per tant, una alteració de la via de senyalització TIR que provoca una menor producció de citocines pro inflamatòries i una major susceptibilitat a infeccions per bacteris piogènics concrets (**14,15**).



A continuació s'exposen les característiques dels SNPs **rs1141168**, **rs4251513** i **rs1461567**.

**- rs1141168:**

Situat a la posició 44182706 del cromosoma, a la zona 3'UTR del gen (regió no traduïda 3'). Aquesta zona és important de cara a la regulació de l'expressió del gen, ja que afecta la poli-adenilació, l'eficiència de la translació i l'estabilitat de l'ARNm (àcid ribonucleic missatger). Canvia adenina per guanina. Al·lels possibles: A, G. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: A=0,464.

**- rs4251513:**

Situat a la posició 44174204 del cromosoma, a un intró. Canvia citosina per guanina. Al·lels possibles: C, G. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: 0,500. S'ha descrit major risc d'infeccions per bacteris Gram-positius i menor resposta inflamatòria en pacients amb un haplotip determinat, del qual aquest SNP forma part (33). També s'ha observat una associació d'aquest SNP amb nivells elevats d'IgE a pacients amb rino-sinusitis crònica i asma (34).

**- rs1461567:**

Situat a la posició 44164689 del cromosoma, a un intró. Canvia citosina per timina. Al·lels possibles: C, T. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: T=0,301. S'ha observat una associació d'aquest SNP amb nivells elevats d'immunoglobulina E a pacients amb rino-sinusitis crònica i asma (34).

### **Gen MyD88:**

Situat al cromosoma 3 (3p22). Codifica la proteïna MyD88 (proteïna 88 de resposta primària per a la diferenciació mieloide). Aquesta proteïna s'uneix al complex TLR-PMAP, iniciant la cascada de senyalització intracel·lular. A l'igual que IRAK4, s'han definit mutacions que condicionen una menor resposta inflamatòria i una major susceptibilitat a infeccions per microorganismes concrets (16,17). D'altra banda, s'han descrit SNPs de MyD88 que provoquen menor resposta inflamatòria (35).

A continuació s'exposen les característiques dels SNPs **rs7744** i **rs6853**.

#### **- rs7744:**

Situat a la posició 38184021 del cromosoma, a la zona 3'UTR del gen (regió no traduïda 3'). Canvia adenina per guanina. Al·lels possibles: A, G. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: G=0,146.

#### **- rs6853:**

Situat a la posició 38184370 del cromosoma, a la zona 3'UTR del gen (regió no traduïda 3'). Canvia adenina per guanina. Al·lels possibles: A, G. Freqüència al·lèlica menor a població *HapMap-CEU*: G=0,115.

## 2.4. LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA FRONT EL PNEUMOCOC

Els mecanismes de defensa de l'organisme humà front al pneumococ s'inicien a l'epiteli respiratori. A més de la barrera mucociliar que elimina constantment microorganismes de la seva superfície, allibera citocines, quimiocines i pèptids antimicrobians com el lisozim, defensines i catelicidines. Posteriorment, el pneumococ és reconegut pels receptors de reconeixement de patrons del sistema immunitari innat (RRP), com la proteïna C-reactiva (PrCR), colectines i els TLRs.

En el cas concret dels TLRs, el pneumococ és reconegut pels TLRs 1, 2, 4, 6 i 9. TLR2 reconeix components de la paret cel·lular, com l'àcid lipoteicoic, les lipoproteïnes i el pilus 1. També s'ha relacionat amb la translocació bacteriana a través de la mucosa nasal (36-39). TLR4 està implicat en el reconeixement de la pneumolisina (40,41), mentre que TLR9 reconeix fragments d'ADN del pneumococ (42,43). Si bé els TLRs que intervenen en el reconeixement del pneumococ són varis o redundants, la via de senyalització comuna TIR és única i, per tant, és crítica per a que els TLRs puguin induir la resposta inflamatòria per a defensar-se de la MPI (6,27).

Altres components del sistema immunitari innat també participen de la defensa front al pneumococ, com el sistema del complement, sobretot a través de la via clàssica. De forma conjunta i sinèrgica, tots aquests components opsonitzen el pneumococ.

Aleshores, el pneumococ és fagocitat en primer lloc pels macròfags alveolars (en el cas de la infecció respiratòria). Si l'inòcul bacterià és gran, les cèl·lules fagocítiques principals passen a ser els neutròfils, mentre que els macròfags passen a tenir funcions

d'eliminació de neutròfils apoptòtics. En el cas de la bacterièmia, la fagocitosi dels pneumococs opsonitzats es produeix a la melsa.

Posteriorment s'inicia la resposta immunitària adaptativa. Els antigens polisacàrids capsulars del pneumococ són reconeguts pels limfòcits B i es produeixen anticossos específics (24,44,45).

Gaschignard *et al* estudiaren un grup de 163 pacients amb MPI i trobaren immunodeficiències associades en un 10% d'ells (dèficit de producció d'anticossos, asplènia, dèficit de complement i un cas de disfunció de la via TIR causada per una mutació a MyD88) (46). Andres *et al* estudiaren un pacient de 9 mesos d'edat amb una sèpsia pneumocòccica i descobriren un defecte funcional de la via TIR, causat per una mutació defectiva del gen IRAK4 (47). Alsina *et al* estudiaren un grup de 10 pacients amb MPI recurrent i trobaren que un d'ells tenia un defecte en la senyalització de la via TIR, el qual es corresponia amb una mutació defectiva del gen MyD88 (48). Per una altra banda, Ingels *et al* van estudiar un grup de 22 pacients amb MPI recurrent i un d'ells mostrava una disfunció de la senyalització TIR, sense trobar cap mutació de la mateixa via (49). Prèviament, Hirschfeld *et a.* van avaluar la rellevància dels defectes dels TLRs en nens amb antecedent de MPI, analitzant la funcionalitat dels TLRs sense trobar alteracions (50). Es tractava, però, de pacients amb MPI no greu i no es van valorar els SNPs, els quals ja han estat descrits en els darrers anys com a factors predisposants d'infeccions.

Exemples d'aquests SNPs són Arg753Gln de TLR2, associat amb una susceptibilitat major a la tuberculosi (51); Asp299Gly de TLR4, associat a malaltia meningocòccica

greu **(52)**; Arg753Gln de TLR2 i Asp299Gly de TLR4, associats a una pitjor evolució de la sèpsia a pacients adults crítics **(53)**; Asp299Gly i Thr399Ile de TLR4, associats a brucel·losi i malària greu respectivament i ambdós protectors vers la MPI **(54)**. De la via de senyalització intracel·lular, s'han descrit SNPs en alguns gens que codifiquen inhibidors de NF- $\kappa$ B (NFKBIA, NFKBIL2, NFKBIZ i NFKBIE) i condicionen una major susceptibilitat a MPI **(55-57)** (estudis realitzats en població adulta). També s'ha descobert un SNP protector vers diverses infeccions, inclosa la MPI, en el gen que codifica la proteïna Mal/TIRAP (proteïna adaptadora similar a MyD88/proteïna adaptadora que conté un domini TIR), un adaptador necessari per la senyalització dels TLRs 2 i 4 **(58)**. Un haplotip concret d'IRAK4 s'ha relacionat amb la infecció per bacteris Gram positius en pacients adults crítics **(33)**. D'altra banda, s'han detectat SNPs en IRAK1 que s'associen a més disfunció multi orgànica i mortalitat en la sèpsia **(28,29)**. Aquests SNPs s'han estudiat en població adulta. Altres SNPs, a IKK-alfa, IRAKM i IRAK4, s'han associat a una alteració de la resposta immunològica en processos com el destret respiratori tipus adult, l'asma i l'increment de la immunoglobulina E **(31,34,59)**. Tots aquests SNPs condicionen un defecte de resposta inflamatòria sistèmica, a excepció dels associats a destret respiratori, asma i increment d'immunoglobulina E, que condicionen un excés de resposta inflamatòria.

## 2.5. ELS ESTUDIS FUNCIONALS DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ TOLL-IL1R

L'estudi funcional de la senyalització mediada pels TLRs s'ha basat clàssicament en l'anàlisi de la producció de citocines pro inflammatòries després de l'estimulació *in vitro* dels TLRs amb agonistes específics de cadascun d'ells, procediment lent i costós. Aquest fou el mètode emprat per Hirschfeld *et al* en el seu estudi, comentat abans (50).

En els últims anys s'han desenvolupat tècniques més senzilles, com la determinació de la pèrdua d'expressió de la L-selectina (CD62L) a la superfície dels granulòcits quan són estimulats amb diferents agonistes dels TLRs, proposada per von Bernuth *et al* (60). Aquesta selectina és necessària per la interacció de les cèl·lules amb l'endoteli vascular en les fases inicials de la inflamació. Un cop s'ha produït la interacció inicial, i quan les cèl·lules reben un senyal d'activació (per exemple, a través de TLRs), CD62L és alliberada de la superfície cel·lular per un mecanisme anomenat *shedding* (61). La pèrdua d'expressió de CD62L en superfície indicaria, de manera indirecta, el bon funcionament de la senyalització inflamatòria, també a través dels TLRs (60). Recentment, aquesta tècnica s'ha utilitzat com a cribratge inicial d'alteracions de la via de senyalització TIR, mitjançant l'estimulació *in vitro* dels granulòcits amb agonistes específics dels TLRs i l'anàlisi posterior de la variació del nivell d'expressió de CD62L, com en els estudis realitzats amb pacients amb MPI greu o recurrent d'Andres *et al*, Alsina *et al* i Ingels *et al* (47-49). Tot i que són molts els factors intercurrents que poden afectar l'expressió de CD62L, sembla doncs clar que l'activació via TLRs *in vivo* hauria d'induir canvis en els nivells d'expressió d'aquesta molècula en funció de l'activació rebuda. No obstant, fins el moment actual no s'ha avaluat aquesta expressió de CD62L

en el curs de la MPIG, comparant els nivells d'expressió durant la infecció aguda amb els nivells "basals" (els que té l'individu abans de la infecció o una vegada la infecció ja està clarament resolta). D'alguna manera, aquesta valoració "*in vivo*" dels nivells d'expressió de CD62L en fase aguda podria substituir la comparació post-estimulació *in vitro* per lligands específics dels TLRs. Aquesta aproximació modificada de l'estudi de l'expressió de CD62L, que s'anomena "estudi del nivell d'expressió de CD62L *in vivo* en situació aguda de MPIG", podria ser útil i més senzilla (tot i acceptant que els resultats serien molt genèrics) en l'avaluació de la funció TIR en pacients amb MPIG.

### **3. JUSTIFICACIÓ**

L'abordatge de les malalties infeccioses greus està canviant en els darrers anys. El descobriment de SNPs i mutacions a les proteïnes de la via de senyalització TIR que condicionen una major susceptibilitat a algunes infeccions ha obert una nova línia de recerca en la susceptibilitat genètica a les malalties infeccioses. La determinació de l'existència d'altres SNPs en la via de senyalització, en el cas de la MPI, permetria descriure noves variabilitats funcionals del sistema immunitari, així com estratificar el risc individual de patir la malaltia per poder definir estratègies concretes en l'actitud vers els pacients afectes.

D'altra banda, si es confirma la utilitat de l'anàlisi del nivell d'expressió de CD62L utilitzant com a estímul la pròpia infecció aguda (i no lligands específics dels TLRs), com a forma ràpida de detecció de defectes de la via de senyalització TIR en pacients amb MPIG, aquesta tècnica podria usar-se de forma rutinària per estratificar els pacients amb aquesta i altres infeccions bacterianes greus, donat que es tracta d'un procediment senzill i relativament econòmic.





#### **4. HIPÒTESI**

El desenvolupament d'una MPI greu, única o recurrent, en el pacient pediàtric sense immunodeficiència coneguda, podria estar condicionada per l'existència de SNPs en les regions crítiques de la via de senyalització intracel·lular de la resposta immunitària innata mediada pels TLRs. L'existència d'aquests SNPs podria induir una variació en aquestes senyalitzacions i condicionar l'evolució i el pronòstic de la infecció. L'estudi del nivell d'expressió de CD62L *in vivo* podria ser útil com a cribratge inicial dels defectes dels TLRs.



## **5. OBJECTIUS**

### **Objectius de l'estudi dels SNPs en la via de senyalització TIR:**

**Objectiu 1.1.** Descriure els SNPs de les proteïnes de la via de senyalització TIR (IRAK1, IRAK4, IRAKM i MyD88) en els pacients que han desenvolupat una MPI greu (MPIG).

**Objectiu 1.2.** Determinar si aquests SNPs s'associen a la presència de MPIG.

**Objectiu 1.3.** Conèixer si aquests SNPs determinen l'evolució dels pacients amb MPIG.

### **Objectiu de l'estudi de l'expressió de la L-selectina:**

**Objectiu 2.1.** Analitzar si la determinació de la L-selectina és útil com a cribratge inicial de les variacions de funció de la via de senyalització TIR als pacients amb MPIG.



## **6. METODOLOGIA**

### **6.1. TIPUS D'ESTUDI I DEFINICIONS**

Estudi prospectiu observacional de casos i controls.

**Casos:** es va calcular estadísticament una mostra de 60 pacients en base a la incidència de MPI a l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (62) i a la freqüència dels SNPs a estudiar en la població general.

**Controls:** mitjançant determinacions analítiques ambulatories, es van estudiar 120 pacients sense patologia infecciosa aguda, immunodeficiència coneguda i que no haguessin estat diagnosticats prèviament d'una MPI. Les extraccions analítiques havien estat programades per algun altre motiu no relacionat amb patologia infecciosa i/o immunològica.

Per tal de respondre als objectius, el plantejament de l'estudi va ser el següent (desglosat per objectius):

- 1.1. Anàlisi del genotip dels SNPs seleccionats als casos i als controls.
- 1.2. Comparació de la presència d'aquests SNPs en els casos i en els controls.
- 1.3. Anàlisi de l'evolució dels casos en relació als SNPs detectats.
- 2.1. Determinació de la variació de l'expressió de CD62L a neutròfils, limfòcits i monòcits en els pacients amb MPIG, en fase aguda i fase basal, i comparació dels valors.

**Reclutament dels casos i controls:**

Els casos van ser pacients ingressats a Unitat d'Hospitalització de Pediatria o a la Unitat de Cures Intensives Pediàtriques (UCIP) de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona durant l'any 2010. Els controls van ser pacients que havien acudit a realitzar-se una extracció sanguínia de rutina programada a les Consultes Externes del Laboratori d'Extraccions de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

**Criteris d'inclusió:**

- Episodi, únic o recurrent, de MPIG.
- Pacients menors de 10 anys d'edat.

**Criteris d'exclusió:**

- IDP coneguda (humoral, cel·lular, fagocitària, de complement, asplènia funcional).
- Immunodeficiència secundària coneguda (infecció pel virus de la immunodeficiència humana, fístula de líquid cefaloraquídi, síndrome nefròtica, malaltia cardiopulmonar, asplènia funcional, implant coclear).
- No acceptació del consentiment informat.
- Manca d'accessos vasculars o no realització d'anàlisi sanguínia per altres motius.

**Definició de MPIG:**

- Aïllament del pneumococ per cultiu o detecció del seu material genètic mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (gen de la pneumolisina

(ply) i un gen capsular) en una mostra habitualment estèril (sang, líquid cefaloraquídi, líquid pleural, líquid articular o líquid peritoneal).

- Signes clínics de gravetat definits per la presència de síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SRIS) definida per la *International pediatric sepsis consensus conference* (30) (**annex 1**):

1. Temperatura central (oral, rectal, vesical o sensor intravenós central)  $>38,5$  °C o  $<36$  °C.
2. Taquicàrdia (freqüència cardíaca  $>2$  DE per sobre el valor normal per l'edat en absència d'estímuls externs).  
En menors de 12 mesos s'inclou també bradicàrdia (freqüència cardíaca  $< p10$  del valor normal per edat).
3. Taquipnea (freqüència respiratòria  $>2$  DE per sobre el valor normal per edat o necessitat de ventilació mecànica no secundària a patologia neuromuscular o anestèsia).
4. Leucocitosi o leucopènia segons edat, o  $>10\%$  de neutròfils immadurs.

- Es defineix MPIG recurrent com a la presència de 2 o més episodis de MPIG en un mateix pacient amb una separació d'almenys un mes.

### **Selecció dels SNPs a analitzar:**

Els criteris de selecció van ser els següents:

- Proteïnes de la via de senyalització TIR, les quals, per tant, constitueixen punts crítics en la cascada de senyalització dels TLRs.



- Freqüència dels SNPs en la població general (major del 5%) per tal de poder obtenir resultats significatius segons la mida estimada de la mostra.
- Rellevància clínica descrita a la bibliografia, en forma de susceptibilitat a infeccions o malalties inflamatòries.
- Situació del SNP en el gen corresponent. Es van prioritzar els situats als exons i, dels intrònics, els situats en posicions promotores o reguladores.

La informació sobre els SNPs està disponible a la base de dades de SNPs del *National Center for Biotechnology Information, United States National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Per a les freqüències al·lèliques, es va tenir en compte la població de referència del *HapMap Project*, disponible a: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>.

Els SNPs seleccionats van ser els següents:

**IRAK1:** rs1059701, rs1059702, rs1059703.

**IRAKM:** rs1624395, rs1370128.

**IRAK4:** rs1141168, rs4251513, rs1461567.

**MyD88:** rs7744, rs6853.

## 6.2. VARIABLES RECOLLIDES

### **Variables independents:**

- SNPs esmentats de les proteïnes de la via de senyalització TIR : IRAK1, IRAKM, IRAK4 i MyD88.
- Nivell d'expressió de CD62L a la superfície dels neutròfils, limfòcits i monòcits en la fase aguda de la infecció i en fase basal.

### **Resta de variables:**

- Demogràfiques : edat, sexe, ètnia, arbre genealògic d'almenys 3 generacions.
- Perinatològiques : edat gestacional, pes al naixement, caiguda del cordó umbilical.
- Calendari vacunal i tolerància a les vacunes administrades. La vacuna antipneumocòccica inclosa com a opcional al calendari vacunal durant el període d'estudi era la polisacàrida conjugada heptavalent.
- Antecedents patològics: historial d'infeccions i tractaments rebuts.
- Dades clíniques, analítiques i microbiològiques de la MPIG:
  - o Recompte leucocitari i fórmula manual.
  - o Reactants de fase aguda: proteïna C reactiva (PrCR), procalcitonina (PCT).
  - o Gradació segons escales internacionals definides a la *International pediatric sepsis consensus conference* (síndrome de resposta inflamatòria sistèmica, sèpsia, sèpsia greu, xoc sèptic, síndrome de disfunció multiorgànica).

- Evolució: temps de resolució de la febre i de normalització dels reactants de fase aguda.
- Variables microbiològiques: serotip de pneumococ.
- Valoració gravetat: puntuació de l'escala *Pediatric Risk of Mortality Score* – versió III (PRISM-III) (63,64) (annex 2), necessitat ventilació mecànica invasiva i no invasiva, necessitat de medicació inotròpica, necessitat d'ingrés a UCIP (i duració dels mateixos).
- Estudi immunològic en fase basal: hemograma, detecció de la presència de cossos de Howell-Jolly a sang perifèrica, poblacions limfoides, immunoglobulines, complement, isohemaglutinines i antigens vacunals.

### 6.3. MÈTODE

#### **Àmbit de treball:**

L'àmbit de treball en la selecció, diagnòstic i seguiment dels casos va ser la Unitat d'Hospitalització de Pediatria i la UCIP de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. L'anàlisi de l'expressió de CD62L el va realitzar el doctorand al laboratori d'Hematologia de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona amb les tècniques citades a continuació. L'aïllament i determinació del serotip de pneumococ es va portar a terme als laboratoris de Bacteriologia i Microbiologia Molecular de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona amb les tècniques citades a continuació. L'estudi immunitari basal es va realitzar al laboratori d'Immunologia de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. La separació de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) i la criopreservació de les mateixes les va realitzar el doctorand al laboratori de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. L'anàlisi dels SNPs es va realitzar al Centro Nacional de Genotipado (CEGEN-ISCIH, node Universidad de Santiago de Compostela).

A la **figura 5** es pot veure un esquema del mètode emprat.

#### **Controls:**

Per a la recollida de dades dels controls, es va seguir la següent metodologia de treball:

1. Selecció dels controls. Explicació de l'estudi i obtenció del consentiment informat.
2. Recollida de sang per a l'estudi dels SNPs.
3. Separació de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) mitjançant el mètode de diferència de densitats:

- a. Extracció de mostra d'almenys 3 mil·lilitres de sang completa
- b. Dilució de la sang al doble amb *buffer* de fosfats (PBS)
- c. Introducció a un tub de 5 mil·lilitres de solució de polisucrosa i diatrizoat sòdic (*Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, MO, USA*)
- d. Addició de la sang diluïda lentament damunt la polisucrosa
- e. Centrifugació del tub a 2000 rpm durant 25 minuts
- f. Aspiració de la capa de CMSP que queda després del centrifugat i dipòsit de la mateixa a un altre tub amb PBS
- g. Centrifugació del tub amb les CMSP a 2000 rpm durant 10 minuts
- h. Buidament del líquid. Addició de PBS i nova centrifugació
- i. Aspiració del centrifugat (CMSP aïllades) i transferència del mateix a un tub de microcentrífuga
- j. Microcentrifugació a 5000 rpm durant 1 minut
- k. Buidament del líquid i congelació de les CMSP amb neu carbònica i etanol
- l. Emmagatzematge de la mostra congelada a -80 °C

**Casos:**

*FASE AGUDA:*

Per a la recollida de dades de cada pacient en la fase aguda es va seguir la següent metodologia de treball:

1. Selecció dels pacients segons criteris d'inclusió. Informació de l'estudi als pacients i pares o tutors. Obtenció del consentiment informat.
2. Recollida de sang per a l'estudi funcional dels TLRs i per a l'estudi dels SNPs.

3. Estudi funcional de la senyalització dels TLRs mitjançant la determinació del nivell d'expressió de CD62L a la superfície de neutròfils, limfòcits i monòcits per citometria de flux:
  - a. Extracció de mostra de 100 microlitres de sang completa
  - b. Separació de la sang en dos tubs: tub “control” i tub “problema”
  - c. Addició de 5 microlitres d'anticòs anti-CD62L (*PE Mouse anti-Human CD62L, Becton Dickinson, CA, USA*) al tub “problema”
  - d. Addició de 5 microlitres d'anticòs control (*PE Mouse IgG<sub>1</sub>, Becton Dickinson, CA, USA*) al tub “control”
  - e. Incubació durant 15 minuts en obscuritat
  - f. Addició de 2 mil·lilitres de tampó de lisi als dos tubs i repòs durant 10 minuts
  - g. Centrifugació dels dos tubs a 2500 rpm durant 5 minuts
  - h. Buidament del líquid i addició de *buffer* de fosfats (PBS)
  - i. Inserció dels tubs al citòmetre *BD FACScalibur, Becton Dickinson, CA, USA*
  - j. Adquisició i anàlisi de les dades amb el programa *CellQuest Pro Software, Becton Dickinson, CA, USA*
4. Criopreservació d'una mostra de sang total com a mecanisme de seguretat.
5. Recollida prospectiva (cada 24 hores) de les dades necessàries per avaluar l'evolució segons les escales internacionals (dades clíniques, analítiques i microbiològiques).
6. Aïllament de les soques de pneumococ mitjançant tècniques microbiològiques estàndard, les quals inclouen la prova de sensibilitat a l'optoquina i una tècnica de detecció antigènica de la càpsula polisacàrida (*Slidex pneumo-kit*,

*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*). La concentració mínima inhibidora (CMI) es va determinar a través de la tècnica de dilució en agar. La susceptibilitat a penicil·lina i a altres antibiòtics es va definir d'acord als punts de tall del *Clinical Laboratory Standards Institute (65)*. El serotipat de les mostres es va realitzar mitjançant la reacció de Quellung o el test de *dot-blot* al *Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid)*.

L'estudi de DNA de pneumococ en mostra habitualment estèril (plasma, líquid cefalorraquidi, líquid pleural o articular) es va realitzar mitjançant detecció del gen de la pneumolisina (*ply*) i el gen capsular *wzg (66)* amb la tècnica de Real-Time PCR seqüencial. El tipus capsular (serotip) de les mostres positives per PCR es va realitzar a través de la tècnica de *Real-Time PCR Multiplex (67)*. Amb aquest mètode és possible diferenciar els 24 serotips implicats amb major freqüència en la MPI (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9V/A/NL, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A i 23F).

#### *FASE BASAL:*

A l'alta de cada pacient, es va programar una visita de seguiment (anomenada "fase basal") al cap d'un període de temps necessari per a la normalització de la patologia aguda que va motivar l'ingrés. Aquest període es va estimar en 1-2 mesos. A tots els pacients, en fase basal, se'ls va realitzar un control clínic, analític i, segons la patologia que havia motivat l'ingrés, radiològic.

