

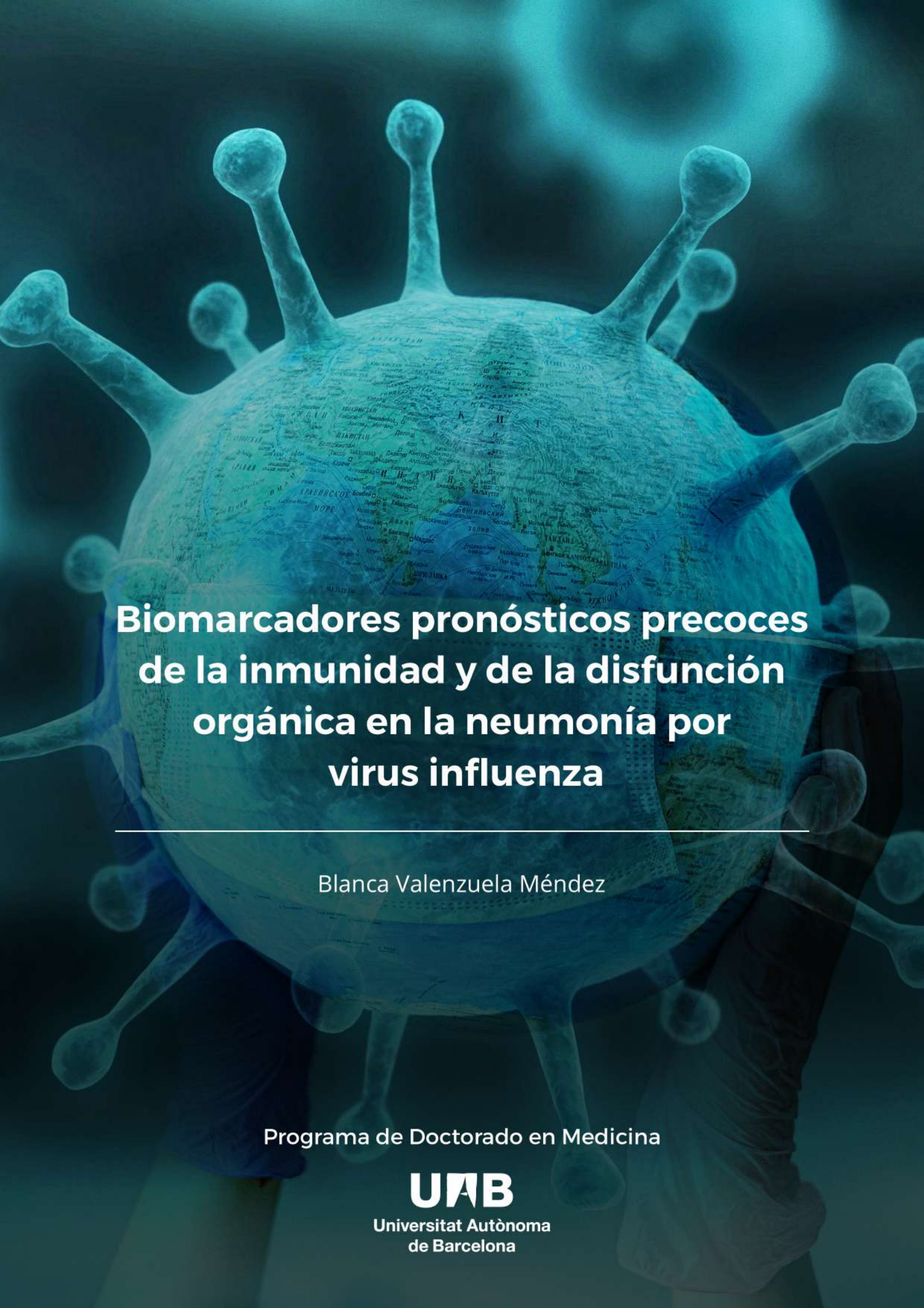


Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Biomarcadores pronósticos precoces  
de la inmunidad y de la disfunción  
orgánica en la neumonía por  
virus influenza**