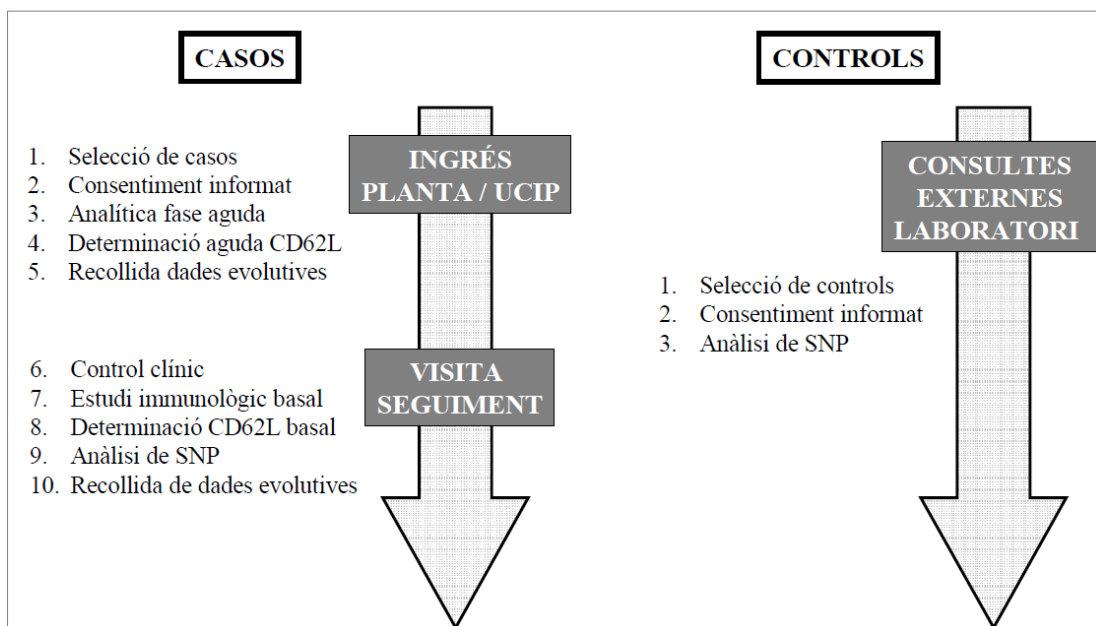
Per a la recollida de dades de cada pacient en la fase basal es va seguir la següent metodologia de treball:

1. Valoració clínica del pacient.
2. Estudi immunològic basal per descartar altres formes d'IDP causants de MPIG:
  - Hemograma.
  - Detecció de la presència de cossos de Howell-Jolly a frotis de sang perifèrica per a descartar el diagnòstic d'asplènia funcional.
  - Poblacions limfoides T, B i *natural killers* (NK). Tècnica de citometria de flux (citòmetre FACScalibur, Becton Dickinson).
  - Dosificació d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgM) i del complement. Mètode immunoturbidimètric per espectrometria d'absorció molecular a 700 nm (analitzador Architect, Abbott). Comparació dels valors amb el rang de normalitat segons l'edat.
  - Determinació de grup sanguini i isohemaglutinines. Tècnica de microgel (reactius Diamed). En el cas de les isohemaglutinines, s'han considerat positius o normals els títols d'anti-B superiors a 1/8 i els títols d'anti-A superiors a 1/16.
  - Resposta a antígens vacunals proteics de tètanus i diftèria. Tècnica ELISA (assaig d'immunoabsorció enzimàtica). S'han considerat valors normals o protectors els superiors a 0,1 UI/ml.
3. Segona determinació de l'expressió de CD62L en superfície de neutròfils, limfòcits i monòcits (estudi de l'expressió basal de CD62L).
4. Separació de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) mitjançant el mètode de diferència de densitats (mateixa metodologia que l'emprada amb els controls).



5. Genotipat dels SNPs seleccionats de les mostres criopreservades de casos i controls. S'ha utilitzat el mètode iPLEX<sup>®</sup> Gold de la plataforma de genotipat MassARRAY<sup>®</sup> (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA). Els serveis de genotipat van ser proveïts pel *Centro Nacional de Genotipado (CEGEN-ISCIII)* (<http://www.cegen.org>).
6. Recollida de totes les variables esmentades generades per la recollida de dades.
7. Anàlisi estadística.

**Figura 5. Esquema de treball.**



## 6.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA

### **Estudi dels SNPs en la via de senyalització TIR:**

Utilització dels paquets estadístic Ene2 per al càlcul del tamany mostral requerit i del SAS 9.2 i la plataforma d'anàlisi estadística genètica *SNPator* (68) per al tractament i anàlisi de les dades genètiques.

Es van construir taules de freqüència per a descriure les proporcions genotípiques i al·lèliques de les variables qualitatives per a cada SNP. Pel que fa a les variables quantitatives es van utilitzar la mitjana, desviació típica, mínim, màxim i quartils.

Per a cada SNP es va avaluar l'existència de relació lineal entre les freqüències de les variables analitzades i el genotip. També va ser avaluada l'associació entre les variables i les freqüències homozigòtiques i al·lèliques. Per aquestes avaluacions es va emprar, mitjançant un test de Wald, un model de regressió logística incloent el sexe, l'edat i el serotip de pneumococ com a potencials variables de confusió (69). Pel que fa a les variables quantitatives, també es va avaluar la tendència lineal respecte el genotip, així com les mitjanes en els models dominant i recessiu i respecte els al·lels. En aquest cas es va emprar un anàlisi de la variància (ANOVA).

Es van calcular dos valors de p: el valor de p sense ajustar (p-cru) i el valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (p-FDR) (70). S'exposen els valors significatius ( $p < 0,05$ ) i els marginalment significatius ( $p < 0,10$ ).

## **Estudi de l'expressió de CD62L:**

Utilització del paquet estadístic SAS 9.2.

Es van comparar la tendència central de la fase aguda i la fase basal. Si la diferència d'expressió entre fase aguda i basal es podia assumir que es distribuïa sota una Normal, es va estimar l'interval de confiança de la diferència de mitjanes i la igualtat d'aquestes es va testar mitjançant un *t-test*. D'altra banda, si no es podia realitzar l'assumpció de Normalitat, es va estimar per interval la mediana de les diferències i es va aplicar la prova no paramètrica de *Wilcoxon*.

S'exposen els valors significatius ( $p < 0,05$ ) i els marginalment significatius ( $p < 0,10$ ).

## **6.5. ASPECTES ÈTICS**

La identitat del pacient va ser mantinguda de forma confidencial al llarg de tot l'estudi. Les dades completes de filiació i el consentiment per escrit estan guardades a l'arxiu de l'investigador. Les dades obtingudes es van tractar segons la Llei 15/1999 de Protecció de Dades de Caràcter Personal. D'acord amb aquesta llei, les dades personals que es requereixen dels subjectes són les necessàries per cobrir els objectius de l'estudi.

El subjecte participant té dret a l'accés a les seves dades personals i a sol·licitar la rectificació o cancel·lació. Donat que els pacients que es van incloure a l'estudi eren menors d'edat o es trobaven en un estat crític, es va demanar en tots els casos la

signatura d'un **consentiment informat** als responsables legals d'aquests pacients.  
(**annexos 3 i 4**).

L'estudi es va portar a terme seguint les recomanacions ètiques internacionals per a la investigació en éssers humans, recollides en les declaracions ètiques internacionals de Helsinki (versió revisada d'Edinburg, 2000).

Aquest estudi va ser presentat al Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de la Fundació Sant Joan de Déu i va obtenir l'aprovació del mateix. S'adjunta el document que certifica l'esmentada aprovació (**annex 5**).



## 7. RESULTATS

### 7.1. ANÀLISI DESCRIPTIVA

Durant el període d'estudi, es van reclutar un total de 60 pacients consecutius amb MPIG (casos) i 120 controls. Trenta-cinc casos (58,3%) eren de sexe masculí. L'edat mitjana dels casos era de 3,11 anys (DE:  $\pm 2,19$  anys, rang: 21 dies - 9 anys). Seixanta-nou controls (57,5%) eren de sexe masculí. La mediana d'edat dels controls era de 4,5 anys (p25-75: 1,2 anys - 13 anys). En quant a l'origen ètnic dels subjectes, el 91,67% dels casos i el 98,33% dels controls eren d'ètnia caucàsica. Les diferències de sexe i origen ètnic entre casos i control no eren estadísticament significatives (**taula 4**).

**Taula 4. Característiques demogràfiques de casos i controls**

Variable	Casos (n=60)	Controls (n=120)	p
<b>Sexe</b> (masculí %) (IC95%)	58,3 (IC5%: 44,9-70,7)	57,5 (IC95%: 47,7-65,9)	0,96
<b>Ètnia</b> (Caucàsica %) (IC95%)	91,67 (IC95%: 81,6-97,2)	98,33 (IC95%: 94,1-99,8)	1
<b>Edat mediana</b> (anys) (rang)	3,1 (21 dies - 9 anys)	9,8 (1 mes - 41 anys)	

IC95%: interval de confiança del 95%

### **7.1.1. Anàlisi dels controls**

Els controls no tenien antecedents familiars de consanguinitat, infeccions greus o patologia immunològica. Tampoc tenien antecedents personals de malalties infeccioses invasives o patologia immunològica. Cap control ha desenvolupat, a data d'avui, una MPI.

### **7.1.2. Anàlisi dels casos**

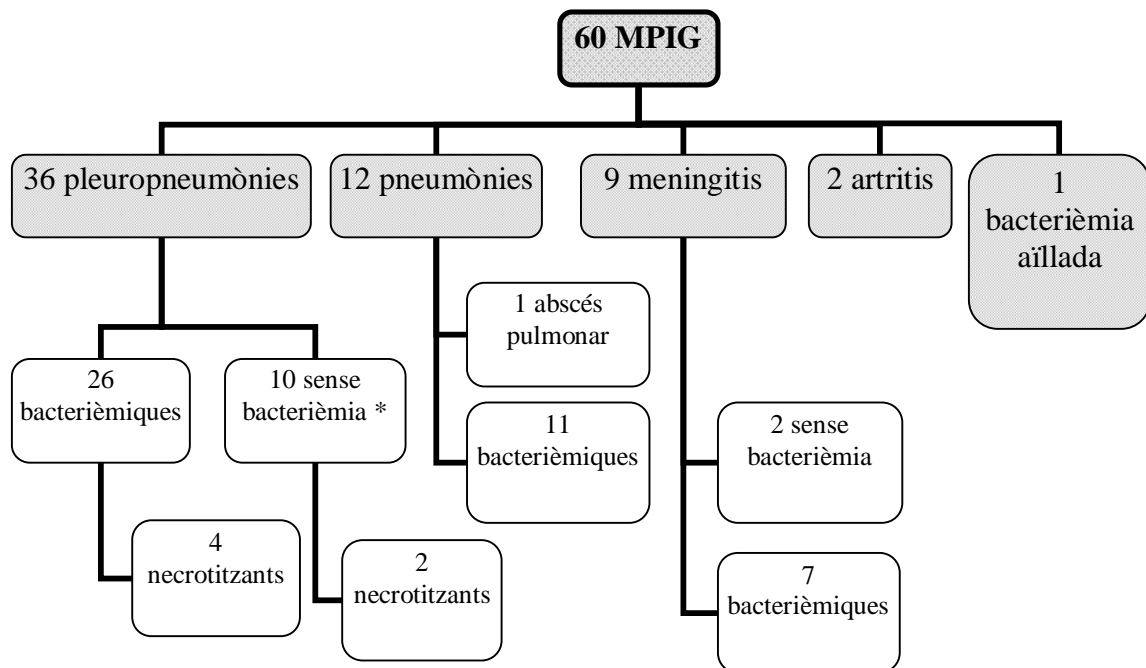
Com a antecedents personals d'interès, 5 casos (8,3%) havien estat prematurs (edat gestacional inferior a 37 setmanes: 3 prematurs tardans de 36 setmanes, un prematur tardà de 34 setmanes i un prematur extrem de 28 setmanes). Quatre casos (6,7%) havien tingut un antecedent patològic d'infecció bacteriana d'etiologia desconeguda (dos casos amb antecedent de pneumònia, una nena de 5 anys amb antecedent d'osteomielitis als 21 dies de vida i una nena de 4 anys amb antecedent de cel·lulitis cutània als 20 dies de vida). No hi havia antecedents de consanguinitat en cap dels pacients.

Tots els casos tenien el calendari vacunal al dia i les vacunes havien estat ben tolerades. En quant a la cobertura vacunal antipneumocòccica heptavalent (opcional en el calendari vacunal), 23 casos (38,3%) tenien cobertura completa (almenys 3 dosis). Tenien cobertura vacunal incompleta (menys de 3 dosis) 7 casos (11,67%) i nul·la (cap dosi) 30 casos (50%).

Les MPI greus van ser, per ordre de freqüència: pleuropneumònia (60%, de les quals un 16,7% van ser necrotitzants i un 72,2% van estar associades a bacterièmia), pneumònia

(20%, totes elles associades a bacterièmia excepte una complicada amb abscess pulmonar), meningitis (15%, de les quals el 77,7% estaven associades a bacterièmia), artritis (3,3%) i bacterièmia primària (1,7%). Aquestes dades queden resumides a la **figura 6** i a la **gràfica 1**.

**Figura 6. Resum dels casos de MPIG.**



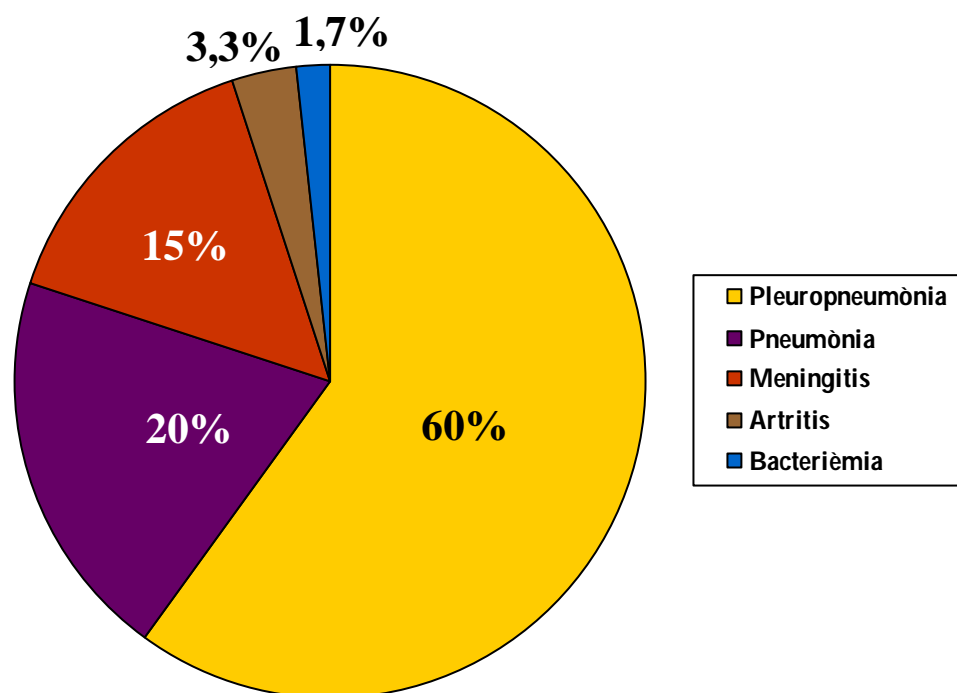
\* Pneumococ identificat al líquid pleural

**Acrònims:**

**MPIG:** malaltia pneumocòccica invasiva greu



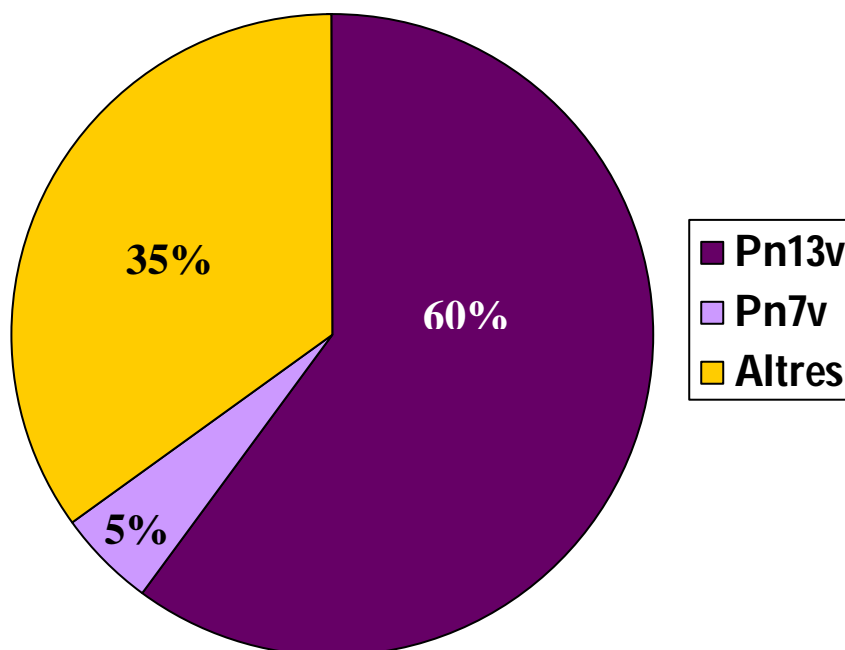
**Gràfica 1. Resum dels casos de MPIG.**



Es va analitzar el serotip de pneumococ implicat en tots els casos: serotip 1 (10 casos), serotip 3 (10 casos), serotip 19A (10 casos), serotip 7FA (3 casos) i un cas de cadascun dels serotips 5, 5A, 6A, 7F, 9VANC, 14, 15B, 15C, 19F, 22F, 23A i 23F. Els altres 15 casos van ser causats per altres serotips no inclosos a la tècnica de PCR emprada.

De totes les MPIG, 39 (65%) estaven causades per serotips només inclosos en la vacuna tridecaivalent actual. Hi va haver 3 casos (5%) de MPIG causada per serotips inclosos a la vacuna heptavalent; cap d'aquests havia estat vacunat de forma completa. El 30% de MPIG restants van ser causades per altres serotips no inclosos en les vacunes comercialitzades actualment (**gràfica 2**).

**Gràfica 2. Serotips de pneumococ implicats**



A continuació es descriuen les característiques clíniques i analítiques d'aquests malalts.

Respecte a les dades clíniques:

- La febre màxima mitjana va ser de 39,4 °C (DE:  $\pm 0,7$  °C).
- La mitjana de temps de resolució de la febre va ser de 66,1 hores (DE:  $\pm 62$  hores).

Respecte a les dades analítiques:

- La mitjana del número màxim de leucòcits en sang va ser de 21014 /mmc. (DE:  $\pm 8995$  /mmc). La mediana del número màxim de leucòcits en sang va ser de 19950 /mmc (p25-75: 13625-27375 /mmc).

- La PrCR màxima mitjana va ser de 240,9 mg/l (DE:  $\pm$  113,2 mg/l). La mediana del valor màxim de PrCR va ser de 255,3 mg/l (p25-75: 131,7-349 mg/l).
- La PCT s'havia determinat en 27 casos, i la mediana del seu valor màxim va ser de 6,9 ng/ml (p25-75: 1-33,9 ng/ml).

Respecte a les dades evolutives:

- Van necessitar ingrés a la UCIP 19 pacients (31,7%), amb una mediana de temps d'ingrés a UCIP de 30 hores (p25-75: 24-144 hores).
- Van precisar ventilació mecànica invasiva (VMI) 6 pacients (10%), amb una mediana de duració de 138 hores (p25-75: 64,25-318 hores).
- Es va utilitzar medicació inotròpica en 4 pacients (6,7%), amb una mitjana de duració de 102 hores (DE:  $\pm$  49,5 hores).
- En quant a la gravetat de la infecció, tos complien criteris de SRIS: 57 casos (95%) complien criteris de sèpsia, 2 casos de xoc sèptic i 1 cas de fallida multiorgànica.
- Hi va haver dos casos d'*exitus*. Van ser un nen de 18 mesos amb xoc sèptic secundari a meningitis i bacterièmia, que va morir a la UCIP, i un nen de 17 mesos amb pleuropneumònia que va morir al seu domicili per causa desconeguda després de l'alta. Cap d'aquests dos casos estaven vacunats amb cap dosi de la vacuna antipneumocòccica heptavalent, i els serotips implicats (6A i 22F) no estaven inclosos en cap de les dues vacunes.
- Es va analitzar l'evolució final de tots els casos excepte d'una pacient, de la qual es va perdre el seguiment per causes alienes a l'estudi (nena de dos anys

amb pleuropneumònia, la família de la qual procedia de Sud-Amèrica i després de l'ingrés van tornar a viure al seu país).

- La resta de pacients van evolucionar a curació (25 casos, 41,7%) i seqüeles (32 casos, 53,3%).
- Del total de seqüeles, la majoria van ser respiratòries (28 casos, 87,5%) en forma de paquipleuritis, i en 4 casos va ser necessària, a més, una segmentectomia. La resta de seqüeles van ser neurològiques (2 casos d'hipoacúcia aïllada i 2 casos d'hidrocefàlia amb convulsions, retràs psicomotor, hipoacúcia i dèficit visual).

Respecte a les dades analítiques durant l'evolució:

- L'estudi immunitari en fase basal es va realitzar en tots els casos excepte en els dos casos d'*exitus* i la pacient amb pèrdua de seguiment. Tots ells tenien absència de cossos de Howell-Jolly a sang perifèrica i valors i proporcions normals de leucòcits i fórmula leucocitària, poblacions limfoides (T, CD4, CD8, NK i B), immunoglobulines (G, M i A) i complement (C3, C4 i CH50), així com una correcta producció d'isohemaglutinines i d'antígens vacunals vers tètanus i diftèria (**taula 5**).

**Taula 5. Valors de l'estudi immunitari dels casos en fase basal**

	Mitjana	DE	Rang normalitat
<b>Leucòcits (/mmc)</b>	10236	3142	<b>1 mes:</b> 5000-19500 <b>4-7 anys:</b> 5500-15500 <b>1-3 anys:</b> 6000-17500 <b>8-13 anys:</b> 4500-13500
<b>Neutròfils (/mmc)</b>	3479	1609	3000-5800
<b>Limfòcits (/mmc)</b>	5422	2481	1500-3000
<b>LT (%)</b>	65	6	62-72
<b>CD4 (%)</b>	41	7	35-55
<b>CD8 (%)</b>	23	6	16-28
<b>NK (%)</b>	9	5	5-20
<b>LB (%)</b>	24	8	12-28
<b>IgG (mg/l)</b>	8882	2791	<b>1 mes:</b> 2510-9060 <b>1-5 anys:</b> 3450-12360 <b>2-4 mesos:</b> 1760-6010 <b>6-10 anys:</b> 6080-15720 <b>5-12 mesos:</b> 1720-10690
<b>IgM (mg/l)</b>	1088	457	<b>1-4 mesos:</b> 140-1050 <b>2-8 anys:</b> 430-2070 <b>5-9 mesos:</b> 330-1260 <b>8-10 anys:</b> 560-3520 <b>10 m - 1 any:</b> 410-1730
<b>IgA (mg/l)</b>	786	429	<b>1-3 mesos:</b> 13-530 <b>2-5 anys:</b> 140-1590 <b>4-6 mesos:</b> 44-840 <b>6-10 anys:</b> 330-2360 <b>7 m - 1 any:</b> 110-1060
<b>C3 (mg/l)</b>	1267	198	800-1400
<b>C4 (mg/l)</b>	247	91	200-500
<b>CH50 (U/ml)</b>	53	8	42-95
	<b>Mediana</b>	<b>Percentils 25 – 75</b>	
<b>Isohemaglutinines anti-A i/o anti-B (títol)</b>	1/16	1/4 - 1/32	anti-A >1/16 anti-B >1/8
<b>Anticosos tètanus (U/ml)</b>	0,29	0,12 – 0,65	>0,10
<b>Anticosos diftèria (U/ml)</b>	0,75	0,24 – 1,80	>0,10

**Acrònims:**

**DE:** desviació estàndard. **LT:** limfòcits T; **CD4:** subclasse CD4 dels limfòcits T; **CD8:** subclasse CD8 dels limfòcits T; **NK:** limfòcits *natural killer*; **LB:** limfòcits B; **Ig:** immunoglobulina; **C3:** fracció 3 del complement; **C4:** fracció 4 del complement; **CH50:** activitat total del complement

**7.1.3. Descripció dels SNPs de les molècules de la via de senyalització TIR (IRAK1, IRAK4, IRAKM i MyD88) en els pacients que han desenvolupat una MPI greu (objectiu 1.1) (taules 6 i 7)**

En tots els pacients (casos i controls) es va determinar el genotip de cada SNP a estudiar. Tots els SNPs estaven en equilibri de Hardy-Weinberg (EHW) (assumpció que l'aparellament dels al·lels es produeix de forma aleatòria). Les freqüències al·lèliques trobades eren similars a les descrites a la població de referència *HapMap-CEU* (població de referència d'origen europeu del consorci internacional *HapMap*).