---

Blanca Valenzuela Méndez

Programa de Doctorado en Medicina

**UAB**

Universitat Autònoma  
de Barcelona

**BIOMARCADORES PRONÓSTICOS PRECOCES DE LA  
INMUNIDAD Y DE LA DISFUNCIÓN ORGÁNICA EN LA  
NEUMONÍA POR VIRUS INFLUENZA**

por

**Blanca Valenzuela Méndez**

Tesis doctoral presentada para la obtención del Título de Doctor

Director de tesis: Jordi Rello Condomines

Tutor de tesis: Jordi Rello Condomines

Programa de Doctorado en Medicina RD99/2011

Departamento de Medicina

**UAB**  
Universitat Autònoma  
de Barcelona

Barcelona, 2021

**Jordi Rello Condomines.** Director del grupo de investigación de Recerca Clínica/Investigació en la Pneumonia i Sèpsis del Instituto de Investigación Vall'd Hebron. Profesor titular de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili (1999-2010) y la Universitat Autònoma de Barcelona (2010-2016) y Catedrático de Medicina de la Universitat Internacional de Catalunya (2020)

### **CERTIFICA**

Que la presente trabajo “Biomarcadores pronósticos precoces de la inmunidad y de la disfunción orgánica en la neumonía por virus influenza” elaborada por Blanca Valenzuela Méndez bajo su dirección cumple los requisitos para ser presentada como tesis doctoral de acuerdo con la Normativa de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona aplicable a estudios universitarios regulados en conformidad con el Real Decreto 99/2011.

“Jemand, der niemals Fehler gemacht hat, hat nie etwas neues ausprobiert”

“Quien nunca ha cometido un error nunca ha intentado nada nuevo”

-Albert Einstein

## AGRADECIMIENTOS

Con este texto se finaliza una etapa. Hace 10 años que empezó este proyecto de la mano de mi mentor, mi padre.

Ha sido un camino largo, no exento de obstáculos, por lo que querría agradecer a todos aquellos que me han acompañado en este viaje.

Primero a mi familia. Mis padres han sido el espejo donde reflejarme. Ejemplo de trabajo, esfuerzo y una inmensa humanidad, como personas y como médicos.

Al profesor Jordi Rello, por la confianza depositada en mi, sin importar hacia donde derivaba mi formación. Siempre ha resuelto de forma inmediata, con sabiduría y amabilidad las múltiples dudas que me han surgido en el desarrollo de esta tesis. Gracias por dar forma y un sentido a este proyecto y por tu paciencia infinita.

A los investigadores y personal de los hospitales participantes que generosamente me han facilitado la recogida de datos y muestras: Rafael Bohollo, Luis Puget, Irene Valiente Alemán, Pilar Martínez, Consuelo Méndez, José Rubio y David Andaluz.

Al servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario de Jerez por el apoyo incondicional en este proyecto. Una mención especial a su Jefe histórico, Antonio Jareño Chaumel amigo y maestro, una persona muy importante en mi familia desde mi niñez, durante su dirección se reclutaron la mayoría de los pacientes con gripe y desgraciadamente hoy no está con nosotros víctima del Covid-19.

Al servicio de Hematología y Análisis Clínicos del hospital Universitario de Jerez donde se analizaron la mayor parte de parámetros bioquímicos e inmunológicos de la tesis, especialmente a Francisco Rodríguez Gutiérrez (Kiko) por su inestimable ayuda todos estos años.

Al servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Germanas Trias i Pujol, por haberme permitido compatibilizar mi formación con este proyecto, en especial al dr. M. Àngel Jiménez por su amistad, a los dres. M. Àngel Luna y Montse Serra, tutores durante la residencia que me colmaron de sabios consejos. A la dra. Mina Comas y el dr. Sergio Martínez, dos formas diferentes de erudismo de los que he tenido la suerte de aprender.

A mi compañero, el dr. Julio Garrido por su inmenso apoyo en los últimos años.

Finalmente a mi hermana, familia y amigos por estar siempre ahí.

Y a los que ya no están, mis abuelos Consuelo, Emilio y Paco, fuente de inspiración para una generación, que esperemos algún día estar a su altura.

## ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico  
APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNc: ARN complementario de longitud completa  
ARNm: ARN mensajero  
ARNp: ARN polimerasa  
ARNv: ARN de polaridad negativa  
CD: célula dendrítica  
CLIs: células linfoides innatas  
COX: ciclooxigenasa  
CTL: linfocitos T citotóxicos  
DD: dímero D  
DAMPs: patrones moleculares asociados al daño  
Fe: hierro  
FGF21: Factor de Crecimiento Fibroblástico  
HA: hemaglutinina  
IAV: virus de la influenza A  
IFN: interferón  
IL: interleuquina  
IRF: factor regulador del interferón  
ISGs: genes estimulados por IFN  
LO: lipooxigenasa  
MAIT: Células de la mucosa asociados invariantes T  
MCP: proteína quimioatrayente de monocitos  
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad  
MIDA5: factor asociado a la diferenciación del melanoma  
MR-proADM: región media de la pro adrenomedulina.



NA: neuraminidasa  
NAC: neumonía adquirida en la comunidad  
NEP: proteína exportadora nuclear  
NETs: trampas extracelulares de los neutrófilos  
NF- $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas  
NK: Natural Killers  
NLRP3: criopirina  
NLS: secuencias de localización nuclear  
NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótidos  
NOS: óxido nítrico sintasa  
NP: proteína de unión a nucleoproteína  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PA: subunidad polimerasa A  
PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno  
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos  
PB1: subunidad polimerasa B1  
PB2: subunidad polimerasa B2  
PCR: proteína C reactiva  
PCT: procalcitonina  
PD-1: receptor 1 de la muerte celular programada  
PMN: polimorfonuclear neutrófilo  
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones  
PTX3: pentraxina 3  
RIG-I: gen inducible por ácido retinoico  
RNP: ribonucleoproteínas  
SAPS II: simplified acute physiology score II  
SARI: infección respiratoria aguda grave  
SMF: sistema mononuclear fagocítico  
SHF: síndrome hemofagocítico  
TLRs: receptores Toll like



TNF: factor de necrosis tumoral

## LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Virus de la gripe .....	7
2. Ciclo infeccioso de la gripe.....	10
3. Esquema de la respuesta inmune a la gripe .....	15
4. Eventos clave en la inmunopatología de la sepsis .....	25
5. Evolución histórica de los modelos explicativos de la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria en la sepsis.....	31
6. Curvas ROC de MR-proADM para la gravedad. ....	69
7. Curvas ROC de MR-proADM para la mortalidad .....	70
8. Comparación de las curvas ROC de los biomarcadores en el grupo de gripes H1N1.....	71
9. Curva ROC para los niveles de IL6 en los paciente con influenza B.....	72
10. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para MR-proADM.....	70
11. Curva ROC de los niveles de Ferritina en los pacientes con Gripe A N1H1 para el pronóstico de gravedad.....	79
12. Curva ROC de los niveles de Ferritina para detectar la mortalidad .....	80
13. Curva de supervivencia Kaplan Meyer para la ferritina.....	80
14. Diferencia en el inmunofenotipo y biomarcadores respecto a la gravedad dentro de los grupos de edad.....	94
15. Inmunofenotipo y biomarcadores en los paciente ventilados según el grupo de edad .....	95
16. Representación de las curvas ROC para la predicción de severidad en los diferentes parámetros de la inmunidad .....	101
17. Representación de las curvas ROC para la predicción de mortalidad en los diferentes parámetros de la inmunidad .....	99
18. Análisis multivariante. Parámetros de inmunidad. Curva de supervivencia.de neumonías ingresadas en UCI .....	103