**Taula 6. Objectiu 1.1. Descripció de la freqüència dels genotips**  
(freqüències expressades sobre 1)

<b>Gen / SNP</b>	<b>Genotip</b>	<b>CASOS</b>	<b>CONTROLS</b>
<b>IRAK1</b>			
rs1059701	C	0,1186	0,0917
	CC	0,0508	0,0333
	CT	0,1356	0,1583
	T	0,4746	0,4500
	TT	0,2203	0,2667
rs1059702	C	0,5000	0,4750
	CC	0,2500	0,3333
	CT	0,1500	0,1250
	T	0,0833	0,0667
	TT	0,0167	0,0000
rs1059703	C	0,0702	0,0672
	CC	0,0000	0,0084
	CT	0,1754	0,1597
	T	0,5088	0,4706
	TT	0,2456	0,2941
<b>IRAKM</b>			
rs1624395	AA	0,1500	0,2083
	AG	0,5167	0,4583
	GG	0,3333	0,3333
rs1370128	CC	0,2833	0,2833
	CT	0,5500	0,4667
	TT	0,1667	0,2500
<b>IRAK4</b>			
rs1141168	AA	0,2167	0,2667
	AG	0,5000	0,6083
	GG	0,2833	0,1250
rs4251513	CC	0,3833	0,2083
	CG	0,4333	0,5583
	GG	0,1833	0,2333
rs1461567	CC	0,4333	0,5917
	CT	0,5000	0,3583
	TT	0,0667	0,0500
<b>MyD88</b>			
rs6853	AA	0,8167	0,6723
	AG	0,1667	0,2941
	GG	0,0167	0,0336
rs7744	AA	0,8333	0,7815
	AG	0,1333	0,1849
	GG	0,0333	0,0336

**Taula 7. Objectiu 1.1. Descripció de la freqüència dels al·lels (freqüències expressades sobre 1).**

Gen / SNP	Al·lel	CASOS	CONTROLS	EHW (valor de p)	HapMap-CEU
<b>IRAK1</b>					
rs1059701	C	0,2530	0,2171	0,8199	0,280
	T	0,7470	0,7829		0,720
rs1059702	C	0,8118	0,8686	0,1070	0,796
	T	0,1882	0,1314		0,204
rs1059703	C	0,1728	0,1667	0,4362	0,225
	T	0,8272	0,8333		0,775
<b>IRAKM</b>					
rs1624395	A	0,4083	0,4375	0,5771	0,434
	G	0,5917	0,5625		0,566
rs1370128	C	0,5583	0,5167	0,4362	0,558
	T	0,4417	0,4833		0,442
<b>IRAK4</b>					
rs1141168	A	0,4667	0,5708	0,2177	0,464
	G	0,5333	0,4292		0,536
rs4251513	C	0,6000	0,4875	0,9209	0,500
	G	0,4000	0,5125		0,500
rs1461567	C	0,6833	0,7708	0,8193	0,699
	T	0,3167	0,2292		0,301
<b>MyD88</b>					
rs6853	A	0,9000	0,8193	0,8296	0,885
	G	0,1000	0,1807		0,115
rs7744	A	0,9000	0,8739	0,8199	0,854
	G	0,1000	0,1261		0,146

**Acrònims:**

**EHW:** Equilibri Hardy-Weinberg (valor de  $p > 0,05$  vol dir que no hi ha diferències significatives entre les freqüències al·lèliques observades a la mostra i les esperades si la distribució al·lèlica fos aleatòria i, per tant, es compleix l'EHW); **HapMap-CEU:** Freqüències al·lèliques a una mostra de residents de Utah amb ascendència europea, de la col·lecció CEPH del consorci internacional HapMap



## 7.2. ANÀLISI COMPARATIVA

Es va analitzar si existia associació de cada genotip i dels al·lells per separat amb la presència de MPIG (**objectiu 1.2**). També es va estudiar si existia associació dels genotips i al·lells amb l'evolució de la MPIG (**objectiu 1.3**).

### 7.2.1. Determinar si aquests SNPs s'associen a la presència de MPIG (objectiu 1.2)

Es va realitzar un estudi d'associació dels genotips i dels al·lells amb la presència o absència de MPIG.

En el SNP **rs1059701** del gen IRAK1, es va observar una associació del genotip CC amb la presència de MPI greu ( $p=0,0067$ ) amb una *odds ratio* (OR) de 1,430 (IC95%: 1,140-1,795).

En el SNP **rs4251513** del gen IRAK4, es va observar una associació del genotip CC amb la presència de MPI greu ( $p<0,0001$ ), amb una OR de 2,183 (IC95%: 1,578-3,019); i de l'al·lel C ( $p<0,0001$ ), amb una OR de 1,468 (IC95%: 1,404-1,535).

En el SNP **rs1461567** del gen IRAK4, es va observar una associació de l'al·lel T amb la presència de MPI greu ( $p=0,0158$ ), amb una OR de 1,500 (IC 95%: 1,132-1,987).

En el SNP **rs6853** del gen MyD88, es va observar una associació del genotip AA amb la presència de MPI greu ( $p<0,0001$ ), amb una OR de 2,125 (IC95%: 1,787-2,526); i de l'al·lel A ( $p<0,0001$ ), amb una OR de 1,935 (IC95%: 1,462-2,563).

A les **taules 8 i 9** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

**Taula 8. Objectiu 1.2. Associació de genotips amb la presència de MPIG**

Gen / SNP	Possibles genotips	Genotip associat	AA vs AB+BB	BB vs AA+AB
			p-cru p-FDR OR (IC 95%)	p-cru p-FDR OR (IC 95%)
<b>IRAK1</b>				
rs1059701	C/CC/CT/T/TT	CC	0,0020 <b>0,0067</b> 1,430 (1,140-1,795)	0,5651 0,9310 1,141 (0,729-1,786)
rs1059702	C/CC/CT/T/TT	TT	0,4158 0,5939 1,433 (0,602-3,410)	0,5079 0,9310 1,585 (0,406-6,190)
rs1059703	C/CC/CT/T/TT	CC	0,5029 0,5970 1,210 (0,693-2,113)	0,8127 0,9751 1,082 (0,563-2,081)
<b>IRAKM</b>				
rs1624395	AA/AG/GG	GG	0,5373 0,5970 1,449 (0,446-4,701)	0,9764 0,9764 1,008 (0,585-1,737)
rs1370128	CC/CT/TT	CC	0,9619 0,9619 1,011 (0,650-1,571)	0,2851 0,7762 1,623 (0,668-3,941)
<b>IRAK4</b>				
rs1141168	AA/AG/GG	GG	0,3163 0,5474 1,292 (0,783-2,133)	0,0712 0,7119 2,827 (0,914-8,739)
rs4251513	CC/CG/GG	CC	<0,0001 <b>&lt;0,0001</b> 2,183 (1,578-3,019)	0,1765 0,7762 1,197 (0,922-1,555)
rs1461567	CC/CT/TT	TT	0,0594 0,1484 1,753 (0,978-3,144)	0,3105 0,7762 1,412 (0,725-2,752)
<b>MyD88</b>				
rs6853	AA/AG/GG	AA	<0,0001 <b>&lt;0,0001</b> 2,125 (1,787-2,526)	0,6517 0,9310 1,534 (0,239-9,829)
rs7744	AA/AG/GG	AA	0,3284 0,5474 1,362 (0,733-2,530)	
		GG		0,8776 0,9751 1,091 (0,319-3,318)

**Acrònims:** p-cru: valor de p sense ajustar; p-FDR: valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); OR: *odds-ratio*; IC 95%: interval de confiança del 95%

Taula 9. Objectiu 1.2. Associació d'al·lels amb la presència de MPIG

Gen / SNP	Possibles al·lels	Al·lel associat	Test de tendència lineal	Comparació entre al·lels
			p-cru p-FDR OR (IC 95%)	p-cru p-FDR OR (IC 95%)
<b>IRAK1</b>				
rs1059701	C/T	C	0,4191 0,5935 1,104 (0,868-1,405)	0,2629 0,4528 1,229 (0,856-1,765)
rs1059702	C/T	T	0,5419 0,5935 1,131 (0,761-1,680)	0,2717 0,4528 1,538 (0,714-3,312)
rs1059703	C/T	C	0,5618 0,5935 1,075 (0,841-1,374)	0,6205 0,6894 1,147 (0,667-1,972)
<b>IRAKM</b>				
rs1624395	A/G	G	0,5935 0,5935 1,122 (0,736-1,710)	0,6957 0,6957 1,126 (0,621-2,044)
rs1370128	C/T	C	0,1215 0,3037 1,179 (0,788-1,764)	0,4887 0,6109 1,182 (0,736-1,901)
<b>IRAK4</b>				
rs1141168	A/G	G	0,1215 0,3037 1,648 (0,876-3,100)	0,0283 0,0709 <b>1,522 (1,046-2,216)</b>
rs4251513	C/G	C	0,0613 0,2044 1,486 (0,981-2,251)	<0,0001 <b>&lt;0,0001</b> <b>1,468 (1,404-1,535)</b>
rs1461567	C/T	T	0,0449 0,2044 <b>1,530 (1,010-2,319)</b>	0,0047 <b>0,0158</b> <b>1,500 (1,132-1,987)</b>
<b>MyD88</b>				
rs6853	A/G	A	0,0077 0,0774 <b>1,900 (1,185-3,047)</b>	<0,0001 <b>&lt;0,0001</b> <b>1,935 (1,462-2,563)</b>
rs7744	A/G	A	0,3460 0,5935 1,214 (0,811-1,817)	0,4695 0,6109 1,271 (0,664-2,431)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## **7.2.2. Conèixer si aquests SNPs determinen l'evolució dels pacients amb MPIG**

### ***(objectiu 1.3)***

Es va analitzar l'evolució dels casos de MPI greu en relació als SNPs i tenint en compte possibles variables de confusió (edat, sexe i serotip de pneumococ). Les variables evolutives estudiades van ser:

- Tipus d'infecció pneumocòccica: pneumònia, pleuropneumònia, meningitis i artritis.
- Dades analítiques de gravetat: leucocitosi  $>15000/\text{mmc}$ , leucopènia  $<5000/\text{mmc}$ , PrCR  $>150$ ,  $>200$  i  $>250$  mg/l.
- Dades clíniques de gravetat: temps de resolució de la febre, necessitat d'ingrés a UCIP, necessitat de VMI, necessitat de medicació inotròpica.
- Evolució de la malaltia: curació, seqüeles o *exitus*.

A continuació s'exposen les associacions trobades entre els pacients (casos) amb dades evolutives de major agressivitat de la MPI i els genotips i al·lels dels SNPs, amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR) (**taules 10-19**).

En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives amb cap dels SNPs analitzats. Els resultats complets es poden consultar a l'**annex 6**.

## Gen IRAK1

### rs1059701

No es van trobar associacions estadísticament significatives ajustades pel mètode FDR amb cap dada evolutiva de la MPIG.

A la **taula 10** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ).

**Taula 10. Associació d'al·lels i genotips de rs1059701 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>TT+CT</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0317</i> 0,1317	4,136 (1,132-15,107)
	T	Test de tendència lineal	<i>0,0468</i> 0,1173	1,596 (1,006-2,531)
		Entre al·lels	<i>0,0406</i> 0,1353	3,265 (1,052-10,133)
<b>Necessitat d'inotròpics</b>	T	Test de tendència lineal	<i>0,0353</i> 0,1875	1,577 (1,032-2,409)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**rs1059702**

Es va trobar associació ( $p < 0,05$ ) del genotip TT amb l'absència de leucocitosi  $>15000/\text{mmc}$ .

A la **taula 11** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR), En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 11. Associació d'al·lels i genotips de rs1059702 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	CC	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0395</i> 0,1317	3,883 (1,067-14,130)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	<i>0,0046</i> <b>0,0460</b>	7,500 (1,862-30,214)
	C	Test de tendència lineal	<i>0,0115</i> 0,1148	2,003 (1,169-3,432)
		Entre al·lels	<i>0,0282</i> 0,1353	3,757 (1,152-12,253)
<b>Pneumònia</b>	T	Test de tendència lineal	<i>0,0369</i> 0,3693	6,404 (1,119-36,642)
<b>Meningitis</b>	CT+CC	Amb l'altre genotip	<i>0,0406</i> 0,4056	6,020 (1,080-33,549)
<b>UCIP</b>	C	Test de tendència lineal	<i>0,0416</i> 0,4156	2,069 (1,028-4,164)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	<i>0,0123</i> 0,1227	11,024 (1,685-72,130)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## rs1059703

No es van trobar associacions estadísticament significatives ajustades pel mètode FDR amb cap dada evolutiva de la MPIG.

A la **taula 12** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ).

**Taula 12. Associació d'al·lels i genotips de rs1059703 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel <i>Genotip</i></b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0209</i> 0,1317	9,148 (1,398-59,861)
	T	Test de tendència lineal	<i>0,0467</i> 0,1173	1,733 (1,008-2,981)
<b>Necessitat d'inotrópics</b>	T	Test de tendència lineal	<i>0,0480</i> 0,1875	1,640 (1,004-2,676)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%



## Gen IRAKM

### rs1624395

Es va trobar associació ( $p < 0,05$ ) de l'al·lel G i la presència de pleuropneumònia.

A la **taula 13** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR). En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 13. Associació d'al·lels i genotips de rs1624395 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel <i>Genotip</i></b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pleuro- pneumònia</b>	G	Entre al·lels	<i>0,0029</i> <b>0,0147</b>	1,834 (1,230-2,736)
<b>Major temps febre</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0475</i> 0,3199	
	G	Test de tendència lineal	<i>0,0177</i> 0,1771	
		Entre al·lels	<i>0,0210</i> 0,2104	

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## rs1370128

Es va trobar associació ( $p < 0,05$ ) de l'al·lel C i la presència de pleuropneumònia.

S'ha trobat associació marginalment significativa ( $p < 0,10$ ) de l'al·lel T i la presència d'*exitus*.

A la **taula 14** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR). En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 14. Associació d'al·lells i genotips de rs1370128 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0378</i> 0,2865	3,802 (1,078-13,405)
	C	Entre al·lells	<i>0,0006</i> <b>0,0055</b>	2,060 (1,367-3,105)
<b>Exitus</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0289</i> 0,2892	5,070 (1,182-21,753)
	T	Test de tendència lineal	<i>0,0127</i> 0,0500	3,165 (1,278-7,836)
		Entre al·lells	<i>0,0388</i> 0,1940	3,210 (1,062-9,703)

### Acrònims:

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## Gen IRAK4

### rs1141168

Es va trobar associació marginalment significativa ( $p < 0,10$ ) de l'al·lel A i la presència d'*exitus*.

A la **taula 15** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR). En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 15. Associació d'al·lels i genotips de rs1141168 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel <i>Genotip</i></b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0222</i> <b>0,2221</b>	3,977 (1,218-12,987)
<b>PrCR &gt;250 mg/l</b>	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0429</i> <b>0,4287</b>	3,273 (1,039-10,311)
<b><i>Exitus</i></b>	A	Test de tendència lineal	<i>0,0241</i> <b>0,0602</b>	3,397 (1,174-9,830)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## rs4251513

Es va trobar associació ( $p < 0,05$ ) entre el genotip GG i l'absència de seqüeles.

A la **taula 16** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR). En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 16. Associació d'al·lels i genotips de rs4251513 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel <i>Genotip</i></b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0221</i> <b>0,2213</b>	3,898 (1,215-12,502)
<b>Curació</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0305</i> <b>0,3055</b>	4,429 (1,150-17,059)
<b>Seqüeles</b>	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	<i>&lt;0,0001</i> <b>0,0010</b>	7,066 (2,645-18,872)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## rs1461567

Es va trobar associació marginalment significativa ( $p < 0,010$ ) entre el genotip CC i l'al·lel C i la presència d'*exitus*.

A la **taula 17** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR). En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 17. Associació d'al·lels i genotips de rs1461567 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel <i>Genotip</i></b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b><i>Exitus</i></b>	CC	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0185</i> <b>0,0927</b>	7,070 (1,388-36,014)
	C	Test de tendència lineal	<i>0,0150</i> <b>0,0500</b>	5,741 (1,404-23,471)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

## Gen MyD88

### rs6853

Es va trobar associació ( $p < 0,05$ ) entre l'al·lel G i la presència d'*exitus*, i entre el genotip AA i l'absència d'*exitus*.

A la **taula 18** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR). En la resta de variables evolutives no es van obtenir associacions estadísticament significatives.

**Taula 18. Associació d'al·lels i genotips de rs6853 amb dades evolutives de la MPIG.**

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	A	Entre al·lels	<i>0,0406</i> <b>0,1353</b>	3,841 (1,059-13,929)
<b>Necessitat d'inotròpics</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0358</i> <b>0,2212</b>	58,004 (1,308-999,999)
<b>Exitus</b>	AG+GG	Amb l'altre genotip	<i>0,0005</i> <b>0,0054</b>	16,086 (3,336-77,574)
	G	Test de tendència lineal	<i>0,0004</i> <b>0,0037</b>	10,712 (2,903-39,531)
		Entre al·lels	<i>0,0006</i> <b>0,0064</b>	8,388 (2,472-28,455)

#### Acrònims:

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**rs7744**

No es van trobar associacions estadísticament significatives ajustades pel mètode FDR amb cap dada evolutiva de la MPIG.

A la **taula 19** s'exposen les associacions trobades amb el grau corresponent de significació estadística (en cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ).

**Taula 19.** Associació d'al·lels i genotips de rs7744 amb dades evolutives de la MPIG.

	<b>Al·lel <i>Genotip</i></b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	G	Test de tendència lineal	<i>0,0468</i> 0,1173	4,713 (1,022-21,726)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

### **7.2.3. Analitzar si la determinació de CD62L és útil com a cribratge inicial dels defectes de senyalització dels TLRs (objectiu 2.1)**

Es va realitzar la determinació de l'expressió de CD62L en fase aguda i fase basal en 21 casos de MPIG. En la resta de casos de MPIG faltava alguna de les determinacions, per la qual cosa no es van tenir en compte per a l'anàlisi. Es van determinar els valors d'expressió de CD62L en cada fase en les poblacions cel·lulars de neutròfils, limfòcits i monòcits. Els valors d'expressió analitzats van ser:

- Percentatge de cèl·lules de la mostra que expressen CD62L (**valor A**)
- Mitjana d'intensitat d'expressió global de totes les cèl·lules de la mostra (**valor B**)
- Mitjana d'intensitat d'expressió de les cèl·lules que expressen CD62L (**valor C**)

En primer lloc, es va analitzar la diferència entre fase aguda i fase basal dels valors A, B i C per a cada grup cel·lular. Es va observar que la diferència era significativa en els valors B i C dels monòcits (**taula 20**).



**Taula 20. Anàlisi de la comparació de l'expressió de CD62L entre fase aguda i basal.**

<b>Valor de la diferència aguda-basal</b>	<b>Mitjana</b>	<b>DE</b>	<b>Mediana</b>	<b>Límit inferior de l'IC 95%</b>	<b>Límit superior de l'IC 95%</b>	<b>P</b>
Neutròfils (valor A)	3,83	20,54	2,15	-3,01	7,21	0,1643
Neutròfils (valor B)	-28,80	111,63	-18,02	-79,61	22,02	0,2510
Neutròfils (valor C)	-32,95	162,69	-63,21	-107,00	41,10	0,3644
Leucòcits (valor A)	2,61	19,21	2,03	-5,42	6,28	0,4896
Leucòcits (valor B)	3,42	74,78	18,53	-30,62	37,46	0,8362
Leucòcits (valor C)	6,86	103,66	-0,66	-40,33	54,05	0,7648
Monòcits (valor A)	0,91	22,60	1,83	-9,38	11,19	0,8560
Monòcits (valor B)	93,68	188,47	71,90	7,90	179,47	<b>0,0339</b>
Monòcits (valor C)	98,07	197,83	80,05	8,01	188,12	<b>0,0343</b>

**Acrònims:**

**p:** valor de p; **IC 95%:** interval de confiança del 95%

En segon lloc, es va analitzar la diferència entre fase aguda i fase basal dels valors d'expressió de CD62L (valors A, B i C) en el grup cel·lular dels monòcits. Es va observar una diferència significativa del valor A (percentatge d'expressió de CD62L) en el genotip CG del SNP rs4251513 d'IRAK4 (**taula 21**). No es van observar diferències significatives en cap altre valor ni SNP.

**Taula 21. Monòcits, diferència del valor A entre fase aguda i fase basal segons genotip.**

SNP	Genotip	N	Mitjana de la diferència	DE	Mediana de la diferència	Límit inferior de l'IC 95%	Límit superior de l'IC 95%	P
rs4251513	CC	10	-9,90	24,16	-4,79	-41,50	12,98	0,7539
	CG	9	13,36	16,38	8,19	0,25	36,67	<b>0,0391</b>
	GG	2	-1,07	15,53	-1,07	-12,05	9,91	1,0000

**Acrònims:**

**p:** valor de p; **IC 95%:** interval de confiança del 95%



## **8. DISCUSSIÓ**

### **8.1. ASSOCIACIÓ DE SNPs DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ TIR AMB LA PRESENCIA DE MPIG I AMB PARÀMETRES EVOLUTIUS DELS PACIENTS AMB MPIG**

Aquest és el primer estudi que demostra associació de SNPs d'IRAK1, IRAK4 i MyD88 amb la presència de MPIG.

Els resultats mostren que alguns dels SNPs estudiats estan relacionats amb un risc incrementat de desenvolupar una MPIG:

- Genotip CC de rs1059701 a IRAK1
- Al·lel C de rs4251513 i al·lel T de rs1461567 a IRAK4
- Al·lel A de rs6853 a MyD88.

Per una altra banda, s'ha observat que alguns dels SNPs estudiats estan relacionats amb l'evolució dels pacients amb MPIG:

- Presència de pleuropneumònia amb al·lel G de rs1624395 i al·lel C de rs1370128 a IRAKM.
- Presència de leucocitosi amb genotips CT+TT de rs1059702 a IRAK1.
- Presència d'*exitus* amb genotips AG+GG i al·lel G a MyD88.
- Presència de seqüeles de qualsevol tipus amb genotips CG+CC de rs4251513 a IRAK4.

Algun treball anterior relaciona la presència de MPI amb SNPs d'algun TLR en concret, com és el cas de l'estudi de Yuan *et al*, que troba protecció vers la MPI amb els genotips heterozigots dels SNPs Asp/Gly299 i Thr/Ile399 del TLR4 (54). No obstant,

s'ha considerat més important l'estudi de la via de senyalització comuna TIR, ja que és única, mentre que els TLRs individualment són redundants en el reconeixement del pneumococ (71). D'aquesta manera, l'alteració d'un dels TLRs implicats en el reconeixement del pneumococ podria ésser compensada pel correcte funcionament dels altres TLRs, mentre que l'alteració de només una de les proteïnes de la via comuna TIR podria condicionar tota la resposta immunitària mediada pels TLRs.

Altres autors han trobat relació entre la presència de MPI i SNPs a la via de senyalització TIR, però cap d'ells al complex IRAK ni a MyD88: Chapman *et al* trobaren associació de la MPI amb SNPs del complex inhibidor de NF-κB: SNPs rs760477, rs4925858 i rs2306384 del gen NFKBIL2 (55), rs600718 i rs616597 de NFKBIZ (56), i rs3138053 i rs2233406 de NFKBIA (57); i Khor *et al* van descriure protecció vers la MPI amb l'heterozigosi del SNP S180L de TIRAP (58). Recentment s'han descrit noves IDP causades per mutacions defectives de les proteïnes del complex IRAK i MyD88 (14-17,25), per la qual cosa en el present estudi s'ha considerat d'una importància cabdal la focalització en aquestes proteïnes de la via de senyalització TIR. De fet, els resultats d'aquest treball reforcen l'opinió que els gens IRAK4 i MyD88 codifiquen proteïnes que són crítiques a la via de senyalització TIR i també assenyalen la manca de compensació o plasticitat en la seva absència.

Hi ha d'altres estudis que han relacionat diferents factors de gravetat en malalties inflamatòries i infeccioses amb SNPs d'algunes d'aquestes proteïnes de la via de senyalització TIR. Arcaroli *et al* i Liu *et al* descobriren l'associació d'un haplotip d'IRAK1 (marcat pel SNP rs1059703) amb un increment en l'activació de NF-κB i un pitjor pronòstic en pacients adults amb sèpsia (majors requeriments de ventilació mecànica, major incidència de xoc sèptic i de mortalitat) (28,30); posteriorment, Toubiana *et al* demostraren un pitjor pronòstic de pacients adults amb xoc sèptic amb

els mateixos SNPs (29). Sutherland *et al* estudiaren una cohort de pacients adults crítics i demostraren una associació entre un haplotip determinat d'IRAK4 (el format pels SNPs rs4251513, rs4251520 i rs4251545) i un risc incrementat de tenir una bacterièmia per microorganismes Gram-positius (33). Tewfik *et al* trobaren una relació entre alguns SNPs d'IRAK4 (rs1461567, rs4251513 i rs1141168) i valors elevats d'IgE a una cohort de pacients amb rino-sinusitis crònica i asma (34). Balaci *et al* determinaren l'existència d'associació entre un haplotip d'IRAKM (el format pels SNPs rs11465955, rs1624395 i rs1370128) i l'aparició d'asma persistent d'inici precoç (31) i Pino-Yanes *et al* confirmaren aquesta associació en un estudi de replicació amb població espanyola (32). Una limitació important d'aquests estudis és la de que la major part d'ells estan realitzats en població adulta (28-34). De fet, s'ha descrit una major expressió clínica de les disfuncions de la resposta immunitària innata mediada per TLRs en l'edat pediàtrica (14-17). S'ha demostrat que la resposta immunitària innata és més important en els primers anys de vida, ja que el sistema immunitari adaptatiu no acaba de desenvolupar-se de forma eficient fins els 10 anys d'edat (18-22). Per aquest motiu, s'ha de destacar la importància de portar a terme l'estudi de les disfuncions del sistema TLR en l'edat pediàtrica, amb aquest treball de tesi.

Hirschfeld *et al* van estudiar la presència de defectes funcionals en la senyalització mediada pels TLRs en pacients amb MPI, sense trobar-ne cap (50). En el seu estudi, el 92% de les infeccions eren bacterièmies ocultes i pneumònies bacterièmiques, sense especificar nivell de gravetat. En el present treball es va restringir la selecció de casos a aquells amb un nivell de gravetat concreta [criteris de SRIS (72)]. Al contrari que en aquest estudi, Hirschfeld *et al* van excloure lactants menors de 3 mesos i el seu era un estudi retrospectiu, amb les limitacions consegüents en els criteris d'inclusió de pacients. No obstant, l'autor va proposar que els defectes en la senyalització mediada

per TLRs (no detectats en el seu estudi) podrien estar associats a casos de MPI recurrent o MPI fulminant. Entre els casos presentats en el present treball no es va registrar cap cas de MPI recurrent, però tots els casos analitzats complien amb que eren casos greus amb SRIS.

Més recentment, Andres *et al* descobriren un defecte de la senyalització de la via TIR en la fase aguda d'un pacient amb sèpsia pneumocòccica fatal, i es corresponia amb una mutació defectiva del gen IRAK4 (47). Alsina *et al* estudiaren un grup de 10 pacients amb MPI recurrent i trobaren que un d'ells tenia un defecte en la senyalització de la via TIR i es corresponia amb una mutació defectiva del gen MyD88 (48). Per una altra banda, Ingels *et al* van estudiar un grup de 22 pacients amb MPI recurrent i un d'ells mostrava una disfunció de la senyalització TIR, sense trobar cap mutació de la mateixa via, per la qual cosa suposaren que aquesta disfunció podria estar causada per SNPs de la via de senyalització TIR (49).

Aquests tres estudis reforcen la idea de la importància de la via de senyalització TIR en la resposta immunitària enfront el pneumococ i la influència que tenen les variacions d'aquesta via en la susceptibilitat a la MPI. En el present treball, tot i no haver trobat casos de MPI recurrent, s'han detectat variacions genètiques d'aquesta via associades amb la presència de MPI greu i amb factors de gravetat de la mateixa. Tot i no ser estudis comparables, els resultats dels treballs d'Alsina *et al* i d'Ingels *et al* i el present es poden considerar congruents.

Recentment s'han descrit mutacions que condicionen un dèficit de les proteïnes IRAK4 i MyD88, ambdues punts cabdals de la via de senyalització TIR (14-17,25). Aquestes mutacions condicionen una predisposició a un espectre estret d'infeccions bacterianes invasives per cocs Gram-positius (pneumococ i *S. aureus*) i infeccions no invasives per *S. aureus* i *Pseudomonas*. Els autors destaquen que aquest fenotip és bastant sorprenent

i únic dins les IDP. Per aquest motiu, en el present treball s'ha volgut aprofundir en l'estudi d'aquests gens i s'ha confirmat que altres variacions genètiques condicionen major susceptibilitat a infeccions greus per pneumococ. No obstant, la manca de conclusions definitives de l'estudi funcional realitzat no permet definir les eventuais variacions funcionals causades pels SNPs detectats. Per aquest motiu, no es pot establir si la susceptibilitat detectada és deguda a un dèficit de funció de les proteïnes corresponents.

Aquests treballs, recolzats pel treball més recent d'Alsina *et al* (48), també conclouen que les infeccions pneumocòcciques trobades en els pacients amb mutacions de MyD88 i IRAK4 són típicament recurrents. En l'actual estudi no s'ha detectat cap infecció recurrent. Això podria ser degut, per una banda, a que les variacions genètiques detectades determinen només un dèficit funcional parcial o, per una altra banda, a que el període d'estudi potser no ha estat el suficientment llarg com per identificar infeccions recurrents.

Aquests estudis també destaquen l'escàs component inflamatori inicial de les infeccions trobades (poca variació de temperatura i escàs increment en els valors de PrCR, leucòcits i neutròfils), però expliquen que, si la infecció s'allarga, aquests reactants poden arribar a assolir valors adequadament elevats. El comportament de la PrCR és interessant. Aquest reactant és un receptor soluble del sistema immunitari innat i s'encarrega, entre altres coses, de reconèixer i opsonitzar bacteris piogènics com el pneumococ. En aquests estudis, els autors comenten que els valors inusualment baixos de PrCR en el moment agut poden ser deguts a l'escassa producció d'IL-6 com a resultat de les mutacions descrites. En la mateixa línia, en un altre treball també han observat valors baixos d'IL-6 en un haplotip determinat d'IRAK4 (rs4251513-rs4251520-rs4251545) (33). No obstant, en l'actual estudi només s'han recollit els



valors màxims dels reactants, sense especificar en quin moment de l'ingrés s'han assolit, per la qual cosa no es poden refutar o ratificar aquestes observacions.

Els resultats d'aquest estudi podrien ser extrapolables a altres poblacions, ja que les dades clíniques i microbiològiques són semblants a les descrites a altres estudis. La mostra de pacients amb MPIG és similar a la descrita en altres treballs en diferents sentits. D'una banda, el criteri d'inclusió segons l'edat englobava pacients de fins a 10 anys d'edat, amb una edat mitjana de 3,13 anys, similar a la d'altres estudis realitzats al mateix centre hospitalari i abans de la introducció de la vacunació antipneumocòccica tridecaivalent (62) i a la d'altres estudis internacionals realitzats en les mateixes dates (73). La proporció de pacients menors de 2 anys (35%) i de 5 anys (85%) és també similar a la dels esmentats treballs (62, 73), la qual cosa recalca la importància de la MPIG en els pacients més joves. De la mateixa manera, la proporció de cada tipus de MPI dels casos d'aquest treball es correlaciona amb altres estudis realitzats en població i dates semblants (74).

Aquest estudi es va realitzar abans de la introducció de la vacunació antipneumocòccica tridecaivalent. En el moment de l'estudi, la vacuna antipneumòccica conjugada comercialitzada era l'heptavalent. Estava inclosa al calendari vacunal català, però no finançada pel sistema públic de salut de Catalunya, per la qual cosa la cobertura vacunal és variable. La cobertura vacunal dels pacients seleccionats com a casos (cobertura completa en el 38,3%, cobertura amb almenys una dosi en el 50% dels pacients) és similar a l'observada en altres estudis realitzats en població i dates semblants (74,75).

Els serotips responsables de les MPIG d'aquest estudi són similars al observats en altres estudis realitzats en població i dates semblants (74,75).

En un estudi d'associació genètica com aquest, de cara a poder extrapolar conclusions fiables a partir d'una mostra d'individus, és aconsellable complir alguns requisits **(76,77)**.

En primer lloc, cal que les mostres siguin el més homogènies possibles. La mostra de casos era homogènia en quant a edat (rang: 21 dies - 9 anys). La majoria dels pacients (55 pacients, 91,67%) eren d'ètnia caucàsica (la resta eren d'ètnia latinoamericana). D'altra banda, la mostra dels controls d'aquest estudi també era homogènia en quant a ètnia (98,33%, 118 controls, d'ètnia caucàsica; els 2 restants eren latinoamericans). En quant a antecedents patològics que poguessin influenciar els resultats, la majoria de casos no tenia cap precedent (55 pacients, 91,67%), mentre que dels 5 restants, 4 eren prematurs tardans (34-36 setmanes gestacionals) i només un era gran prematur (28 setmanes gestacionals). Els prematurs tardans no havien tingut cap complicació deguda a la seva prematuritat, com és d'esperar en pacients nascuts gairebé a terme. El gran prematur no havia tingut cap seqüela de la seva prematuritat, i la MPIG que va tenir va ser una pleuropneumònia amb bacterièmia que va curar *ad integrum*.

En segon lloc, cal que les dues mostres siguin comparables en quant a les variables que puguin tenir influència en els resultats, com són l'origen ètnic i el sexe. En aquest estudi, les mostres eren comparables en quant a sexe: 58,3% dels casos (IC95%: 44,9%-70,7%) i 57,5% dels controls (IC95%: 47,7%-65,9%) eren de sexe masculí ( $p=0,96$ ). En quant a l'origen ètnic de casos i controls, les mostres també foren comparables: 91,67% dels casos (IC95%: 81,6%-97,2%) i 98,33% dels controls (IC95%: 94,1%-99,8%) eren d'ètnia caucàsica ( $p=1$ ).

Per a la selecció dels gens i SNPs candidats, també s'han seguit els criteris recomanats per a la realització d'estudis d'associació genètica **(76,77)**: es van seleccionar gens i SNPs amb implicació en la susceptibilitat a malalties infeccioses o inflamatòries ja

descrita a la bibliografia (28,29,31-34) i proteïnes implicades a una via de senyalització crítica per al bon funcionament de la resposta immunitària innata: la via de senyalització comuna TIR. De fet, recentment s'han descrit mutacions defectives de dos gens seleccionats (IRAK4 i MyD88) (14-17,25). Això reforça l'opinió que aquests dos gens codifiquen proteïnes crítiques de la via de senya TIR i assenyalen la manca de compensació o plasticitat en la seva absència. Finalment, els SNPs seleccionats estan situats a zones codificants o a zones que se suposen implicades en la regulació de l'expressió dels gens.

En els últims anys, en l'abordatge de les malalties infeccioses greus es persegueix l'estratificació dels malalts de forma objectiva per a assolir un diagnòstic precoç del nivell de gravetat i, en conseqüència, un maneig terapèutic més individualitzat. La concreció d'aquest model a nivell clínic constitueix el concepte "PIRO", que proposa un estadiatge dels pacients amb malalties infeccioses greus en funció de les sigles **PIRO**: Factors **P**redisposants, agent **I**nfecció, **R**esposta de l'hoste i disfunció **O**rgànica. Dins els Factors **P**redisposants s'inclouen les variacions interindividuals dels gens implicats en la resposta immunitària, les quals condicionen, en part, l'evolució d'aquests pacients (78).

En el cas de les lecitines d'unió a la manosa (MBL), un altre component del sistema immunitari innat, s'ha demostrat la protecció que ofereix un SNP vers la resposta inflamatòria i, en canvi, un risc incrementat per patir altres tipus d'infeccions bacterianes. En aquesta línia, s'han descrit casos tractats amb MBL recombinant de forma exitosa (79,80).

## 8.2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE L-SELECTINA

Un dels objectius era esbrinar si l'estudi de l'expressió de L-selectina (CD62L) és útil com a cribratge inicial de les variacions funcionals de la via de senyalització TIR. En aquest sentit, els resultats obtinguts han estat limitats. Només s'han observat diferències en l'expressió de CD62L en el grup cel·lular de monòcits i no en neutròfils, els quals són més majoritaris. Teòricament, això podria interpretar-se com a una potencial disfunció immunitària, ja que la manca de diferència de l'expressió de CD62L entre fase aguda i basal indicaria que CD62L no s'ha alliberat en fase aguda i, per tant, no s'ha activat la resposta immunitària de forma correcta. La manca de control possible (persones amb infecció pneumocòccica lleu, sense criteris de MPIG) fa que aquesta interpretació no sigui fàcil de confirmar. D'altra banda, els neutròfils són cèl·lules diferenciades y terminals, per la qual cosa no podem dir que estem davant de la mateixa cèl·lula abans o després de l'estímul. No obstant, el que és clar en aquest cas és que la mida de la mostra era petita (21 casos), per la qual cosa aquesta manca de diferència significativa podria ser deguda només a una manca de potència estadística, i no a una potencial disfunció immunitària.

El mateix es podria dir de l'estudi de la població de monòcits. Només s'han observat diferències en l'expressió de CD62L en un genotip concret d'un SNP concret (genotip CG del SNP rs4251513) tot i que la mida mostral és significativament menor, ja que queda desglosat entre tots els genotips. En aquest cas és encara més factible que la manca de diferència significativa observada en els altres genotips pugui ser deguda a aquesta manca de potència estadística.

Per aquests motius, i degut fonamentalment a la reduïda mida mostral i la consegüent baixa potència estadística, és difícil poder extreure conclusions fiables de l'estudi de

l'expressió de CD62L. Caldria un nou estudi amb disseny similar, però una mida mostral major.

D'altra banda, els treballs d'Andres *et al*, Alsina *et al* i Ingels *et al* descriuen alteracions funcionals *in vitro* de la via de senyalització TIR en pacients amb MPI (47-49). Aquests autors realitzaren l'estudi funcional analitzant l'expressió de CD62L en les mostres sanguínies dels pacients estimulades *in vitro* per lligands específics dels TLRs. Andres *et al* demostraren que l'estudi de l'expressió de CD62L es pot fer en la fase aguda de la infecció, tal com es proposa en aquest treball. En aquest cas, la innovació seria la d'utilitzar la pròpia malaltia infecciosa greu (MPIG) com a estímul de la via de senyalització TIR i la comparació seria amb el nivell de CD62L en "fase basal", es a dir, quan ja no existeix l'estímul de la MPIG. Aquesta nova aproximació comportaria un estalvi de temps i costos, però no s'han pogut extreure conclusions fiables per les raons comentades abans.

Altrament, el fet que els monòcits semblin més informatius pot estar relacionat amb el fet que són més duradors que no pas els neutròfils, els quals surten ràpidament de la circulació i fan la seva funció terminal quan reben el senyal inflamatori.

No obstant, a partir de les bases establertes per aquest treball, es podrien realitzar estudis funcionals d'aquests SNPs per a determinar la causa final de l'associació amb MPIG o amb una determinada evolució de la mateixa i així dissenyar estratègies terapèutiques específiques.

Si bé no s'ha pogut determinar l'existència de potencials disfuncions del sistema immunitari innat a través de la determinació de l'expressió de la CD62L, s'ha establert una metodologia senzilla i econòmica que permetrien realitzar nous estudis, amb una mida mostral major, que podrien permetre extreure conclusions fermes al respecte.

### 8.3. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

En primer lloc, el tamany mostral es va estimar en base a les referències bibliogràfiques i al número de pacients amb MPI de l'hospital. De la mateixa manera, una major duració del període d'estudi hauria permès detectar un major número de pacients amb MPIG i potser casos de MPIG recurrent. No obstant, els casos de MPIG recurrent són escassos, tal com han demostrat Alsina *et al* (48).

Una altra limitació seria la del número de SNPs seleccionats. Tot i que la selecció es va realitzar de forma rigorosa, tal com està descrit a l'apartat de metodologia, un estudi realitzat amb un major número de SNPs hauria pogut detectar altres associacions o determinar més les associacions trobades. De la mateixa manera, un estudi genòmic més ampli hauria pogut determinar si les associacions trobades són degudes als SNPs descrits o a altres SNPs que formin haplotips amb ells.

En quant a la variable microbiològica de l'estudi, és conegut que no tots els serotips de pneumococ tenen la mateixa capacitat invasiva. Degut a l'ampli número de serotips existents i al tamany mostral limitat de l'estudi, no s'ha pogut realitzar una anàlisi de la influència dels serotips concrets amb les associacions trobades.

Finalment, tal com s'ha esmentat abans, la manca de conclusions definitives de l'estudi funcional a través de l'expressió de la CD62L ha limitat la interpretació dels resultats d'aquest treball. No es pot determinar, per tant, si els SNPs associats a la presència de MPIG o a determinades variables de gravetat causen un excés o un defecte de funció en la via de senyalització TIR. Probablement, si s'hagués ampliat l'estudi amb la determinació de CD62L després d'estimular *in vitro* les cèl·lules dels pacients amb lligands específics, s'haurien pogut extreure conclusions al respecte.



## **9. CONCLUSIONS**

**9.1.** Aquest és el primer estudi que demostra associació de polimorfismes genètics (SNPs) d'IRAK1, IRAK4 i MyD88 amb la presència de malaltia pneumocòccica invasiva greu (MPIG).

**9.2.** Alguns SNPs de la via de senyalització TIR estan relacionats amb un risc incrementat de desenvolupar una MPIG:

- Genotip CC de rs1059701 a IRAK1
- Al·lel C de rs4251513 i al·lel T de rs1461567 a IRAK4
- Al·lel A de rs6853 a MyD88

**9.3.** Alguns SNPs de la via de senyalització TIR estan relacionats amb l'evolució dels pacients amb MPIG:

- Presència de pleuropneumònia amb al·lel G de rs1624395 i al·lel C de rs1370128 a IRAK4.
- Presència de leucocitosi amb genotips CT+TT de rs1059702 a IRAK1.
- Presència d'*exitus* amb genotips AG+GG i al·lel G a MyD88.
- Presència de seqüeles de qualsevol tipus amb genotips CG+CC de rs4251513 a IRAK4.

**9.4.** La identificació dels SNPs que causen alteracions en la via de senyalització TIR podrà ajudar a estratificar els pacients amb malalties infeccioses greus i a dissenyar tractaments personalitzats.



**9.5.** Probablement, nous estudis funcionals amb una mida mostral major podran ajudar a entendre les conseqüències funcionals d'aquestes associacions: en tot cas, les variacions genètiques descrites podrien causar variacions en la senyalització mitjançada pels TLRs i, en conseqüència, variacions en la resposta immunitària innata. Alhora, l'estudi de la valoració dels nivells de CD62L en monòcits durant i després de la MPIG pot ser una eina senzilla per a l'avaluació de la capacitat funcional de la via, especialment amb el grup d'heterozigots pel polimorfisme rs4251513 d'IRAK4, que ja ha demostrat la seva implicació en diferents respostes immunitàries.

## **10. BIBLIOGRAFIA**

- (1). O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009;374(9693):893-902.
- (2). Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(4):288-301.
- (3). Price KE, Camilli A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2009;191(7):2163-8.
- (4). Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2857-62.
- (5). Cao J, Gong Y, Yin Y, Wang L, Ying B, Chen T, et al. Pneumococcal proteins PspA and PspC induce CXCL8 production in human neutrophils: implications in pneumococcal infections. *Microbes Infect* 2010;12(12-13):1051-60.
- (6). Sanchez CJ, Shivshankar P, Stol K, Trakhtenbroit S, Sullam PM, Sauer K, et al. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog* 2010;6(8):e1001044.

- (7). Shivshankar P, Sanchez C, Rose LF, Orihuela CJ. The Streptococcus pneumoniae adhesin PsrP binds to Keratin 10 on lung cells. *Mol Microbiol* 2009;73(4):663-79.
- (8). Bogaert D, de Groot R, Hermans PW. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004;4:144-54.
- (9). Mariscalco MM. Innate immunity in critical care. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006;17(1):25-35.
- (10). Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343(5):338-44.
- (11). McDonald DR, Levy O. Innate Immunity. A: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, editors. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2013. p. 35-46.
- (12). Liu AH, Johnston RB, Fenton MJ. Innate Immunity. A: Adkinson. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2014. p. 2-19.
- (13). Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):499-511.
- (14). Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299(5615):2076-9.

- (15). Ku CL, von BH, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007;204(10):2407-22.
- (16). von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008;321(5889):691-6.
- (17). Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, et al. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)* 2010;89(6):403-25.
- (18). Wynn J, Cornell TT, Wong HR, Shanley TP, Wheeler DS. The host response to sepsis and developmental impact. *Pediatrics* 2010;125(5):1031-41.
- (19). Wynn JL, Scumpia PO, Winfield RD, Delano MJ, Kelly-Scumpia K, Barker T, et al. Defective innate immunity predisposes murine neonates to poor sepsis outcome but is reversed by TLR agonists. *Blood* 2008;112(5):1750-8.
- (20). Wynn JL, Cvijanovich NZ, Allen GL, Thomas NJ, Freishtat RJ, Anas N, et al. The influence of developmental age on the early transcriptomic response of children with septic shock. *Mol Med* 2011;17(11-12):1146-56.
- (21). Le Rouzic V, Corona J, Zhou H. Postnatal development of hepatic innate immune response. *Inflammation* 2011;34(6):576-84.

(22). Martín Mateos, MA. Desarrollo de la inmunidad en el niño. Enfermedades por inmunodeficiencia. A: Martín Mateos, MA. Tratado de Alergología Pediátrica, 2ª edición. Madrid Ergon; 2011. p. 1-12.

(23). Casanova JL, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:215-43.

(24). Picard C, Puel A, Bustamante J, Ku CL, Casanova JL. Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3(6):451-9.

(25). Ku CL, Picard C, Erdos M, Jeurissen A, Bustamante J, Puel A, et al. IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease. *J Med Genet* 2007;44(1):16-23.

(26). Lager K, Evans WE. Pharmacogenomics and Hematologic Disease. A: Hoffman. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2013. p. 65-76.

(27). Ringwood L, Li L. The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine* 2008;42(1):1-7.

(28). Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, He Q, Svetkauskaite D, Murphy JR, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(12):1335-41.

(29). Toubiana J, Courtine E, Pene F, Viallon V, Asfar P, Daubin C, et al. IRAK1 functional genetic variant affects severity of septic shock. *Crit Care Med* 2010;38(12):2287-94.

(30). Liu G, Tsuruta Y, Gao Z, Park YJ, Abraham E. Variant IL-1 receptor-associated kinase-1 mediates increased NF-kappa B activity. *J Immunol* 2007;179(6):4125-34.

(31). Balaci L, Spada MC, Olla N, Sole G, Loddo L, Anedda F, et al. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *Am J Hum Genet* 2007;80(6):1103-14.

(32). Pino-Yanes M, Sánchez-Machín I, Cumplido J, Figueroa J, Torres-Galván MJ, González R, et al. IL-1 receptor-associated kinase 3 gene (IRAK3) variants associate with asthma in a replication study in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(2):573-5.

(33). Sutherland AM, Walley KR, Nakada TA, Sham AH, Wurfel MM, Russell JA. A nonsynonymous polymorphism of IRAK4 associated with increased prevalence of gram-positive infection and decreased response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun* 2011;3(5):447-58

(34). Tewfik MA, Bosse Y, Lemire M, Hudson TJ, Vallee-Smejda S, Al-Shemari H, et al. Polymorphisms in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 are associated with total serum IgE. *Allergy* 2009;64(5):746-53.

(35). George J, Motshwene PG, Wang H, Kubarenko AV, Rautanen A, Mills TC, et al. Two human MYD88 variants, S34Y and R98C, interfere with MyD88-IRAK4-myddosome assembly. *J Biol Chem* 2011;286(2):1341-53.

(36). Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S, et al. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* 2004; 172(5):3132-8.

(37). Basset A, Zhang F, Benes C, Sayeed S, Herd M, Thompson C, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 mediates inflammatory responses to oligomerized RrgA pneumococcal pilus type 1 protein. *J Biol Chem* 2013;288(4):2665-75.

(38). Clarke TB, Francella N, Huegel A, Weiser JN. Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe* 2011;9(5):404-14.

(39). Schroder NW, Morath S, Alexander C Hamann L, Hartung T, Zahringer U, et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding

protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003;278(18):15587-94.

(40). Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(4):1966-71.

(41). Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, et al. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun* 2005;73(10):6479-87.

(42). Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, Snapper CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol* 2007;245(2):103-10.

(43). Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 2007;9(3):633-44.

(44). van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009;374(9700):1543-56.

(45). Casal J, Tarragó D. Immunity to *Streptococcus pneumoniae*: Factors affecting production and efficacy. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(3):219-24.