<b>19.</b> Análisis multivariante. Curva de supervivencia de neumonías H1N1 ingresadas en UCI .....	104
<b>20.</b> Correlación entre MR-proADM y HLA-DR .....	104
<b>21.</b> Correlación entre PCR y HLA-DR.....	107
<b>22.</b> Correlación de los niveles de IL6 con los niveles de Ferritina y HLA-DR en pacientes ingresados en la UCI con gripe A N1H1 .....	108

## LISTA DE TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Biomarcadores en la NAC.....	41-42
2. Número de neumonías por microorganismos .....	53
3. Características demográficas y clínicas de pacientes con neumonía severa causada por el virus de la influenza.....	54-56
4. Características demográficas y clínicas de pacientes con neumonía grave causada por el virus de la influenza por diferentes cepas.....	56-58
5. Características demográficas y clínicas de pacientes con neumonía severa causada por el virus de la influenza A H1N1.....	58-60
6. Relación de gérmenes aislados mediante distintos cultivos en los pacientes con gripe ingresados en la UCI .....	61
7. Relación de gérmenes aislados mediante distintos cultivos en los pacientes con gripe A N1H1 ingresados en la UCI.....	61-62
8. Niveles de biomarcadores al ingreso en los pacientes con distintos tipos de neumonías ingresados en la UCI.....	64
9. Niveles de biomarcadores al ingreso en los distintos grupos de controles .....	64
10. Comparación de los niveles de biomarcadores al ingreso en los pacientes con neumonía por gripe ingresados en UCI y no ingresados en UCI.....	64
11. Niveles de biomarcadores al ingreso en los pacientes con distintos tipos de neumonías ingresados en la UCI.....	65
12. Niveles de Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos ingresados en la UCI o en planta y de los grupos de las distintas cepas estudiadas.....	66
13. Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas .....	64

14. Niveles de Procalcitonina al ingreso en $\mu\text{g/l}$ del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas .....	66
15. Niveles de Niveles de MR-proADM al ingreso en $\text{nmol/l}$ del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.....	67
16. Niveles de Procalcitonina al ingreso en $\text{nmol/l}$ del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.....	68
17. Niveles de PCR al ingreso en $\text{nmol/l}$ del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.....	68
18. Niveles de IL6 al ingreso en $\text{pg/ml}$ del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.....	68
19. Análisis de las curvas ROC para la severidad de los diferentes biomarcadores .....	69
20. Análisis de las curvas ROC para la mortalidad en UCI de los diferentes biomarcadores .....	70
21. Análisis de las curvas ROC para la severidad de los diferentes biomarcadores para cada tipo de gripe .....	71
22. Análisis de las curvas ROC para la mortalidad en UCI de los diferentes biomarcadores para cada tipo de gripe .....	71
23. Análisis de las curvas ROC para la mortalidad en UCI para los niveles de IL6 en pacientes con gripe del tipo B .....	72
24. Análisis multivariante para la predicción de la mortalidad en la UCI de la MR-proADM.....	74
25. Análisis multivariante para la predicción de la mortalidad hospitalaria de la MR-proADM .....	74
26. Comparación de los niveles de hierro, ferritina y transferrina en UCI en las neumonías por diferentes microorganismos .....	75

27. Comparación de los niveles de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por diferentes tipos de gripe .....	76
28. Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI .....	76
29. Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las diferentes neumonías por gripe ingresadas en la UCI .....	77
30. Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe ingresadas según la supervivencia. ....	77
31. Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en el hospital según la supervivencia .....	78
32. Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según la supervivencia .....	78
33. Análisis multivariante. Proteínas relacionadas con el hierro. Predictores de mortalidad al ingreso del Hospital de las neumonías por gripe.....	81
34. Análisis multivariante. Proteínas relacionadas con el hierro. Predictores de mortalidad al ingreso del Hospital de las neumonías por gripe H1N1. .	81
35. Comparación del estado inmunitario en los distintos tipos de neumonía según el ingreso en UCI.....	82-83
36. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI.....	83-84
37. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe N1H1 según el ingreso en UCI.....	85
38. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe según la supervivencia .....	87-88
39. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según la supervivencia .....	88-89
40. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe N1H1 ingresadas en la UCI según la supervivencia .....	89-90
41. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según necesidad de VM.....	91

42. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según necesidad de VM.....	91-92
43. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según edad.....	92-93
44. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según edad .....	93
45. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según antecedente de inmunodepresión.....	95-96
46. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según antecedente de inmunodepresión .....	96
47. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según antecedente de obesidad.....	97
48. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según antecedente de obesidad... ..	97-98
49. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según coinfección al ingreso.....	98-99
50. Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según coinfección al ingreso .....	99-100
51. Valores de las curvas ROC para predecir la severidad en pacientes ingresados en el hospital con neumonía por gripe .....	100
52. Valores de las curvas ROC para predecir la severidad en pacientes ingresados en el hospital con neumonía por gripe H1N1 .....	100
53. Valores de las curvas ROC para predecir la mortalidad en pacientes ingresados el hospital con neumonía por gripe.....	100-101
54. Valores de las curvas ROC para predecir la mortalidad en pacientes ingresados en la UCI con neumonía por gripe H1N1 .....	101
55. Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso en el hospital del grupo total.....	103
56. Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso en UCI.....	103



57. Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso del Hospital de las neumonías por H1N1.....	104
58. Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso en UCI de las neumonías por H1N1 .....	104
59. Comparación de parámetros inmunitarios, inflamatorios y biomarcadores según inmunofenotipos. ....	105-106
60. Comparación de parámetros inmunitarios, inflamatorios y biomarcadores entre gripe H1N1 y COVID-19 .....	110

## TABLA DE CONTENIDOS

Resumen .....	1
Resum.....	3
Abstract.....	4
<b>1. Introducción .....</b>	<b>5</b>
1.1. Virus de la influenza: componentes y ciclo infectivo .....	7
1.2. Epidemiología del virus influenza.....	13
1.3. Papel de la respuesta del huésped a la infección por virus influenza....	15
1.4. Inmunopatología en la respuesta a la infección por el virus de la influenza .....	23
1.5. Importancia del hierro y proteínas relacionadas en la respuesta inmune a la infección .....	34
1.6. Biomarcadores pronósticos precoces en la neumonía grave por influenza .....	40
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>45</b>
<b>4. Material y métodos .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>53</b>
5.1. Biomarcadores.....	63
5.2. Hierro y proteínas relacionadas .....	75
5.3. Inmunidad e inflamación.....	82
5.4. Inmunofenotipos predictores de severidad en la gripe A.....	105
5.5. Comparación del estado de disfunción inmune de los pacientes con neumonía por gripe H1N1 y SARS-CoV-2.....	109
<b>6. Discusión.....</b>	<b>111</b>
6.1. Biomarcadores.....	116
6.2. Hierro y proteínas relacionadas .....	120
6.3. Inmunidad e inflamación.....	124
6.4. Inmunofenotipos predictores de severidad en la gripe A.....	131

6.5. Comparación del estado de disfunción inmune de los pacientes con neumonía por gripe H1N1 y SARS-CoV-2.....	134
6.6. Limitaciones.....	136
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>137</b>
<b>8. Líneas de futuro.....</b>	<b>139</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>141</b>
<b>10. Anexos .....</b>	<b>164</b>
10.1. Check list STROBE .....	164
10.2. Publicación 1 .....	166
10.3. Publicación 2 .....	172
10.4. Publicación 3 .....	185
10.5. Financiación y recursos.....	196