(46). Gaschignard J, Levy C, Chrabieh M, Boisson B, Bost-Bru C, Dauger S, et al. Invasive pneumococcal disease in children can reveal a primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 2014;59(2):244-51.

(47). Andres O, Strehl K, Kölsch U, Kunzmann S, Lebrun AH, Stroh T, et al. Even in pneumococcal sepsis CD62L shedding on granulocytes proves to be a reliable functional test for the diagnosis of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(9):1017-9.

(48). Alsina L, Basteiro MG, de Paz HD, Iñigo M, de Sevilla MF, Triviño M, et al. Recurrent invasive pneumococcal disease in children: underlying clinical conditions, and immunological and microbiological characteristics. *PLoS One* 2015;10(3):e0118848.

(49). Ingels H, Schejbel L, Lundstedt A, Jensen L, Laursen IA, Ryder LP, et al. Immunodeficiency among Children with Recurrent Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatr Infect Dis J* 2015;34(6):644-51.

(50). Hirschfeld AF, Bettinger JA, Victor RE, Davidson DJ, Currie AJ, Ansermino JM, et al. Prevalence of Toll-like receptor signalling defects in apparently healthy children who developed invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol* 2007;122(3):271-8.

(51). Dalgic N, Tekin D, Kayaalti Z, Soylemezoglu T, Cakir E, Kilic B, et al. Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis. *Hum Immunol* 2011;72(5):440-5.

(52). Faber J, Henninger N, Finn A, Zenz W, Zepp F, Knuf M. A toll-like receptor 4 variant is associated with fatal outcome in children with invasive meningococcal disease. *Acta Paediatr* 2009;98(3):548-52.

(53). Nachtigall I, Tamarkin A, Tafelski S, Weimann A, Rothbart A, Heim S, et al. J Int Med Res. Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients. *J Int Med Res* 2014;42(1):93-110.

(54). Yuan FF, Marks K, Wong M, Watson S, de LE, McIntyre PB, et al. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 2008;86(3):268-70.

(55). Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Rautanen A, Walley A, Segal S, et al. Common NFKBIL2 polymorphisms and susceptibility to pneumococcal disease: a genetic association study. *Crit Care* 2010;14(6):R227.

(56). Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Rautanen A, Segal S, Moore CE, et al. NFKBIZ polymorphisms and susceptibility to pneumococcal disease in European and African populations. *Genes Immun.* 2010 Jun;11(4):319-25.

(57). Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, Frodsham A, Walley A, Maskell NA, et al. IkappaB genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(2):181-7.

(58). Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007;39(4):523-8.

(59). Zhai R, Zhou W, Gong MN, Thompson BT, Su L, Yu C, et al. Inhibitor kappaB-alpha haplotype GTC is associated with susceptibility to acute respiratory distress syndrome in Caucasians. *Crit Care Med* 2007;35(3):893-8.

(60). von Bernuth H, Ku CL, Rodriguez-Gallego C, Zhang S, Garty BZ, Marodi L, et al. A fast procedure for the detection of defects in Toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 2006;118(6):2498-503.

(61). Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(6):2244-8.

(62). Munoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia JJ, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 2008;46(2):174-82.

(63). Pollack MM, Ruttimann UE, Getson PR. Pediatric risk of mortality (PRISM) score. *Crit Care Med* 1988;16:1110-6.

(64). Pollack MM, Patel KM, Ruttimann UE. PRISM III: an updated Pediatric Risk of Mortality score. *Crit Care Med* 1996;24:743-52.

(65). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA.

(66). Muñoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarragó D, Pallares R. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(3):327-35.

(67). Tarragó D, Fenoll A, Sánchez-Tatay D, Arroyo LA, Muñoz-Almagro C, Esteva C et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel realtime PCR. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(9):828-34.

(68). SNP Analysis To Results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, Gazave E, de Cid R, Milne R, et al. *Bioinformatics* 2008;24(23):2790-1.

(69). Agresti, A. *Categorical Data Analysis*. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.

(70). Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1995;57(1):289-300.

(71). Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cellular Microbiology* 2012;14(4),460-466

(72). Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(1):2-8.

(73). Yildirim I, Stevenson A, Hsu KK, Pelton SI. Evolving picture of invasive pneumococcal disease in Massachusetts children: A comparison of disease in 2007–2009 with earlier periods. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:1016-1021

(74). de Sevilla MF, García-García JJ, Esteva C, Moraga F, Hernández S, Selva L, et al. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(2):124-8.

(75). Muñoz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C, Marco F, Navarro M, Bartolome R, et al. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect* 2011;63(2):151-62.

(76). Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005;366(9493):1315-23.

(77). Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, et al. STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA)- An Extension of the STROBE Statement. *PLoS Med* 2009;6(2):e22.

(78). Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(3 Suppl):S55-S60.

(79). Valdimarsson H, Stefansson M, Vikingsdottir T, Arason GJ, Koch C, Thiel S, et al. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand J Immunol* 1998;48:116-123.

(80). Garred P, Pressler T, Lanng S, Madsen HO, Moser C, Laursen I, et al. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2002;33:201-207.



## **11. ANNEXOS**

### **ANNEX 1: Definicions de Síndrome de Resposta Inflamatòria Sistèmica, Infecció, Sèpsia, Sèpsia greu i Xoc sèptic. (72)**

#### **Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SRIS):**

Presència d'almenys dos dels següents criteris, un dels quals ha de ser el de la temperatura anormal o el recompte leucocitari:

- Temperatura central (oral, rectal, vesical o sensor intravenós central)  $>38,5$  °C o  $<36$  °C).
- Taquicàrdia, definida com:
  - o Freqüència cardíaca mitjana superior a 2 desviacions estàndard del valor normal per l'edat (\*) en absència d'estímuls externs, medicaments d'ús crònic o estímuls dolorosos; o
  - o Elevació de la freqüència cardíaca de forma persistent i inexplicada durant un període de temps de 0,5 a 4 hores; o
  - o Per lactants menors de 12 mesos: bradicàrdia, definida com
    - Freqüència cardíaca mitjana inferior al valor corresponent al percentil 10 per edat en absència d'estímuls vagals externs, fàrmacs beta-bloquejants o cardiopatia congènita; o
    - Disminució de la freqüència cardíaca de forma persistent i inexplicada durant un període de temps de 0,5 hores.
- Freqüència respiratòria augmentada més enllà de 2 desviacions estàndard per edat o necessitat de ventilació mecànica per a un procés agut no relacionat amb patologia neuromuscular de base o anestèsia general.



- Recompte leucocitari elevat o disminuït en relació als valors normals per edat (**taula 22**) (no secundari a leucopènia induïda per quimioteràpia) o recompte de neutròfils immadurs superior al 10%.

**Infecció:**

- Sospitada o demostrada (per cultiu positiu, tinció de teixit o test de reacció en cadena de la polimerasa) causada per qualsevol patogen, o
- Síndrome clínica associada a una probabilitat elevada d'infecció. L'evidència d'infecció inclou troballes a l'exploració física, proves d'imatge o de laboratori (per exemple, presència de leucòcits a un líquid corporal normalment estèril, perforació d'una víscera, radiografia de tòrax compatible amb pneumònia, exantema petequíal o purpúric o *purpura fulminans*).

**Sèpsia:**

SRIS en presència o com a resultat d'una infecció sospitada o demostrada.

**Sèpsia greu:**

Sèpsia més un dels següents criteris:

- Disfunció cardiovascular
- Síndrome de destret respiratori agut
- Dos o més disfuncions d'altres òrgans (\*)

**Xoc sèptic:**

Sèpsia més disfunció cardiovascular tal com està definida a (\*).

**Taula 22. Valors específics per edat de les constants vitals i recompte leucocitari (els valors inferiors es refereixen al percentil 5 i els valors superiors es refereixen al percentil 95).**

<b>Edat</b>	<b>Taquicàrdia</b> (batecs per minut)	<b>Bradicàrdia</b> (batecs per minut)	<b>Freqüència respiratòria</b> (respiracions per minut)	<b>Recompte leucocitari</b> (leucòcits per mmc)	<b>Tensió arterial sistòlica</b> (mmHg)
<b>&lt;1 setmana</b>	>180	<100	>50	>34000	<65
<b>1 stm-1 mes</b>	>180	<100	>40	>19500 <5000	<75
<b>1 mes-1 any</b>	>180	<90	>34	>17500 <5000	<100
<b>2-5 anys</b>	>140	No aplicable	>22	>15500 <6000	<94
<b>6-12 anys</b>	>130	No aplicable	>18	>13500 <4500	<105
<b>13-&lt;18 anys</b>	>110	No aplicable	>14	>11000 <4500	<117

**(\*) Criteris de disfunció orgànica.**

1. Disfunció cardiovascular (s'ha de complir almenys un punt dels següents)

(A pesar de l'administració de més de 40 ml/kg de líquids isotònics intravenosos en una hora)

- Tensió arterial inferior al valor corresponent al percentil 5 per edat o a 2 desviacions estàndard per edat.
- Necessitat de fàrmacs vasoactius per a mantenir la tensió arterial en valors normals (dopamina a més de 5 mcg/kg/minut o dobutamina, adrenalina o noradrenalina a qualsevol dosi).
- Dos dels següents criteris:
  - o Acidosi metabòlica inexplicada (excés de base inferior a -5 meq/l)
  - o Increment del lactat arterial a més del doble del normal
  - o Oligúria inferior a 0,5 ml/kg/h
  - o Temps de re ompliment capil·lar superior a 5 segons

- Diferència entre temperatura central i perifèrica superior a 3 °C

2. Disfunció respiratòria (s'ha de complir almenys un punt dels següents)

- Quocient PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub> inferior a 300 en absència de cardiopatia congènita cianosant o patologia pulmonar preexistent.
- PaCO<sub>2</sub> superior a 65 torr o 20 mmHg per sobre dels valors basals de PaCO<sub>2</sub>.
- Necessitat de FiO<sub>2</sub> superior al 50% per a mantenir saturació igual o superior al 92%.
- Necessitat de ventilació mecànica (invasiva o no invasiva) no electiva.

3. Disfunció neurològica (s'ha de complir almenys un punt dels següents)

- Puntuació a l'escala de Glasgow inferior a 11 punts.
- Canvi agut de l'estat mental resultant en un descens d'almenys 3 punts en l'escala de Glasgow des d'un valor ja anormal.

4. Disfunció hematològica (s'ha de complir almenys un punt dels següents)

- Recompte plaquetari inferior a 80000/mmc o, per a pacients crònics hematològics i oncològics, descens d'almenys un 50% del valor màxim dels últims 3 dies.
- Valor d'INR superior a 2.

5. Disfunció renal

- Valor de creatinina sèrica superior al doble del normal o increment de 2 vegades el valor basal.

6. Disfunció hepàtica (s'ha de complir almenys un punt dels següents)

- Valor de bilirubina total superior a 4 mg/dl (no aplicable al nounat).
- Valor d'ALT superior al doble del normal per edat.

ANNEX 2.

Taula 23. *Pediatric Risk Mortality Score*, versió III (PRISM-III)

<b>Hemodinàmic</b>		<b>Tensió arterial sistòlica (mmHg)</b> (3 punts)	<b>Tensió arterial sistòlica (mmHg)</b> (7 punts)	<b>Freqüència cardíaca (bpm)</b> (3 punts)	<b>Freqüència cardíaca (bpm)</b> (4 punts)
	Nounat	40-55	<40	215-225	>225
	1-12 mesos	45-65	<45	215-225	>225
	1-12 anys	55-75	<55	185-205	>205
	>12 anys	65-85	<65	145-155	>155
<b>Temperatura</b>	Totes les edats	<33 °C >40 °C			
<b>Reflex fotomotor</b>		Una areactiva (7 punts)		Fixes >3mm (11 punts)	
<b>Estat mental</b>		Escala Glasgow <8 (5 punts)			
<b>pH</b>		7,10-7,28 (2 punts)	<7,0 (6 punts)	7,48-7,55 (2 punts)	>7,55 (3 punts)
<b>CO<sub>2</sub> total (mEq/l)</b>		>34 (4 punts)			
<b>PCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>		50-75 (1 punt)		>75 (3 punts)	
<b>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</b>		42-49,9 (3 punts)		<42 (6 punts)	
<b>Potassi (mEq/l)</b>		>6,9 (3 punts)			
<b>Glucosa (mg/dl)</b>		>200 (2 punts)			
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	Nounat	>0,85 (2 punts)			
	1m-12anys	>0,90 (2 punts)			
	>12 anys	>1,30 (2 punts)			
<b>BUN (mg/dl)</b>	Nounat	>11,9 (3 punts)			
	Altres edats	>14,9 (3 punts)			
<b>Leucòcits (/mmc)</b>	Totes les edats	<3000 (4 punts)			
<b>Plaquetes (/mmc)</b>		100000-200000 (2 punts)	50000-99999 (4 punts)	<50000 (5 punts)	
<b>Temps de protrombina</b>		<20% (3 punts)			



### ANNEX 3: Formulari de consentiment informat (casos)

#### **Formulario de Consentimiento Informado**

Las **infecciones** causadas por el **neumococo (*Streptococcus pneumoniae*)** son frecuentes en la edad infantil. En algunos niños, estas infecciones se manifiestan con mayor gravedad que en otros. Ello puede ser debido a una mayor agresividad del microorganismo o a una predisposición del propio paciente.

En los últimos años, la investigación de la infección grave causada por el neumococo se está dirigiendo a los factores predisponentes de cada paciente, como las variaciones genéticas individuales. La detección de estos factores podría ser de utilidad para conocer los niños en riesgo de padecer una infección grave por neumococo y actuar de forma preventiva o precoz.

Actualmente llevamos a cabo un **estudio para analizar la relación entre las variaciones genéticas individuales en los genes responsables de la respuesta inmunitaria (defensas) y el desarrollo de una infección grave por neumococo**. Para ello es preciso obtener una muestra de sangre de su hijo/a de aproximadamente 2 mililitros en la fase aguda de la infección. Con esta muestra se estudiarán algunos de los genes responsables de la respuesta inmunitaria de su hijo/a.

La finalidad de la investigación es la mejora los conocimientos sobre la patología que afecta a su hijo/a y no supone ningún beneficio directo para él/ella. La participación es voluntaria y la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en los cuidados médicos de su hijo/a.

Se guardará **confidencialidad** acerca de su identidad y no será informado de los resultados de los estudios que se realicen, salvo que lo solicite expresamente. Dichos resultados podrán ser utilizados para una posible publicación científica, guardando estricta confidencialidad sobre la identidad de su hijo/a.

#### **CONSENTIMIENTO**

Yo,.....(nombre y apellidos), con DNI ..... , en calidad de ..... (parentesco) del niño/a ..... , he leído y comprendido la información relativa a la realización del estudio de biología molecular y he podido preguntar las dudas que he considerado importantes.

Por todo ello, doy mi consentimiento para participar en dicho estudio.

He sido informado por el facultativo Dr/Dra.....

En Esplugues, a..... de ..... de 20.....

Firma del padre/madre/tutor

Firma del facultativo



## ANNEX 4: Formulari de consentiment informat (controls)

### **Formulario de Consentimiento Informado**

Las **infecciones** causadas por el **neumococo (*Streptococcus pneumoniae*)** son frecuentes en la edad infantil. En algunos niños, estas infecciones se manifiestan con mayor gravedad que en otros. Ello puede ser debido a una mayor agresividad del microorganismo o a una predisposición del propio paciente.

En los últimos años, la investigación de la infección grave causada por el neumococo se está dirigiendo a los factores predisponentes de cada paciente, como las variaciones genéticas individuales. La detección de estos factores podría ser de utilidad para conocer los niños en riesgo de padecer una infección grave por neumococo y actuar de forma preventiva o precoz.

Actualmente llevamos a cabo un **estudio para analizar la relación entre las variaciones genéticas individuales en los genes responsables de la respuesta inmunitaria (defensas) y el desarrollo de una infección grave por neumococo**. Para ello es preciso estudiar a los pacientes con esta infección (casos) y compararlos con pacientes sin ella (controles). **Su hijo/a ha sido seleccionado/a para participar en el estudio como CONTROL**. Para ello es necesario obtener una muestra de sangre de su hijo/a de aproximadamente 1 mililitro, coincidiendo con una extracción por otro motivo. Con esta muestra se estudiarán algunos de los genes responsables de la respuesta inmunitaria de su hijo/a.

La finalidad de la investigación es la mejora los conocimientos sobre una patología grave que afecta a muchos niños/as, y no supone ningún beneficio directo para su hijo/a. La participación es voluntaria y la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en los cuidados médicos de su hijo/a.

Se guardará **confidencialidad** acerca de su identidad y no será informado de los resultados de los estudios que se realicen, salvo que lo solicite expresamente. Dichos resultados podrán ser utilizados para una posible publicación científica, guardando estricta confidencialidad sobre la identidad de su hijo/a.

### **CONSENTIMIENTO**

Yo,.....(nombre y apellidos), con DNI ....., en calidad de ..... (parentesco) del niño/a ....., he leído y comprendido la información relativa a la realización del estudio de biología molecular y he podido preguntar las dudas que he considerado importantes.

Por todo ello, doy mi consentimiento para participar en dicho estudio.

He sido informado por el facultativo Dr./Dra.....

En Esplugues, a..... de ..... de 20.....

Firma del padre/madre/tutor

Firma del facultativo





## ANNEX 5: Certificat d'aprovació del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC)



### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Jesús Pineda Sánchez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica  
Fundació Sant Joan de Déu Esplugues de Llobregat (Barcelona)

### CERTIFICA

Que en la reunió del Comitè Ètic de Investigació Clínica de la Fundació Sant Joan de Déu celebrada el dia 27 de mayo de 2010 se valoró la realització de la Ajuda de Fin de Residencia del Dr. **Jaume Carrasco** del protocolo de estudio titulado **"Influència dels Polimorfismes en les vies de senyalització dels Toll-Like Receptors (TLR) en la malaltia pneumocòcica invasiva greu"**. Código CEIC PIC-21-10. Cuyo director de proyecto es la Dra. Iolanda Jordan.

Se **aprueba** la realización del estudio.

Lo que firmo en Esplugues de Llobregat (Barcelona), a 7 de junio de 2010

Firmado:



Don Jesús Pineda Sánchez  
Secretario CEIC Fundación SJD



**ANNEX 6: Resultats complets de l'objectiu 1.3 (conèixer si aquests SNPs determinen l'evolució dels pacients amb MPIG) (taules 24-33)**

**Taula 24. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1059701 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1843 0,4607	2,701 (0,623-11,708)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1891 0,4727	2,446 (0,644-9,289)
	<i>C</i>	Test tendència lineal	0,1610 0,5144	1,417 (0,870-2,308)
		Entre al·lels	0,3998 0,6664	1,680 (0,502-5,622)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5295 0,6158	1,390 (0,498-3,882)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,4249 0,6939	1,581 (0,513-4,870)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,5549 0,7790	1,149 (0,725-1,819)
		Entre al·lels	0,4353 0,7932	1,348 (0,637-2,855)
<b>Meningitis</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,2774 0,5559	2,344 (0,504-10,906)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,7086 0,9290	1,509 (0,175-13,033)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,4346 0,7582	1,306 (0,669-2,550)
		Entre al·lels	0,8477 0,9100	1,183 (0,213-6,572)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0658 0,2360	3,205 (0,927-11,086)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,0317 0,1317	4,136 (1,132-15,107)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,0469 0,1173	1,596 (1,006-2,531)
		Entre al·lels	0,0406 0,1353	3,265 (1,052-10,133)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,2637 0,4126	2,202 (0,552-8,789)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1655 0,6837	2,841 (0,650-12,424)
	<i>C</i>	Test tendència lineal	0,4226 0,6314	1,243 (0,731-2,115)
		Entre al·lels	0,4833 0,6874	1,602 (0,429-5,984)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6179 0,9635	1,577 (0,263-9,455)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,7247 0,9765	1,451 (0,183-11,540)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,6046 0,9871	1,180 (0,631-2,208)
		Entre al·lels	0,9363 0,9908	1,073 (0,191-6,024)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4648 0,8863	1,738 (0,395-7,645)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,4664 0,9432	1,885 (0,342-10,375)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,4693 0,7821	1,245 (0,6827-2,256)
		Entre al·lels	0,3828 0,6832	1,740 (0,502-6,031)

PrCR >250 mg/l	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5271 0,9239	1,606 (0,369-6,989)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,5648 0,9501	1,655 (0,298-9,193)
	T	Test tendència lineal	0,5342 0,7631	1,200 (0,676-2,130)
		Entre al·lels	0,4605 0,8383	1,639 (0,441-6,084)
Major temps febre	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0708 0,3199	-
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1326 0,3314	-
	T	Test tendència lineal	0,0687 0,2717	-
		Entre al·lels	0,0958 0,3192	-
UCIP	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1477 0,4924	2,438 (0,729-8,149)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,5709 0,8215	1,809 (0,233-14,053)
	T	Test tendència lineal	0,2973 0,7433	1,359 (0,763-2,418)
		Entre al·lels	0,7400 0,9007	1,251 (0,334-4,689)
VMI	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9075 0,9593	1,161 (0,093-14,479)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,7553 0,7850	1,273 (0,279-5,813)
		Test tendència lineal	0,8217 0,9130	1,082 (0,546-2,145)
		Entre al·lels	0,3555 0,7883	2,089 (0,438-9,971)
Necessitat d'inotrópics	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0583 0,2212	3,635 (0,955-13,831)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,0819 0,2396	3,898 (0,842-18,044)
	T	Test tendència lineal	0,0353 0,1875	1,577 (1,032-2,409)
		Entre al·lels	0,0645 0,2536	3,759 (0,924-15,303)
Curació	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5799 0,8284	1,439 (0,397-5,222)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,3082 0,7422	1,890 (0,556-6,433)
	C	Test tendència lineal	0,3947 0,7484	1,245 (0,752-2,063)
		Entre al·lels	0,3628 0,8054	1,637 (0,566-4,728)
Exitus	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5371 0,7570	1,563 (0,378-6,459)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,6843 0,8387	1,403 (0,274-7,182)
	T	Test tendència lineal	0,5336 0,7623	1,157 (0,731-1,831)
		Entre al·lels	0,6330 0,7968	1,427 (0,332-6,137)
Seqüeles	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4218 0,8416	1,638 (0,492-5,456)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,3079 0,6159	1,138 (0,333-3,894)
	T	Test tendència lineal	0,5405 0,6756	1,168 (0,710-1,924)
		Entre al·lels	0,4686 0,5981	1,462 (0,524-4,079)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 25. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1059702 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0369</i> 0,3693	6,404 (1,119-36,642)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1380 <i>0,4600</i>	3,008 (0,702-12,888)
	T	Test tendència lineal	0,0501 0,4659	1,836 (1,000-3,370)
		Entre al·lels	0,1801 0,6140	2,424 (0,664-8,848)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,4087 0,6158	2,035 (0,377-10,973)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,4857 0,6939	1,584 (0,435-5,774)
	C	Test tendència lineal	0,4205 0,7790	1,278 (0,704-2,319)
		Entre al·lels	0,5583 0,7932	1,406 (0,449-4,397)
<b>Meningitis</b>	<i>CC</i>	Amb l'altre genotip	0,4192 0,9290	1,960 (0,383-10,036)
	<i>CT+CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	<i>0,0406</i> 0,4056	6,020 (1,080-33,549)
	C	Test tendència lineal	0,1914 0,7582	1,615 (0,787-3,313)
		Entre al·lels	0,4730 0,9100	1,857 (0,343-10,060)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0395 0,1317	3,883 (1,067-14,130)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	<i>0,0046</i> <b>0,0460</b>	<b>7,500 (1,862-30,214)</b>
	C	Test tendència lineal	0,0115 0,1148	2,003 (1,169-3,432)
		Entre al·lels	0,0282 0,1353	3,757 (1,152-12,253)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1029 0,4126	4,128 (0,751-22,680)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,3124 0,6837	2,073 (0,504-8,528)
	C	Test tendència lineal	0,5345 0,6314	1,223 (0,648-2,305)
	T	Entre al·lels	0,5500 0,6874	1,514 (0,389-5,900)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,8917 0,9765	1,135 (0,183-7,040)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,6496 0,9635	1,687 (0,177-16,119)
	C	Test tendència lineal	0,7364 0,9871	1,146 (0,517-2,541)
		Entre al·lels	0,9730 0,9908	1,029 (0,193-5,485)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,8129 0,8863	1,283 (0,163-10,131)
	<i>CC</i>	Amb l'altre genotip	0,9593 0,9593	1,040 (0,234-4,619)
	T	Test tendència lineal	0,8975 0,8975	1,045 (0,537-2,032)
		Entre al·lels	0,8620 0,8620	1,126 (0,296-4,275)

PrCR >250 mg/l	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,3779 0,9239	2,313 (0,359-14,197)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,7142 0,9501	1,299 (0,321-5,264)
	T	Test tendència lineal	0,4675 0,7631	1,255 (0,680-2,313)
		Entre al-lels	0,5868 0,8383	1,432 (0,392-5,223)
Major temps febre	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,1221 0,3314	-
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,3025 0,4322	-
	C	Test tendència lineal	0,1743 0,3486	-
		Entre al-lels	0,1818 0,3635	-
UCIP	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,1241 0,8215	3,126 (0,731-13,363)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,0123 0,1227	11,024 (1,685-72,130)
	C	Test tendència lineal	0,0416 0,4156	2,069 (1,028-4,164)
		Entre al-lels	0,1604 0,6519	2,828 (0,662-12,081)
VMI	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,5760 0,8229	1,598 (0,309-8,267)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,3127 0,7850	3,612 (0,298-43,708)
	C	Test tendència lineal	0,3754 0,7507	1,416 (0,656-3,057)
		Entre al-lels	0,6797 0,7941	1,422 (0,267-7,563)
Necessitat d'inotrópics	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,0713 0,2396	3,679 (0,893-15,198)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,1118 0,2795	4,140 (0,719-23,842)
	C	Test tendència lineal	0,0562 0,1875	1,612 (0,987-2,630)
		Entre al-lels	0,0761 0,2536	3,891 (0,867-17,454)
Curació	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,4585 0,7422	1,809 (0,378-8,661)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,2356 0,7853	2,249 (0,589-8,585)
	T	Test tendència lineal	0,3390 0,7484	1,332 (0,740-2,395)
		Entre al-lels	0,4036 0,8054	1,706 (0,487-5,979)
Exitus	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,6619 0,8387	1,393 (0,315-6,161)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,8111 0,8111	1,261 (0,188-8,454)
	C	Test tendència lineal	0,7406 0,8229	1,095 (0,640-1,873)
		Entre al-lels	0,7860 0,7968	1,239 (0,264-5,808)
Seqüeles	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,3079 0,6159	1,995 (0,529-7,526)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,6427 0,8416	1,431 (0,315-6,507)
	C	Test tendència lineal	0,4748 0,6756	1,237 (0,690-2,218)
		Entre al-lels	0,4785 0,5981	1,556 (0,458-5,289)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%



**Taula 26. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1059703 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1365 0,4600	5,541 (0,582-52,760)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1579 0,4727	3,472 (0,617-19,543)
	<i>C</i>	Test tendència lineal	0,0932 0,4659	1,689 (0,916-3,114)
		Entre al·lels	0,3070 0,6140	2,331 (0,460-11,820)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4792 0,6158	1,734 (0,378-7,959)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,2130 0,6939	4,017 (0,450-35,844)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,4022 0,7790	1,324 (0,686-2,555)
		Entre al·lels	0,3921 0,7932	1,741 (0,489-6,202)
<b>Meningitis</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4353 0,5559	1,950 (0,364-10,438)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,9166 0,9290	1,148 (0,086-15,286)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,6111 0,7639	1,222 (0,565-2,644)
	<i>C</i>	Entre al·lels	0,9100 0,9100	1,111 (0,180-6,840)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0773 0,2360	3,326 (0,877-12,615)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,0209 0,1317	9,148 (1,398-59,861)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,0467 0,1173	1,733 (1,008-2,981)
		Entre al·lels	0,0555 0,1387	3,092 (0,974-9,819)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,2888 0,4126	2,147 (0,523-8,811)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1440 0,6837	3,798 (0,634-22,751)
	<i>C</i>	Test tendència lineal	0,4756 0,6314	1,240 (0,686-2,242)
		Entre al·lels	0,5484 0,6874	1,512 (0,392-5,840)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9119 0,9635	1,121 (0,147-8,554)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,9271 0,9765	1,151 (0,056-23,496)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,9049 0,9871	1,049 (0,481-2,286)
	<i>C</i>	Entre al·lels	0,8781 0,9908	1,174 (0,150-9,165)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5625 0,8863	1,653 (0,302-9,055)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,7546 0,9432	1,500 (0,118-19,081)
	<i>T</i>	Test tendència lineal	0,6133 0,8762	1,219 (0,566-2,626)
		Entre al·lels	0,5554 0,7934	1,535 (0,369-6,384)

<b>PrCR &gt;250 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,7394 0,9239	1,344 (0,235-7,691)
	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9501 0,9501	1,085 (0,083-14,170)
	T	Test tendència lineal	0,8133 0,9314	1,097 (0,507-2,374)
		Entre al-lels	0,7375 0,9219	1,294 (0,286-5,851)
<b>Major temps febre</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1272 0,3199	-
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,0591 0,3314	-
	T	Test tendència lineal	0,0815 0,2717	-
		Entre al-lels	0,0873 0,3192	-
<b>UCIP</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,3849 0,5459	1,799 (0,478-6,769)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,5467 0,8215	2,436 (0,135-44,035)
	T	Test tendència lineal	0,4253 0,7712	1,291 (0,689-2,418)
		Entre al-lels	0,8746 0,9007	1,125 (0,261-4,849)
<b>VMI</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,6469 0,7850	1,491 (0,270-8,248)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,3133 0,7663	3,929 (0,275-56,158)
	C	Test tendència lineal	0,9313 0,9313	1,030 (0,523-2,028)
		Entre al-lels	0,5906 0,7941	1,521 (0,330-7,004)
<b>Necessitat d'inotrópics</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0663 0,2212	3,971 (0,911-17,308)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1050 0,2396	4,498 (0,730-27,712)
	T	Test tendència lineal	0,0480 0,1875	1,640 (1,004-2,676)
		Entre al-lels	0,5524 0,7517	4,222 (0,887-20,100)
<b>Curació</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1372 0,7853	5,508 (0,581-52,233)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1770 0,7422	3,221 (0,590-170598)
	C	Test tendència lineal	0,2002 0,7484	1,665 (0,763-3,631)
		Entre al-lels	0,1843 0,8054	2,724 (0,621-11,955)
<b>Exitus</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6813 0,7570	1,385 (0,293-6,556)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,8220 0,8387	1,256 (0,172-9,166)
	T	Test tendència lineal	0,6867 0,8229	1,117 (0,652-1,915)
		Entre al-lels	0,7968 0,7968	1,236 (0,246-6,221)
<b>Seqüeles</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,2044 0,8416	2,809 (0,570-13,841)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1957 0,5238	3,870 (0,498-30,053)
	T	Test tendència lineal	0,4748 0,6756	1,555 (0,738-3,275)
		Entre al-lels	0,2034 0,5981	2,438 (0,618-9,621)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 27. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1624395 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,3518 0,5025	2,411 (0,378-15,364)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,2982 0,5773	1,611 (0,656-3,954)
	A	Test tendència lineal	0,3277 0,5461	1,661 (0,601-4,587)
		Entre al·lels	0,2082 0,6140	1,630 (0,761-3,491)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,0573 0,2865	1,982 (0,979-4,014)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,1292 0,6939	3,004 (0,726-12,439)
		Test tendència lineal	0,1105 0,5527	1,943 (0,859-4,395)
		Entre al·lels	0,0029 <b>0,0147</b>	<b>1,834 (1,230-2,736)</b>
<b>Meningitis</b>	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,4408 0,5559	1,856 (0,395-8,952)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,9290 0,9290	1,127 (0,082-15,470)
	A	Test tendència lineal	0,6889 0,7655	1,276 (0,387-4,203)
		Entre al·lels	0,6959 0,9100	1,266 (0,388-4,131)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,7848 0,7848	1,168 (0,383-3,561)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,2803 0,4005	2,198 (0,526-9,181)
	G	Test tendència lineal	0,4290 0,4509	1,376 (0,624-3,031)
		Entre al·lels	0,4536 0,4536	1,374 (0,598-3,156)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,2804 0,4126	2,467 (0,479-12,712)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,5542 0,6837	1,527 (0,375-6,212)
	G	Test tendència lineal	0,2907 0,6314	1,603 (0,668-3,850)
		Entre al·lels	0,1194 0,4942	2,030 (0,833-4,949)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,3428 0,9635	1,906 (0,503-7,225)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,7758 0,9765	1,371 (0,156-12,019)
	A	Test tendència lineal	0,6948 0,9871	1,261 (0,396-4,021)
		Entre al·lels	0,6979 0,9908	1,261 (0,392-4,058)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,6751 0,9432	1,546 (0,202-11,845)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,0514 0,2568	2,949 (0,994-8,750)
	A	Test tendència lineal	0,1970 0,6489	1,945 (0,708-5,344)
		Entre al·lels	0,1747 0,6832	1,991 (0,736-5,384)

<b>PrCR &gt;250 mg/l</b>	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,8665 0,9501	1,170 (0,187-7,323)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,1839 0,9194	2,098 (0,703-6,256)
	A	Test tendència lineal	0,3284 0,7631	1,504 (0,663-3,412)
		Entre al·lels	0,4094 0,8383	1,512 (0,566-4,041)
<b>Major temps febre</b>	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,0713 0,3314	-
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,0475 0,3199	-
	G	Test tendència lineal	0,0177 0,1771	-
		Entre al·lels	0,0210 0,2104	-
<b>UCIP</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,3491 0,5459	1,761 (0,539-5,754)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,2525 0,8215	3,535 (0,406-30,749)
	G	Test tendència lineal	0,2111 0,7433	1,859 (0,703-4,913)
		Entre al·lels	0,1762 0,6519	1,808 (0,766-4,268)
<b>VMI</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,5193 0,7850	1,755 (0,317-9,708)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,1820 0,7572	5,199 (0,462-58,511)
	G	Test tendència lineal	0,2054 0,5729	2,029 (0,679-6,068)
		Entre al·lels	0,3133 0,7883	2,077 (0,501-8,606)
<b>Necessitat d'inotrópics</b>	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,6390 0,8766	1,375 (0,363-5,205)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,0533 0,2396	4,937 (0,978-24,925)
	G	Test tendència lineal	0,4667 0,6668	1,346 (0,605-2,998)
		Entre al·lels	0,5111 0,7517	1,385 (0,524-3,663)
<b>Curació</b>	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,4684 0,8096	1,903 (0,334-10,826)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,5787 0,7422	1,337 (0,480-3,722)
	A	Test tendència lineal	0,4490 0,7484	1,389 (0,593-3,254)
		Entre al·lels	0,4435 0,8054	1,389 (0,600-3,218)
<b>Exitus</b>	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,1621 0,4114	3,012 (0,642-14,134)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,8387 0,8387	1,200 (0,208-6,921)
	A	Test tendència lineal	0,3906 0,7329	1,436 (0,629-3,280)
		Entre al·lels	0,4457 0,7968	1,524 (0,516-4,496)
<b>Seqüeles</b>	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,2600 0,8416	1,704 (0,674-4,311)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,5343 0,7634	1,668 (0,332-8,371)
	G	Test tendència lineal	0,3108 0,6084	1,502 (0,684-3,295)
		Entre al·lels	0,3019 0,5981	1,490 (0,699-3,179)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 28. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1370128 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4922 0,6153	1,919 (0,299-12,339)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,0508 0,4600	2,540 (0,997-6,471)
	T	Test tendència lineal	0,2372 0,5144	1,823 (0,674-4,932)
		Entre al·lels	0,1254 0,6140	1,763 (0,854-3,639)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1534 0,6939	2,242 (0,740-6,794)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,0378 0,2865	3,802 (1,078-13,405)
	C	Test tendència lineal	0,0867 0,5527	2,263 (0,889-5,762)
		Entre al·lels	0,0006 <b>0,0055</b>	<b>2,060 (1,367-3,105)</b>
<b>Meningitis</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5452 0,6058	1,819 (0,262-12,628)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,6512 0,9290	1,419 (0,311-6,464)
	T	Test tendència lineal	0,5307 0,7582	1,427 (0,469-4,342)
		Entre al·lels	0,5600 0,9100	1,390 (0,460-4,201)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1055 0,2360	3,088 (0,788-12,096)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,8350 0,8350	1,134 (0,348-3,699)
	C	Test tendència lineal	0,4486 0,4509	1,400 (0,586-3,344)
		Entre al·lels	0,4510 0,4536	1,376 (0,600-3,160)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,2860 0,6837	2,509 (0,463-13,597)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,6469 0,7766	1,383 (0,345-5,544)
	C	Test tendència lineal	0,3308 0,6314	1,549 (0,641-3,744)
		Entre al·lels	0,1376 0,4942	1,977 (0,804-4,861)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,8610 0,9635	1,212 (0,141-10,404)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,3528 0,9765	1,809 (0,518-6,314)
	T	Test tendència lineal	0,0882 0,8819	1,242 (0,403-3,830)
		Entre al·lels	0,7112 0,9908	1,230 (0,411-3,678)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6116 0,8863	1,678 (0,228-12,356)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,1584 0,5279	2,451 (0,705-8,516)
	T	Test tendència lineal	0,2596 0,6489	1,795 (0,649-4,961)
		Entre al·lels	0,2514 0,6832	1,769 (0,667-4,691)

PrCR >250 mg/l	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,7282 0,9239	1,353 (0,246-7,441)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,2870 0,9501	1,946 (0,571-6,629)
	T	Test tendència lineal	0,3409 0,7631	1,497 (0,653-3,433)
		Entre al-lels	0,4282 0,8383	1,478 (0,562-3,887)
Major temps febre	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,2787 0,4800	-
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,1280 0,3199	-
		Test tendència lineal	0,1119 0,2798	-
		Entre al-lels	0,1282 0,3204	-
UCIP	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,7244 0,8688	1,216 (0,410-3,613)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,3571 0,5459	2,131 (0,426-10,660)
	C	Test tendència lineal	0,4692 0,7112	1,367 (0,586-3,189)
		Entre al-lels	0,4166 0,9007	1,342 (0,660-2,725)
VMI	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,9583 0,9593	1,037 (0,254-4,234)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,6109 0,7850	1,509 (0,309-7,368)
	C	Test tendència lineal	0,7349 0,9130	1,159 (0,493-2,725)
		Entre al-lels	0,7662 0,7941	1,174 (0,407-3,389)
Necessitat d'inotròpics	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,9074 0,9867	1,079 (0,299-3,896)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,8359 0,8761	1,146 (0,316-4,158)
	T	Test tendència lineal	0,7911 0,8265	1,096 (0,557-2,154)
		Entre al-lels	0,8252 0,8252	1,106 (0,452-2,705)
Curació	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,5889 0,7422	1,571 (0,305-8,093)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,4453 0,8096	1,487 (0,537-4,121)
	T	Test tendència lineal	0,7599 0,7599	1,377 (0,603-3,141)
		Entre al-lels	0,4448 0,8054	1,369 (0,612-3,065)
Exitus	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,0289 0,2892	5,070 (1,182-21,753)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,2622 0,6555	2,404 (0,519-11,133)
	T	Test tendència lineal	0,0127 0,0500	3,165 (1,278-7,836)
		Entre al-lels	0,0388 0,1940	3,210 (1,602-9,703)
Seqüeles	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,2095 0,5238	1,855 (0,707-4,870)
	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,3513 0,8416	2,265 (0,406-12,631)
	C	Test tendència lineal	0,2293 0,6084	1,714 (0,712-4,126)
		Entre al-lels	0,1942 0,5981	1,684 (0,767-3,699)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 29. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1141168 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9588 0,9588	1,032 (0,310-3,441)
	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,3400 0,5025	1,842 (0,525-6,461)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,6268 0,8954	1,223 (0,543-2,757)
		Entre al·lels	0,6348 0,9069	1,220 (0,537-2,769)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,9095 0,9095	1,050 (0,452-2,439)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,4741 0,6939	1,678 (0,407-6,922)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,7011 0,7790	1,153 (0,558-2,383)
		Entre al·lels	0,7033 0,7932	1,156 (0,548-2,442)
<b>Meningitis</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4447 0,5559	1,611 (0,474-5,477)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,6532 0,9290	1,471 (0,273-7,911)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,4228 0,7582	1,412 (0,608-3,280)
		Entre al·lels	0,4902 0,9100	1,410 (0,531-3,744)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6058 0,7572	1,463 (0,345-6,207)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,3578 0,4472	2,057 (0,442-9,563)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,4509 0,4509	1,506 (0,519-4,368)
		Entre al·lels	0,3066 0,3832	1,525 (0,679-3,425)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9050 0,9050	1,088 (0,272-4,360)
	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,8840 0,8840	1,131 (0,216-5,920)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,9733 0,9733	1,013 (0,463-2,217)
		Entre al·lels	0,9308 0,9308	1,041 (0,424-2,556)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9581 0,9635	1,028 (0,368-2,872)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,5417 0,9765	1,459 (0,434-4,904)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,6389 0,9871	1,152 (0,637-2,085)
		Entre al·lels	0,7327 0,9908	1,158 (0,498-2,693)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,8863 0,8863	1,085 (0,355-3,320)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,0222 0,2221	3,977 (1,218-12,987)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,2341 0,6489	1,556 (0,751-3,222)
		Entre al·lels	0,3191 0,6832	1,583 (0,641-3,910)

PrCR >250 mg/l	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,6162 0,9239	1,382 (0,390-4,890)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,0429 0,4287	3,273 (1,039-10,311)
	G	Test tendència lineal	0,4981 0,7631	1,309 (0,601-2,853)
		Entre al-lels	0,5424 0,8383	1,324 (0,536-3,271)
Major temps febre	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,3933 0,4820	-
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,2880 0,4800	-
	G	Test tendència lineal	0,9394 0,9526	-
		Entre al-lels	0,9381 0,9492	-
UCIP	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,4367 0,5459	1,525 (0,527-4,413)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,1867 0,8215	2,181 (0,686-6,938)
	G	Test tendència lineal	0,2316 0,7433	1,535 (0,761-3,096)
		Entre al-lels	0,1956 0,6519	1,536 (0,802-2,944)
VMI	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,2180 0,7850	3,293 (0,494-21,939)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,2272 0,7572	3,473 (0,460-26,196)
	G	Test tendència lineal	0,0835 0,5729	2,879 (0,869-9,536)
		Entre al-lels	0,2463 0,7883	2,352 (0,554-9,982)
Necessitat d'inotròpics	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,4489 0,8766	1,750 (0,411-7,452)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,7411 0,8761	1,307 (0,267-6,392)
	G	Test tendència lineal	0,3190 0,6380	1,563 (0,650-3,759)
		Entre al-lels	0,5524 0,7517	1,362 (0,492-3,771)
Curació	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,6679 0,7422	1,358 (0,336-5,493)
	AA	Amb l'altre genotip	0,2218 0,7853	2,499 (0,575-10,857)
	A	Test tendència lineal	0,6741 0,7599	1,206 (0,503-2,892)
		Entre al-lels	0,7206 0,8067	1,211 (0,425-3,450)
Exitus	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,0515 0,1717	6,246 (0,988-39,479)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,5033 0,7570	1,775 (0,330-9,538)
	A	Test tendència lineal	0,0241 0,0602	3,397 (1,174-9,830)
		Entre al-lels	0,1356 0,3391	2,887 (0,717-11,618)
Seqüeles	AG+AA	Amb els altres dos genotips junts	0,8898 0,8898	1,095 (0,304-3,936)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,0575 0,5238	3,640 (0,960-13,805)
	G	Test tendència lineal	0,3435 0,6084	1,483 (0,656-3,354)
		Entre al-lels	0,4240 0,5981	1,488 (0,562-3,942)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%



**Taula 30. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs4251513 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1254 0,4727	2,358 (0,787-7,066)
	<i>CG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,5666 0,7082	1,344 (0,489-3,697)
	<b>G</b>	Test tendència lineal	0,2572 0,5144	1,465 (0,757-2,834)
		Entre al·lels	0,2605 0,6140	1,548 (0,723-3,313)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,2084 0,6158	2,653 (0,580-12,131)
	<i>CG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,9876 0,9876	1,008 (0,367-2,765)
	<b>C</b>	Test tendència lineal	0,5390 0,7790	1,283 (0,579-2,841)
		Entre al·lels	0,5419 0,7932	1,323 (0,538-3,253)
<b>Meningitis</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6281 0,9290	1,295 (0,455-3,682)
	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,6449 0,6449	1,457 (0,294-7,233)
	<b>C</b>	Test tendència lineal	0,5136 0,7582	1,263 (0,627-2,541)
		Entre al·lels	0,5715 0,9100	1,329 (0,497-3,554)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	1,7342 0,8158	1,201 (0,417-3,460)
	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1180 0,2360	2,835 (0,768-10,469)
	<b>C</b>	Test tendència lineal	0,3475 0,4509	1,489 (0,649-3,415)
		Entre al·lels	0,2143 0,3061	1,569 (0,771-3,192)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6153 0,6837	1,370 (0,401-4,684)
	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,6989 0,7766	1,384 (0,267-7,186)
	<b>C</b>	Test tendència lineal	0,5683 0,6314	1,229 (0,605-2,495)
		Entre al·lels	0,6426 0,7140	1,239 (0,501-3,065)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6189 0,9765	1,378 (0,390-4,869)
	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,8998 0,9635	1,098 (0,256-4,707)
	<b>C</b>	Test tendència lineal	0,6640 0,9871	1,182 (0,556-2,515)
		Entre al·lels	0,7089 0,9908	1,212 (0,442-3,325)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6486 0,9432	1,410 (0,322-6,170)
	<i>CG+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,0221 0,2213	3,898 (1,215-12,502)
	<b>C</b>	Test tendència lineal	0,2210 0,6489	1,759 (0,712-4,346)
		Entre al·lels	0,3017 0,6832	1,840 (0,579-5,850)

PrCR >250 mg/l	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,7607 0,9501	1,253 (0,293-5,363)
	CG+CC	Amb l'altre genotip	0,0742 0,7419	2,801 (0,904-8,680)
	C	Test tendència lineal	0,3475 0,7631	1,503 (0,642-3,521)
		Entre al·lels	0,4137 0,8383	1,577 (0,529-4,696)
Major temps febre	CG+CC	Amb l'altre genotip	0,4338 0,4820	-
	CG+GG	Amb l'altre genotip	0,4648 0,5165	-
	C	Test tendència lineal	0,9526 0,9526	-
	G	Entre al·lels	0,9492 0,9492	-
UCIP	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,5750 0,8215	1,313 (0,507-3,402)
	CG+CC	Amb l'altre genotip	0,7854 0,7964	1,189 (0,343-4,120)
	C	Test tendència lineal	0,6149 0,7712	1,192 (0,601-2,364)
		Entre al·lels	0,5707 0,9007	1,223 (0,610-2,454)
VMI	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,3832 0,7663	2,214 (0,371-13,206)
	CG+CC	Amb l'altre genotip	0,2793 0,7850	2,961 (0,414-21,170)
	C	Test tendència lineal	0,2018 0,5729	2,116 (0,670-6,686)
		Entre al·lels	0,3298 0,7883	2,191 (0,452-10,608)
Necessitat d'inotròpics	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,6355 0,8761	1,355 (0,386-4,753)
	CG+CC	Amb l'altre genotip	0,7013 0,8766	1,366 (0,278-6,720)
	C	Test tendència lineal	0,4177 0,6668	1,380 (0,633-3,008)
		Entre al·lels	0,5746 0,7517	1,375 (0,452-4,183)
Curació	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,0305 0,3055	4,429 (1,150-17,059)
	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,8516 0,8708	1,140 (0,289-4,503)
	G	Test tendència lineal	0,4240 0,7484	1,436 (0,592-3,484)
		Entre al·lels	0,4967 0,8054	1,479 (0,478-4,572)
Exitus	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,0675 0,3377	5,611 (0,883-35,652)
	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,5569 0,8387	1,482 (0,399-5,507)
	G	Test tendència lineal	0,4398 0,7329	1,467 (0,555-3,876)
		Entre al·lels	0,4990 0,7968	1,684 (0,372-7,622)
Seqüeles	CG+CC	Amb l'altre genotip	<0,0001 <b>0,0010</b>	<b>7,066 (2,645-18,872)</b>
	CG+GG	Amb l'altre genotip	0,7978 0,9298	1,198 (0,300-4,785)
	C	Test tendència lineal	0,3415 0,6084	1,565 (0,622-3,939)
		Entre al·lels	0,4028 0,5981	1,622 (0,522-5,038)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 31. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs1461567 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,8769 0,9588	1,143 (0,210-6,213)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,9961 0,9961	1,003 (0,366-2,748)
	T	Test tendència lineal	0,9703 0,9703	1,014 (0,484-2,126)
		Entre al·lels	0,9690 0,9690	1,017 (0,436-2,374)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4524 0,6158	2,008 (0,326-12,361)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,3524 0,6939	1,443 (0,666-3,126)
	T	Test tendència lineal	0,3130 0,7790	1,441 (0,709-2,932)
		Entre al·lels	0,3480 0,7932	1,404 (0,691-2,852)
<b>Meningitis</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9044 0,9290	1,060 (0,407-2,759)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,4050 0,5559	2,813 (0,247-32,105)
	C	Test tendència lineal	0,5300 0,7582	1,284 (0,588-2,805)
		Entre al·lels	0,6064 0,9100	1,280 (0,501-3,268)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>TT</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,7159 0,7848	1,651 (0,111-24,595)
	<i>CT+TT</i>	Amb l'altre genotip	0,0965 0,1609	3,433 (0,802-14,707)
	T	Test tendència lineal	0,1862 0,3103	2,517 (0,640-9,889)
		Entre al·lels	0,1571 0,2619	2,326 (0,722-7,493)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4294 0,6837	1,632 (0,484-5,504)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,1784 0,4126	4,165 (0,522-33,262)
	C	Test tendència lineal	0,1512 0,6314	1,828 (0,802-4,168)
		Entre al·lels	0,2159 0,5398	1,763 (0,718-4,327)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1426 0,9765	2,609 (0,724-9,401)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,3093 0,9635	3,795 (0,290-49,619)
	C	Test tendència lineal	0,0882 0,8819	2,373 (0,879-6,410)
		Entre al·lels	0,1762 0,9908	2,118 (0,714-6,285)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>CC</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9490 0,9593	1,044 (0,282-3,860)
	<i>CT+CC</i>	Amb l'altre genotip	0,6893 0,8863	1,672 (0,135-20,746)
	C	Test tendència lineal	0,8288 0,8975	1,122 (0,395-3,186)
		Entre al·lels	0,8482 0,8620	1,106 (0,395-3,094)

PrCR >250 mg/l	CT+CC	Amb l'altre genotip	0,9239 0,9239	1,127 (0,097-13,034)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,8771 0,9501	1,106 (0,310-3,945)
	T	Test tendència lineal	0,9314 0,9314	1,045 (0,387-2,818)
		Entre al-lels	0,9557 0,9557	1,030 (0,369-2,875)
Major temps febre	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,4041 0,5051	-
	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,2034 0,4069	-
	T	Test tendència lineal	0,2330 0,3883	-
		Entre al-lels	0,2615 0,4358	-
UCIP	CT+CC	Amb els altres dos genotips junts	0,0740 0,3701	5,226 (0,852-32,062)
	CT+TT	Amb els altres dos genotips junts	0,8688 0,8688	1,082 (0,426-2,746)
	C	Test tendència lineal	0,6169 0,7712	1,220 (0,560-2,660)
		Entre al-lels	0,6273 0,9007	1,192 (0,587-2,417)
VMI	CT+CC	Amb els altres dos genotips junts	0,7850 0,7850	1,491 (0,084-26,333)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,5297 0,8229	1,603 (0,368-6,983)
	T	Test tendència lineal	0,7568 0,9130	1,192 (0,392-3,619)
		Entre al-lels	0,7941 0,7941	1,174 (0,351-3,924)
Necessitat d'inotrópics	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,9867 0,9867	1,019 (0,116-8,943)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,3462 0,5769	1,695 (0,565-5,080)
	T	Test tendència lineal	0,5936 0,7420	1,265 (0,533-2,999)
		Entre al-lels	0,6013 0,7517	1,256 (0,534-2,954)
Curació	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,4857 0,8096	1,404 (0,541-3,642)
	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,6066 0,7422	1,773 (0,201-15,672)
	C	Test tendència lineal	0,7599 0,7599	1,126 (0,526-2,413)
		Entre al-lels	0,8285 0,8285	1,102 (0,456-2,665)
Exitus	CC	Amb els altres dos genotips junts	0,0185 0,0927	7,070 (1,388-36,014)
	TT	Amb els altres dos genotips junts	0,6151 0,7570	1,829 (0,174-19,258)
	C	Test tendència lineal	0,0150 0,0500	5,741 (1,404-23,471)
		Entre al-lels	0,1160 0,3391	4,780 (0,679-33,631)
Seqüeles	CT+CC	Amb els altres dos genotips junts	0,7575 0,8416	1,368 (0,187-10,006)
	CT+TT	Amb l'altre genotip	0,2054 0,5238	2,090 (0,668-6,543)
	T	Test tendència lineal	0,3650 0,6084	1,519 (0,615-3,755)
		Entre al-lels	0,4358 0,5981	1,430 (0,581-3,519)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 32. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs6853 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,3820 0,5773	3,621 (0,202-64,797)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,8437 0,9374	1,207 (0,186-7,830)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,8601 0,9557	1,208 (0,242-6,031)
		Entre al·lels	0,8690 0,9656	1,153 (0,213-6,231)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,6617 0,8272	1,518 (0,234-9,862)
	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,5542 0,6158	2,146 (0,171-26,934)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,6689 0,7790	1,397 (0,302-6,472)
		Entre al·lels	0,7162 0,7932	1,357 (0,261-7,053)
<b>Meningitis</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,3212 0,5559	6,147 (0,170-222,222)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,4707 0,9290	1,941 (0,320-11,764)
	<i>G</i>	Test tendència lineal	0,4322 0,7582	1,860 (0,395-8,757)
		Entre al·lels	0,4802 0,9100	1,779 (0,359-8,806)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,0748 0,1609	3,568 (0,880-14,458)
	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,2262 0,3593	9,896 (0,242-405,200)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,0644 0,1287	3,338 (0,931-11,972)
		Entre al·lels	0,0406 0,1353	3,841 (1,059-13,929)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,4823 0,6837	1,670 (0,400-6,977)
	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,2484 0,4126	8,790 (0,219-352,442)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,1697 0,6314	2,034 (0,738-5,602)
		Entre al·lels	0,1482 0,4942	2,731 (0,700-10,659)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,8184 0,9765	1,201 (0,252-5,731)
	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,9635 0,9635	1,084 (0,039-30,446)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,8892 0,9871	1,097 (0,297-4,060)
		Entre al·lels	0,9380 0,9908	1,068 (0,202-5,649)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,1418 0,5279	2,536 (0,733-8,774)
	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,7214 0,8863	2,345 (0,022-254,201)
	<i>A</i>	Test tendència lineal	0,4470 0,7821	1,603 (0,475-5,408)
		Entre al·lels	0,4099 0,6832	1,792 (0,447-7,181)

PrCR >250 mg/l	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,1914 0,9501	2,437 (0,640-9,273)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,6842 0,9239	2,692 (0,023-317,537)
	A	Test tendència lineal	0,4831 0,7631	1,570 (0,445-5,540)
		Entre al·lels	0,4560 0,8383	1,724 (0,412-7,226)
Major temps febre	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,5201 0,5201	-
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,9449 0,9449	-
	G	Test tendència lineal	0,8066 0,9526	-
		Entre al·lels	0,7957 0,9492	-
UCIP	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,7964 0,7964	1,449 (0,086-24,307)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,8336 0,8688	1,172 (0,266-5,159)
	G	Test tendència lineal	0,8902 0,8902	1,108 (0,258-4,770)
		Entre al·lels	0,9007 0,9007	1,082 (0,313-3,748)
VMI	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,6875 0,8593	1,383 (0,285-6,705)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,4176 0,7850	7,416 (0,058-942,404)
	A	Test tendència lineal	0,7160 0,9130	1,302 (0,315-5,386)
		Entre al·lels	0,7863 0,7941	1,300 (0,195-8,655)
Necessitat d'inotròpics	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,0358 0,2212	58,004 (1,308->999,999)
	AG+GG	Amb l'altre genotip		
	G	Test tendència lineal	0,8265 0,8265	1,157 (0,313-4,277)
		Entre al·lels	0,8145 0,8252	1,178 (0,300-4,625)
Curació	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,8708 0,8708	1,144 (0,227-5,761)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,7429 0,7429	2,038 (0,029-143,210)
	A	Test tendència lineal	0,7509 0,7599	1,241 (0,327-4,707)
		Entre al·lels	0,7260 0,8067	1,325 (0,275-6,378)
Exitus	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,1646 0,4114	22,794 (0,277->999,999)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,0005 <b>0,0054</b>	<b>16,086 (3,336-77,574)</b>
	G	Test tendència lineal	0,0004 <b>0,0037</b>	<b>10,712 (2,903-39,531)</b>
		Entre al·lels	0,0006 <b>0,0064</b>	<b>8,388 (2,472-28,455)</b>
Seqüeles	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,5093 0,7634	1,984 (0,259-15,169)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,7456 0,8416	1,862 (0,044-79,506)
	A	Test tendència lineal	0,6623 0,8359	1,430 (0,287-7,113)
		Entre al·lels	0,6455 0,7172	1,524 (0,253-9,166)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%

**Taula 33. Anàlisi de l'associació d'al·lels i genotips de rs7744 amb dades evolutives de la MPIG.**

(En cursiva, els valors crus de  $p < 0,05$ ; en negreta, els valors de  $p < 0,05$  ajustats pel mètode FDR i les OR significatives).

	<b>Al·lel Genotip</b>	<b>Tipus de comparació</b>	<b>p-cru p-FDR</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Pneumònia</b>	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,4041 0,5773	2,300 (0,325-16,273)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,3442 0,5025	1,684 (0,572-4,954)
	<b>G</b>	Test tendència lineal	0,8601 0,9557	1,102 (0,374-3,252)
		Entre al·lels	0,8161 0,9656	1,116 (0,443-2,807)
<b>Pleuro- pneumònia</b>	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,3034 0,6158	2,738 (0,402-18,640)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,7486 0,8318	1,232 (0,344-4,419)
	<b>A</b>	Test tendència lineal	0,8514 0,8514	1,094 (0,428-2,795)
		Entre al·lels	0,7932 0,7932	1,170 (0,362-3,778)
<b>Meningitis</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,3495 0,9290	1,058 (0,322-3,476)
	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,2887 0,5559	3,899 (0,316-48,151)
	<b>A</b>	Test tendència lineal	0,9263 0,9263	2,054 (0,455-9,282)
		Entre al·lels	0,8986 0,9100	1,108 (0,229-5,370)
<b>Leucocitosi &gt;15000/mmc</b>	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,2515 0,3593	4,730 (0,332-67,731)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,0890 0,1609	6,234 (0,757-51,362)
	<b>G</b>	Test tendència lineal	0,0468 0,1173	4,713 (1,022-21,726)
		Entre al·lels	0,0791 0,1581	6,726 (0,802-56,442)
<b>Leucopènia &lt;5000/mmc</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,5365 0,6837	1,620 (0,351-7,473)
	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,2309 0,4126	6,553 (0,303-141,935)
	<b>A</b>	Test tendència lineal	0,3637 0,6314	1,652 (0,559-4,875)
		Entre al·lels	0,3147 0,6294	2,241 (0,465-10,809)
<b>PrCR &gt;150 mg/l</b>	<i>AA</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9765 0,9765	1,026 (0,184-5,709)
	<i>GG</i>	Amb els altres dos genotips junts	0,9620 0,9635	1,084 (0,039-30,446)
	<b>G</b>	Test tendència lineal	0,9871 0,9871	1,011 (0,262-3,907)
		Entre al·lels	0,9908 0,9908	1,010 (0,173-5,919)
<b>PrCR &gt;200 mg/l</b>	<i>AG+AA</i>	Amb l'altre genotip	0,7548 0,8863	1,830 (0,041-81,084)
	<i>AG+GG</i>	Amb l'altre genotip	0,5301 0,9432	1,828 (0,278-12,001)
	<b>G</b>	Test tendència lineal	0,7342 0,8975	1,272 (0,317-5,108)
		Entre al·lels	0,7670 0,8620	1,317 (0,213-8,140)

PrCR >250 mg/l	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,8961 0,9239	1,290 (0,028-59,127)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,7101 0,9501	1,391 (0,244-7,943)
	G	Test tendència lineal	0,8407 0,9314	1,149 (0,297-4,442)
		Entre al·lels	0,8848 0,9557	1,139 (0,195-6,650)
Major temps febre	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,2613 0,4322	-
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,3524 0,5034	-
	G	Test tendència lineal	0,7604 0,9526	-
		Entre al·lels	0,7342 0,9492	-
UCIP	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,4712 0,8215	1,734 (0,388-7,754)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,3557 0,5459	2,780 (0,318-24,331)
	A	Test tendència lineal	0,8174 0,8902	1,151 (0,348-3,806)
		Entre al·lels	0,7858 0,9007	1,214 (0,300-4,914)
VMI	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,2174 0,7572	3,547 (0,474-26,520)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,6737 0,7850	2,149 (0,061-75,636)
	A	Test tendència lineal	0,2291 0,5729	2,615 (0,546-12,524)
		Entre al·lels	0,3942 0,7883	3,388 (0,205-56,091)
Necessitat d'inotròpics	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,1198 0,2396	3,643 (0,715-18,577)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,5267 0,8766	2,489 (0,148-41,892)
	A	Test tendència lineal	0,2153 0,5383	2,197 (0,633-7,635)
		Entre al·lels	0,2080 0,5201	3,431 (0,503-23,381)
Curació	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,5499 0,7422	2,867 (0,091-90,581)
	AG+GG	Amb l'altre genotip	0,7531 0,8708	1,278 (0,277-5,897)
	G	Test tendència lineal	0,5655 0,7599	1,419 (0,430-4,677)
		Entre al·lels	0,5638 0,8054	1,595 (0,327-7,787)
Exitus	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,6662 0,8387	1,455 (0,265-8,007)
	GG	Amb els altres dos genotips junts	0,5681 0,7570	2,541 (0,103-62,486)
	A	Test tendència lineal	0,8408 0,8408	1,125 (0,357-3,544)
		Entre al·lels	0,7531 0,7968	1,410 (0,166-11,973)
Seqüeles	AA	Amb els altres dos genotips junts	0,9596 0,9596	1,037 (0,250-4,305)
	AG+AA	Amb l'altre genotip	0,6061 0,8416	2,197 (0,110-43,799)
	A	Test tendència lineal	0,7518 0,7518	1,197 (0,393-3,643)
		Entre al·lels	0,7199 0,7199	1,298 (0,313-5,387)

**Acrònims:**

**p-cru:** valor de p sense ajustar; **p-FDR:** valor de p ajustat pel mètode *false discovery rate* (FDR); **OR:** *odds-ratio*; **IC95%:** interval de confiança del 95%





## **ANNEX 7: Publicacions i comunicacions derivades de la Tesi**

1. Publicació a la revista *Pediatric Infectious Diseases Journal*, any 2015, volum 34, pàgines 1008-1013 (primer signant):

## Association of Polymorphisms in IRAK1, IRAK4 and MyD88, and Severe Invasive Pneumococcal Disease

Jaume Carrasco-Colom, MD,\* Iolanda Jordan, MD, PhD,† Laia Alsina, MD, PhD,‡

Juan-José García-García, MD, PhD,\* Francisco José Cambra-Lasaosa, MD, PhD,†

María Anunciación Martín-Mateos, MD, PhD,‡ Manel Juan, MD, PhD,§ and Carmen Muñoz-Almagro, MD, PhD¶

**Background:** Severe invasive pneumococcal disease (SIPD) has high morbidity and mortality, conditioned by pneumococcus and host factors, such as Toll-like receptors and their Toll-IL1R common signaling pathway. The objectives of this study are (1) to correlate single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved in some Toll-IL1R signaling pathway proteins (IRAK1, IRAK4, IRAKM and MyD88) with SIPD by comparing patients versus healthy controls. (2) To determine whether these SNPs influence SIPD outcome.

**Methods:** Case-control prospective observational study: 60 pediatric patients with IPD and systemic inflammatory response syndrome, and 120 healthy volunteers. Well-known immunodeficiencies were excluded. Independent variables: SNPs genotypes and alleles. Other variables: demographic, previous infections, and clinical, analytical and microbiological evolution data.

**Results:** We have detected significant disequilibrium of SNPs frequencies between SIPD patients and controls in rs1059701-CC (IRAK1;  $P = 0.0067$ ), rs4251513-CC (IRAK4;  $P < 0.0001$ ), rs1461567-T (IRAK4;  $P = 0.0158$ ) and rs6853-AA (MyD88;  $P < 0.0001$ ). SIPD patients showed significant association between: leukocytosis  $> 15,000/\text{mmc}$  and rs1059702-nonTT (IRAK1;  $P = 0.0460$ ), pleuropneumonia and rs1624395-G (IRAKM;  $P = 0.0147$ ), and rs1370128-C (IRAKM;  $P = 0.0055$ ), sequelae, and rs4251513-nonGG (IRAK4;  $P = 0.0055$ ), death and rs6853-nonAA ( $P = 0.0054$ ) and rs6853-G ( $P = 0.0065$ ; MyD88).

**Conclusions:** This is the first study to show an association between SNPs in IRAK1, IRAK4 and MyD88, and the presence of SIPD. Our data showed that some SNPs may lead to a higher risk of developing SIPD while other are related with the outcome in SIPD patients. Following PIRO score (pre-disposition, insult, response, organ dysfunction), identifying SNPs predisposing to infectious diseases, such as SIPD might help stratify patients with severe infectious diseases and design specific treatments.

**Key Words:** invasive pneumococcal disease, systemic inflammatory response, Toll-like receptors, TIR pathway, polymorphisms, genetic association study

(*Pediatr Infect Dis J* 2015;34:1008–1013)

Accepted for publication January 22, 2015.

From the \*Pediatrics Department, †Pediatric Intensive Care Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona; ‡Pediatric Allergy and Clinical Immunology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Sant Joan de Déu - Clínic Immunology Functional Unit; §Immunology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Sant Joan de Déu - Clínic Immunology Functional Unit; and ¶Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

This work was supported by the Sant Joan de Déu Research Foundation through AFR00018 grant and in a minor part, but significant, by the Instituto de Salud Carlos III-Fondos Feder through PI10/01404 grant.

J. Carrasco-Colom and I. Jordan contributed equally to this study. M. Juan and C. Muñoz-Almagro contributed by equally co-directing this study.

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Iolanda Jordan, MD, PhD, Pediatric Intensive Care Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 08950 Espilugues de Llobregat, Barcelona, Spain. E-mail: ijordan@hsjdbcn.org.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0891-3668/15/3409-1008

DOI: 10.1097/INF.0000000000000779

Invasive pneumococcal disease (IPD), caused by *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), is a frequently occurring disease worldwide.<sup>1</sup> IPD can present as occult bacteremia or more serious manifestations, which have high morbidity and mortality. IPD rates are especially high in infants and children less than 2 years old and adults older than 65 years of age.<sup>2</sup>

The imbalance between host factors and virulence of the pathogen is partly responsible for the development of IPD. The main virulence factor of pneumococcus is the polysaccharide capsule, with 94 serotypes, with differences in pathogenicity.<sup>3</sup> Although IPD has been extensively studied from the microbiological point of view, to date little is known about why the disease is more severe in some immunocompetent children than in others with similar characteristics. Innate immunity system (IIS) variations might be a determinant factor.

IIS relies on recognition receptors (PRRs from pattern recognition receptors), which recognize pathogen-associated molecular patterns.<sup>4,5</sup> A key group of these PRRs is the Toll-like receptors (TLRs). Acting together, TLRs are able to recognize virtually all pathogens, and they play a key role in initiating innate immunity response.<sup>5</sup>

Pneumococcus is recognized by TLR 1, 2, 4, 6 and 9.<sup>6</sup> TLRs recognizing pneumococcus are redundant, but their signaling pathways merge in the unique Toll-IL1R (TIR) signaling pathway (a name used based on the similarities between TLR and IL-1R signaling pathways, also called the TIR pathway). Therefore, the TIR pathway is critical for establishing TLR-mediated inflammatory response in defense against pneumococcus.<sup>7,8</sup>

Classic primary immunodeficiencies cause susceptibility to a wide range of microorganisms (one gene, multiple infections). Recently, new primary immunodeficiencies have been described with more selected susceptibility to microorganisms (one gene, few infections). Among these immunodeficiencies, mutations in TIR pathway have been found, such as IRAK4 and MyD88 complete deficiencies. These immunodeficiencies lead to increased susceptibility to a narrow range of infections, with IPD being a major manifestation.<sup>7,9–11</sup>

Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR have been associated with susceptibility to IPD.<sup>12</sup> Also, SNPs in TIR pathway (in IRAK and NFκB complexes) have been described, leading to increased susceptibility or protection from infectious diseases, including IPD,<sup>13–15</sup> along with misbalances in immune responses.<sup>16,17</sup> The majority of these studies have been performed on adult populations.

The discovery of SNPs in TIR pathway has opened a new research line in genetic susceptibility to infectious diseases. In the concrete case of IPD, discovering other SNPs in TIR pathway would help increase our understanding on the different outcomes of IPD observed based on the variability of immune responses. It could also help in stratifying individual risk of suffering IPD to define concrete strategies in patient management.

In this study, we have described SNPs in TIR pathway proteins (IRAK1, IRAK4, IRAKM and MyD88) in pediatric patients with severe IPD (SIPD) and in a cohort of healthy controls. With

these data, the aim of our study was to correlate these SNPs with presence of SIPD and to determine whether these SNPs have an influence on SIPD outcome.

## MATERIALS AND METHODS

This was a case-control prospective observational study. The study was conducted at Sant Joan de Déu Hospital, during the year 2010. This is a tertiary-care children's hospital (345 beds, 18 PICU beds). Located in Catalonia-Spain (population of ~7 million, 1.2 million of children), it captured around 17% of all pediatric hospital admissions of her referral population during the study period (around 200,000 children per year).

Inclusion criteria for cases were children under 10 years of age diagnosed of SIPD in our hospital during the year 2010. Exclusion criteria were previous diagnosis of primary or secondary immunodeficiency and nonacceptance of informed consent. Controls were patients with a routine analytical determination in outpatient laboratory with no previous immunodeficiency or IPD, nor concomitant infectious pathology.

SIPD was defined by isolation of pneumococcus or detection of DNA of the pneumolysin gene and an additional capsular gene of pneumococcus with real-time PCR in any normally sterile site, and presence of systemic inflammatory response syndrome (SIRS).<sup>18</sup>

Criteria for SNPs selection were: (1) proteins in TIR pathway (which are critical points in signaling cascade pathway); (2) high frequency in general population (>5%); (3) clinical relevance in infectious or inflammatory diseases described in the literature and (4) location of SNPs in the corresponding gene (SNPs in exons or in promoter or regulatory regions). Finally, selected SNPs were: (1) IRAK1: rs1059701, rs1059702, rs1059703 8,15; (2) IRAKM: rs1624395, rs1370128 8,16; (3) IRAK4: rs1141168, rs4251513, rs1461567 7-9,14,17 and (4) MyD88: rs7744, rs6853 10. For each SNP, both genotype and allele frequencies were evaluated.

The sample size of the study (60 cases and 120 controls) was calculated statistically, based on IPD incidence in our hospital (109.9/100,000 children less than 5 years old in year 2009)<sup>19</sup> and SNPs incidence in the general population (confidence level was set at 95% (2-tailed), precision of confidence interval (CI) at ±3%, and rate of subjects not meeting inclusion criteria at 10%).

## Variables

SNPs genotype or allele presence was considered as an independent variable. Other collected data were demographics, past medical history, conjugated pneumococcal vaccination status, clinical IPD diagnosis (pleuropneumonia, pneumonia, meningitis, sepsis, arthritis), pneumococcal serotype, and laboratory data [complete blood count, C-reactive protein (CRP) value and primary immunodeficiencies screening: detection of presence of Howell-Jolly bodies in blood smear; T, B and NK lymphoid populations; IgG, IgA and IgM immunoglobulin levels; complement C3, C4 and CH50; blood group; isohemagglutinins, and response to proteic vaccine antigens]. Severity of IPD was determined based on clinical features [time until resolution of fever, need for PICU admission, need for mechanical ventilation and inotropic drugs, Pediatric Risk of Mortality Score III (PRISM-III) punctuation<sup>20</sup>] and laboratory severity markers (leukocytosis > 15,000/mm<sup>3</sup>, leukopenia < 5000/mm<sup>3</sup> and CRP > 200mg/L). SIPD final outcome was recorded as complete recovery, presence of sequelae or death.

Pneumococcal strains isolated by culture were identified with standard microbiological methods and were serotyped using the Quellung reaction or dot blot by the National Centre for Microbiology, Majadahonda-Madrid. Detection of the pneumolysin gene of pneumococcus was performed with real-time PCR according to a previously reported method.<sup>21</sup> Detection of serotypes in patients

with negative cultures was made in our laboratory with multiplex real-time PCR, which detects the conserved wzc capsule gene and other genes selected to differentiate the 24 serotypes most frequently implicated in IPD (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23A and 23F).<sup>22</sup> For SNPs determination, iPLEX<sup>®</sup> Gold method from the genotyping platform MassARRAY<sup>®</sup> was used (Sequenom Inc., San Diego, CA). SNPs genotyping services were provided by the Spanish "Centro Nacional de Genotipado" (CEGEN-ISCHII; www.cegen.org).

This study was performed according to the Helsinki declaration and was approved by Sant Joan de Déu Ethics Committee. Parents or guardians of patients and controls were always requested to provide the compulsory written informed consent before inclusion in the study.

## Statistics

Three statistical software programs were used: Ene2 to determine the number of cases (n) required, and SAS<sup>®</sup>9.2 and genetic statistical analysis platform SNPator<sup>23</sup> for analysis of genetic data.

Frequency tables were constructed to describe genotype and allele proportions in terms of different SNPs. Linear relation between frequency of variables and genotype was analyzed. Association between variables and homozygote and allele frequencies was also analyzed. Wald test with a logistic regression model was used. To avoid confusion, variables, sex, age and pneumococcus serotype were included.

Regarding quantitative variables, a linear trend of means relation with genotype and allele frequencies was also analyzed via variance (ANOVA).

Two *P* values were calculated: *P* value (crude-*p*) and adjusted *P* value by false discovery rate control (*P*-FDR), which is a statistical method used in multiple hypothesis testing to correct for multiple comparisons. False discovery rate procedures are designed to control the expected proportion of incorrectly rejected null hypotheses.<sup>24</sup> *P* value <0.05 was considered as significant and *P* < 0.10 was considered as marginally significant.

## RESULTS

### Demographic and Clinical Features

Sixty SIPD consecutive cases and 120 controls were recruited in this study; all cases and controls were genotyped for 10 selected SNPs. Cases and controls were comparable in terms of sex and ethnic group (see Table 1 for demographic data). SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium (this means that allele frequencies observed were similar to those expected in a population with stable genetic variation and lack of selection) Also, as expected, allele frequencies were similar to those deduced from HapMap Caucasian data (Table 2). Control subjects did not have consanguinity or past medical history of severe infectious diseases or immunological diseases or any previous episode of IPD. Pneumococcus serotype was analyzed in all cases: 39 (65%) were serotypes included in both 13-valent pneumococcal vaccine (PCV13) and 7-valent pneumococcal vaccine (PCV7), 3 (5%) were serotypes included only in PCV7, and 21 (35%) were other serotypes not included in current commercialized conjugated vaccines. Vaccination coverage with PCV7 in cases was: complete immunization (at least 3 doses) in 38.3%, and at least 1 dose in 50%. None of the patients with PCV7 serotypes had been completely immunized with PCV7. All cases met SIRS criteria: 57 (95%) were sepsis, 2 (1.7%) had a septic shock and 1 (1.3%) a multiorgan failure. Clinical presentation of cases is represented in Figure 1. Mean leukocyte value of cases was 21,014/mm<sup>3</sup> (standard deviation: 8995), and mean CRP value of cases was 240.9mg/L (standard deviation: 113.2). Twenty-five patients (41.7%) were admitted to PICU, 10 required mechanical ventilation (16.6%), and 7 required inotropic drugs (11.6%).

**TABLE 1.** Demographic Data of Cases and Controls

Variable	Cases* (n = 60)	Controls (n = 120)	P Value
Male sex % (n) (95% CI)	58.3 (35) (44.9–70.7)	57.5 (69) (47.7–65.9)	0.96
Caucasian origin % (n) (95% CI)	91.67 (55) (81.6–97.2)	98.33 (118) (94.1–99.8)	1
Median age years (range, IQR)	3.1 (21 days–9 years)	9.8 (1 month–41 years, 12 years)	

\*Fifty six cases without past severe infectious diseases (PSID) and 4 cases with PSID: 2 cases had pneumonia, 1 girl had osteomyelitis at 21 days of life and another girl had cellulitis at 20 days of life.

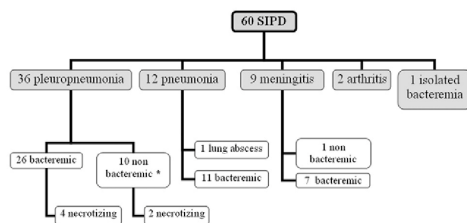
**TABLE 2.** Allele Frequencies and Allele Association of Toll-IL1R Pathway SNPs with Severe Invasive Pneumococcal Disease

SNPs	Allele	HWE (P Value)	HapMap CEU	Cases (Frequencies)	Controls (Frequencies)	P-FDR	OR (95% CI)
IRAK1	rs1059701 C	0.8199	n.a.	0.2530	0.2171	0.4528	1.229 (0.856–1.765)
	T		n.a.	0.7470	0.7829		
	rs1059702 C	0.1070	0.796	0.8118	0.8686		
	T		0.204	0.1882	0.1314	0.4528	1.538 (0.714–3.312)
rs1059703	C	0.4362	0.225	0.1728	0.1667	0.6894	1.147 (0.667–1.972)
	T		0.775	0.8272	0.8333		
IRAKM	rs1624395 A	0.5771	0.434	0.4083	0.4375		
	G		0.566	0.5917	0.5625	0.6957	1.126 (0.621–2.044)
	rs1370128 C	0.4362	0.558	0.5583	0.5167	0.6109	1.182 (0.736–1.901)
T		0.442	0.4417	0.4833			
IRAK4	rs1141168 A	0.2177	0.464	0.4667	0.5708		
	G		0.536	0.5333	0.4292	0.0709	1.522 (1.046–2.216)
	rs4251513 C	0.9209	0.500	0.6000	0.4875	<0.0001	<b>1.468 (1.404–1.535)</b>
	G		0.500	0.4000	0.5125		
rs1461567	C	0.8193	0.699	0.6833	0.7708		
	T		0.301	0.3167	0.2292	<b>0.0158</b>	<b>1.500 (1.132–1.987)</b>
MyD88	rs6853 A	0.8296	0.885	0.9000	0.8193	<0.0001	<b>1.935 (1.462–2.563)</b>
	G		0.115	0.1000	0.1807		
	rs7744 A	0.8199	0.854	0.9000	0.8739	0.6109	1.271 (0.664–2.431)
G		0.146	0.1000	0.1261			

HapMap CEU = allele frequencies in sample of Utah residents of northern and western European ancestry from the CEPH collection. HWE = Hardy Weinberg equilibrium (P value >0.05 means no significant differences between observed and expected frequencies, and therefore presence of HWE).

n.a. indicates data not available; P-FDR, P value adjusted by false discovery rate method. Bolded text is statistically significant.

All patients but 1 who returned to his country were followed up, and none presented recurrent IPD. There were sequelae in 33 cases (55%) and 2 deaths due to SIPD. The majority of sequelae were pachypleuritis (28 cases, 87.5% of sequelae) following pleuropneumonia, with segmentectomy required in 4 cases. The rest were neurological sequelae following meningitis: 3 cases of isolated hypoacusia and 2 cases of hydrocephalus with seizures, hypoacusia and visual impairment. Primary immunodeficiencies screening was performed in all cases by our clinical immunologist, with normal results.

**FIGURE 1.** Forms of SIPD (n). \*Pneumococcus identified in pleural effusion.**SNPs Results**

The presence of SNPs in TIR common signaling pathway in SIPD patients, as well as comparison of genotype and allele frequencies between cases and controls is detailed in Tables 2 and 3.

Associations between the presence of SIPD and some genotypes or alleles were found: SIPD presence was associated with CC genotype from rs1059701 [ $P = 0.0067$ , odds ratio (OR) = 1.430 (95% CI: 1.140–1.795)], CC genotype, and C allele from rs4251513 [ $P < 0.00001$ , OR = 2.183 (95% CI: 1.578–3.019)] and  $P < 0.0001$ , OR = 1.468 (95% CI: 1.404–1.535)], T allele from rs1461567 [ $P = 0.0158$ , OR = 1.500 (95% CI: 1.132–1.987)], and AA genotype and A allele from rs6853 [ $P < 0.0001$ , OR = 2.125 (95% CI: 1.787–2.526)] and  $P < 0.0001$ , OR = 1.935 (95% CI: 1.462–2.563)].

Genotype and allele frequencies of cases were compared regarding evolution features. It was found that G allele from rs1624395 and C allele from rs1370128 were associated with pleuropneumonia [ $P = 0.0147$ , OR = 1.834 (95% CI: 1.230–2.736)] and  $P = 0.0055$ , OR = 2.060 (95% CI: 1.367–3.105)], non-TT genotypes from rs1059702 were associated with leukocytosis [ $P = 0.0460$ , OR = 7.500 (95% CI: 1.862–30.214)], non-GG genotypes from rs4251513 were associated with presence of any kind of sequelae [ $P = 0.0010$ , OR = 7.066 (95% CI: 2.645–18.872)], non-AA genotypes and G allele

**TABLE 3.** Genotype Frequencies and Genotype Associations of Toll-IL1R Pathway SNPs with Severe Invasive Pneumococcal Disease

SNP	Genotype	Cases (Frequencies)	Controls (Frequencies)	Genotype Comparison			
				AA vs. AB + BB P-FDR, OR (95% CI)	BB vs. AA + AB P-FDR, OR (95% CI)		
IRAK1	rs1059701	CC	0.1694	<b>0.0067, 1.430 (1.140–1.795)</b>	0.9310, 1.141 (0.729–1.786)		
		CT	0.1356				
		TT	0.6949				
	rs1059702	CC	0.7500				
		CT	0.1500				
		TT	0.1000				
rs1059703	CC	0.0702	0.5939, 1.433 (0.602–3.410)	0.9310, 1.585 (0.406–6.190)			
	CT	0.1754	0.5970, 1.210 (0.693–2.113)	0.9751, 1.082 (0.563–2.081)			
	TT	0.7544					
IRAKM	rs1624395	AA	0.1500	0.5970, 1.449 (0.446–4.701)	0.9764, 1.008 (0.585–1.737)		
		AG	0.5167				
		GG	0.3333				
	rs1370128	CC	0.2833			0.9619, 1.011 (0.650–1.571)	0.7762, 1.623 (0.668–3.941)
		CT	0.5500				
		TT	0.1667				
IRAK4	rs1141168	AA	0.2167	0.5474, 1.292 (0.783–2.133)	0.7119, 2.827 (0.914–8.739)		
		AG	0.5000				
		GG	0.2833				
	rs4251513	CC	0.3833			<b>&lt;0.0001, 2.183 (1.578–3.019)</b>	0.7762, 1.197 (0.922–1.555)
		CG	0.4333				
		GG	0.1833				
rs1461567	CC	0.4333	0.5917	0.1484, 1.753 (0.978–3.144)	0.7762, 1.412 (0.725–2.752)		
	CT	0.5000	0.3583				
	TT	0.0667	0.0500				
MyD88	rs6853	AA	0.8167			<b>&lt;0.0001, 2.125 (1.787–2.526)</b>	0.9310, 1.534 (0.239–9.829)
		AG	0.1667				
		GG	0.0167				
rs7744	AA	0.8333	0.7815	0.5474, 1.362 (0.733–2.530)			
	AG	0.1333	0.1849				
	GG	0.0333	0.0336		0.9751, 1.091 (0.319–3.318)		

CI, confidence interval; P-FDR, *P* value adjusted by false discovery rate method; OR, odds ratio. Bolded text is statistically significant.

from rs6853 were associated with death [ $P = 0.0054$ , OR = 16.086 (95% CI: 3.336–77.574) and  $P = 0.0064$ , OR = 8.388 (95% CI: 2.472–28.455)], and there was a trend toward association ( $P < 0.10$ ) of death with T allele from rs1370128, A allele from rs1141168, and CC genotype and C allele from rs1461567 (Figs. 2 and 3). No association was found between any SNP genotype or allele and pneumococcus serotypes. No association was found between any SNP genotype or allele and the rest of the evolution features studied.

### DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study to show association of SNPs in IRAK1, IRAK4 and MyD88 and presence of SIPD. Indeed, previous studies linked IPD with SNPs of concrete TLRs (TLR 2 and 4).<sup>12</sup> Also, other authors found a relationship between IPD and SNPs in TIR common pathway,<sup>13</sup> but none of them studied IRAK and MyD88 genes. We believe that studying a common signaling pathway, and IRAK and MyD88 in particular, is of the utmost interest, because of its novelty and also because primary immunodeficiencies abolishing the function of these molecules have been described as a cause of recurrent IPD.<sup>7,9–11</sup> Moreover, this pathway is unique, while TLRs recognizing pneumococcus are redundant.<sup>6</sup>

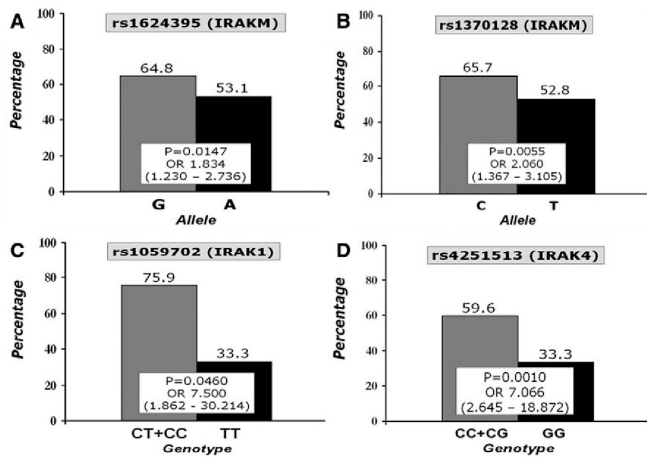
Our data showed that some SNPs are related to a greater risk of developing SIPD: rs1059701 (CC genotype) in IRAK1,

rs4251513 (C allele) and rs1461567 (T allele) in IRAK4 and rs6853 (A allele) in MyD88.

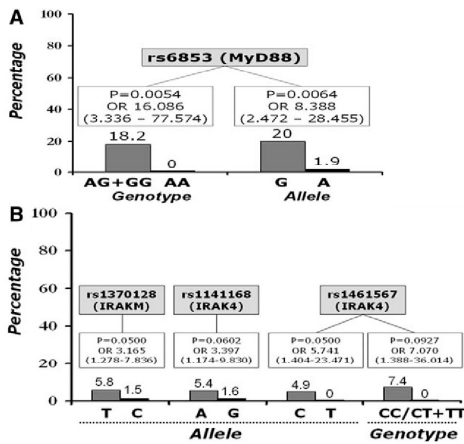
We also observed that some SNPs are related with the outcome of SIPD patients: pleuropneumonia with rs1624395 (G allele) and rs1370128 (C allele) in IRAKM; and marked leucocytosis with rs1059702 (CT + TT genotypes) in IRAK1, death with rs6853 (AG + GG genotypes and G allele) in MyD88 and sequelae with rs4251513 (CG + CC genotypes) in IRAK4.

The results of our cohort of SIPD patients may be extrapolated to other settings, since clinical and microbiologically, the data are similar to those used in other studies. Mean age of 3.13 years is similar to other studies carried out in the same hospital and other international studies before introduction of 13-valent pneumococcal vaccine.<sup>19,25</sup> The proportion of patients below 2 and 5 years old is also similar to these publications.<sup>19,25</sup> Furthermore, the proportion of each form of SIPD correlates with other studies carried out with similar populations and time frames.<sup>25</sup>

Conjugated polysaccharide vaccines have been developed in recent years. In Spain, PCV7 (serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) was introduced in 2001. PCV13, which also includes serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F and 19A, was licensed in 2010 (after our study was performed). Conjugated pneumococcal vaccines have been included in Catalonia's immunization schedule, but they are not funded by the public health system. Thus, vaccination coverage was low in



**FIGURE 2.** Genotype association with developing features in SIPD patients (A, B, presence of pleuropneumonia; C, leukocytosis >15,000/mm<sup>3</sup>; D, any kind of sequelae). P = P value. (x.xxx–y.yyy) = 95% confidence interval.



**FIGURE 3.** Genotype and allele association with death in SIPD patients (A, significant association; B, trend to association). P = P value. (x.xxx–y.yyy) = 95% confidence interval.

our study. However, vaccination coverage of our SIPD patients was similar to that found in other studies done with similar populations and time frames.<sup>19,23</sup>

Other researchers have studied the relationship between severity factors in infectious and inflammatory diseases and SNPs in TIR pathway proteins. Arcaroli et al<sup>15</sup> described a greater requirement of mechanical ventilation and greater number of patients with shock and death in septic adult patients with IRAK1 haplotype rs1059701-rs1059702-rs1059703. Sutherland et al<sup>14</sup> found a correlation between IRAK4 haplotype including rs4251513 and Gram-positive bacteremia in ICU patients. Also, associations have been described between asthma and IRAK4 SNPs (rs4251513, rs1461567, rs1141168) and IRAKM SNPs (rs1624395, rs1370128).<sup>16,17</sup>

However, most of these studies were carried out with adult populations.<sup>14–17</sup> It is known that dysfunctions of TLR-mediated IIS

have a greater expression in infants and young children<sup>7,9–11</sup> and that the quality and magnitude of immune response changes with age. Different studies have shown that the fight against infection relies on IIS in the first years of life.<sup>26</sup> For these reasons, we believe that studies focused on the search for TLR system dysfunctions must be undertaken in pediatric patients.

Hirschfeld et al<sup>27</sup> looked for TLR signaling functional defects in IPD pediatric patients, with no positive results. However, in that study, 92% of cases were occult bacteremia and bacteremic pneumonias, of unspecified severity, and in our study case selection was restricted to cases with severity criteria (SIRS criteria). Hirschfeld also excluded infants less than 3 months old and his study was retrospective, with consequent limitations in inclusion criteria. However, he hypothesized that the functional defects he did not find might be associated with recurrent or SIPD cases. In our study, we did not find any cases of recurrent IPD, but all of our cases met severity criteria.

Null mutations in IRAK4 and MyD88 have recently been described.<sup>7,9–11</sup> These mutations lead to a narrow spectrum of invasive bacterial infections caused by Gram-positive cocci (pneumococcus and *Staphylococcus aureus*), and noninvasive infections caused by *S. aureus* and *Pseudomonas*. As their discoverers described, this phenotype is quite surprising in primary immunodeficiencies. In our study, we found another association between variations of these proteins and susceptibility to SIPD. However, we cannot state whether the association found was due to a loss of function, as null mutations are, because we were not able to carry out functional studies on fresh blood samples. Their studies also concluded that bacterial infections found in patients with complete deficiencies in MyD88 and IRAK4 are typically recurrent.<sup>7,9–11</sup> We did not find any recurrent infection; this could be ascribed to an only partial defect, but also to the fact that the study period was not long enough to identify recurrences.

There are some potential limitations of genetic association studies that should be considered before drawing reliable conclusions.<sup>28</sup> Our study tried to resolve some of them.

First, samples should be as homogeneous as possible. This was so in terms of age (age range: 21 days–9 years), and most of the patients (91.67%) were of Caucasian Mediterranean ethnic origin. The control samples were also homogeneous in terms of these 2 variables. In addition, case and control samples are required to be comparable regarding variables which may influence genetic

results, such as ethnic group and gender. In our study, samples were comparable in the 2 variables.

Second, we had to look for past diseases which may have influenced the results. Most of the cases did not have any past medical history (55 patients, 91.67%).

Third, selection of candidate genes and SNPs followed important rules in genetic association studies, and this was an important point. Selected genes encode proteins which belong to TIR pathway in IIS, and selected SNPs are implicated in susceptibility to infectious and inflammatory diseases already described in the literature.<sup>14-17</sup> Moreover, diseases caused by mutations in 2 genes selected (IRAK4 and MyD88) had been described before.<sup>7,9</sup> This fact reinforces the opinion that these 2 genes encode critical proteins in the TIR common signaling pathway and indicates the lack of compensation or plasticity in their absence.

Fourth, SNPs selected were located at coding regions or regions expected to be involved in modulation of gene expression.

The approach to severe infectious diseases is changing. Nowadays, an important objective is to stratify patients objectively, to allow early diagnosis of severity and individualized therapeutic management, the basis of personalized medicine. This leads to the new clinical concept of "PIRO" (predisposition, insult, response, organ dysfunction) approach, which allows for the staging of severe infectious disease patients according to predisposing factors, infection, host response, and organ dysfunction. Predisposing factors include SNPs in genes involved in immune response, which seems to have an influence on the evolution of these patients as it is currently being reported in the literature, including this study.<sup>29</sup> A hypothetical consequence of these findings in clinical practice, related to IIS and IPD, might be the recommendation of therapies immunologically oriented, in the same way the recombinant mannose-binding lectin was tested in some mannose-binding lectin deficits.<sup>30</sup>

In conclusion, we have defined associations between SIPD and SNPs from proteins belonging to the TIR pathway. These genetic variations may lead to variations in TLR signaling, and as a consequence, in innate immune response. The identification of SNPs that predispose to infectious diseases, such as SIPD may help to identify patients at risk for severe infectious diseases and may allow for the design of specific treatments.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Teresa Toll, Montserrat Torredadell, Mireia Camós, Rosa Vilella and Araceli Montserrat from the Haematology Laboratory, and Cristina Esteva and Laura Selva from the Microbiology Laboratory for helping us with laboratory techniques.

#### REFERENCES

- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374:893-902.
- Muñoz-Almagro C, Ciruela P, Esteva C, et al. Catalan study group of invasive pneumococcal disease. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect*. 2011;63:151-162.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, et al. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:288-301.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343:338-344.
- Liu AH, Hohnston RB, Fenton MJ. Innate immunity. In: Adkinson NF, Bochner BS, Burks AW, et al, eds. *Adkinson's Allergy: Principles and Practice*. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2014:2-19.
- Koppe U, Sutorp N, Opitz B. Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012;14:460-466.
- Ku CL, von Bernuth H, Picard C, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med*. 2007;204:2407-2422.
- Ringwood L, Li L. The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine*. 2008;42:1-7.
- Picard C, Puel A, Bonnet M, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*. 2003;299:2076-2079.
- von Bernuth H, Picard C, Jin Z, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008;321:691-696.
- Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, et al. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89:403-425.
- Yuan FF, Marks K, Wong M, et al. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIIA gene polymorphisms in Streptococcus pneumoniae infection. *Immunol Cell Biol*. 2008;86:268-270.
- Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, et al. Common NFKBIL2 polymorphisms and susceptibility to pneumococcal disease: a genetic association study. *Crit Care*. 2010;14:R227.
- Sutherland AM, Walley KR, Nakada TA, et al. A nonsynonymous polymorphism of IRAK4 associated with increased prevalence of gram-positive infection and decreased response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun*. 2011;3:447-458.
- Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-κB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1335-1341.
- Balaci L, Spada MC, Olla N, et al. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *Am J Hum Genet*. 2007;80:1103-1114.
- Tewfik MA, Bossé Y, Lemire M, et al. Polymorphisms in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 are associated with total serum IgE. *Allergy*. 2009;64:746-753.
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6:2-8.
- de Sevilla MF, García-García JJ, Esteva C, et al. Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;51:124-128.
- Pollack MM, Patel KM, Ruttimann UE. PRISM III: an updated pediatric risk of mortality score. *Crit Care Med*. 1996;24:743-752.
- Muñoz-Almagro C, Gala S, Selva S, et al. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:1086-1089.
- Tarrago D, Fenoll A, Sanchez-Tatay D, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel realtime PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:828c34.
- Morillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, et al. SNP analysis to results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics*. 2008;24:2790-2791.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1995;57:289-300.
- Yildirim I, Stevenson A, Hsu KK, et al. Evolving picture of invasive pneumococcal disease in Massachusetts children: a comparison of disease in 2007-2009 with earlier periods. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:1016-1021.
- Wynn J, Cornell TT, Wong HR, et al. The host response to sepsis and developmental impact. *Pediatrics*. 2010;125:1031-1041.
- Hirschfeld AF, Bettinger JA, Victor RE, et al. Prevalence of Toll-like receptor signalling defects in apparently healthy children who developed invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol*. 2007;122:271-278.
- Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the Reporting of Genetic Association Studies. Strengthening the Reporting of Genetic Association Studies (STREGA): an extension of the STROBE statement. *PLoS Med*. 2009;6:e22.
- Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(3 Suppl):S55-S60.
- Garred P, Pressler T, Lanng S, et al. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2002;33:201-207.



2. Ponència a la Segona Reunió de Joves Investigadors en Infectologia Pediàtrica, Societat Espanyola d'Infectologia Pediàtrica (SEIP). Hospital Universitario La Paz, Madrid, 4 octubre 2013:

***Enfermedad neumocócica invasiva: genética y susceptibilidad.***

3. Comunicació oral al 31è Congrés Anual de la Societat Europea de Malalties Infeccioses Pediàtriques (ESPID). Milà, Itàlia, 28 maig - 01 juny 2013:

***Influence of innate immunitary response on severe invasive pneumococcal disease: genetic polymorphisms in Toll-like receptors pathway.***

4. Comunicació oral al VII Congrés de la Societat Espanyola d'Infectologia Pediàtrica (SEIP). Santiago de Compostela, 6 - 8 març 2014:

***Influencia de la respuesta inmunitaria innata en la enfermedad neumocócica invasiva grave: polimorfismos genéticos en la vía de señalización común Toll-IL1R.***

Premiada amb el segon premi a la millor comunicació oral del congrés.