## RESUMEN

La infección por gripe causa anualmente un exceso de morbimortalidad a nivel mundial. A pesar de ser concebida como una enfermedad leve, su evolución fatal en ciertos pacientes es rápidamente progresiva. La patogenia de la infección por el virus de la gripe depende de la virulencia viral y la respuesta del huésped. La detección precoz de los casos que evolucionarán de forma grave es crucial para su pronóstico ya que permite su ingreso en UCI y el inicio precoz de las medidas de soporte y tratamiento específico. **Objetivo:** evaluar la utilidad pronóstica de biomarcadores (MR pro-ADM, PCT, PCR, ferritina), parámetros de la inmunidad innata y adquirida en pacientes adultos con sepsis grave de origen pulmonar debido a neumonía por virus de la influenza. **Material y métodos:** Estudio prospectivo, observacional y multicéntrico. Se incluyeron pacientes adultos que ingresaron en las UCIs de cinco hospitales con el diagnóstico de sepsis grave por neumonía por virus de la influenza. Se determinaron niveles de biomarcadores (MR-proADM, PCR, PCT), las subpoblaciones de linfocitos, la expresión de HLA-DR en células CD14 +, ferritina y otras proteínas relacionadas al ingreso. Se analizó su relación con el pronóstico de severidad y mortalidad. **Resultados:** Se incluyeron 122 pacientes con neumonía grave ingresados en la UCI (75 H1N1, 33 H3N2 y 14 B) y 61 con menor gravedad como grupo control. También se compararon con un grupo de neumonías bacterianas y por otros virus, incluyendo un grupo con neumonía grave por SARS-CoV-2. Los valores de MR pro-ADM, PCT y PCR fueron estadísticamente superiores en los pacientes ingresados por neumonía por gripe respecto a los no ingresados en la UCI, manteniendo esa diferencia en el subgrupo H1N1. Los valores de MR-proADM, PCT y PCR fueron estadísticamente superiores en los pacientes no supervivientes respecto a los supervivientes, en el grupo total de gripes y en H1N1. La MR-proADM presenta en el análisis de curva ROC la mayor AUC para la predicción de severidad y mortalidad, siendo también la única estadísticamente significativa en el análisis de la curva de mortalidad de Kaplan Meyer. Los pacientes ingresados en la UCI respecto a los no ingresados presentan una disminución significativa de linfocitos, monocitos y NK CD56+, una expresión disminuida de HLA-DR y un aumento de los niveles de ferritina. Esta diferencia se mantiene en la comparación por supervivencia. En el estudio de las curvas ROC para la severidad la HLA-DR tiene la mayor AUC seguida de la ferritina. La ferritina tiene la mayor AUC para la predicción de mortalidad. **Conclusiones:** Los niveles iniciales plasmáticos de MR-proADM, PCR y PCT son efectivos para determinar el resultado desfavorable y el riesgo de ingreso en la UCI y la mortalidad en pacientes con neumonía por el virus de la influenza, siendo la MR-proADM la que presenta un mayor poder de predicción en el análisis de la curva ROC y de supervivencia. La alteración precoz de la inmunidad condiciona el pronóstico y supervivencia de los pacientes con neumonía por influenza, sobre todo la disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos CD14+ y los valores altos de ferritina.

## **PALABRAS CLAVES**

Influenza; neumonía; biomarcadores; inmunidad; sepsis; interacción virus-huésped

## RESUM

La infecció per grip causa anualment un excés de morbimortalitat a nivell mundial. Tot i ser concebuda com una malaltia lleu, la seva evolució fatal en certs pacients és ràpidament progressiva. La patogènia de la infecció pel virus de la grip depèn de la virulència viral i la resposta de l'hoste. La detecció precoç dels casos que evolucionaran de forma greu és crucial per al seu pronòstic ja que permet el seu ingrés a UCI i l'inici precoç de les mesures de suport i tractament específic. **Objectius:** avaluar la utilitat pronòstica de paràmetres de la immunitat innata i adquirida en pacients amb sèpsia greu d'origen pulmonar a causa de pneumònia per virus de la influença, així com dels nivells a l'ingrés de MR-proADM, de proteïna C-reactiva (CRP) i de procalcitonina (PCT). **Material i mètodes:** Estudi prospectiu observacional, multicèntric. Es van incloure pacients que ingressen a les UCIs de cinc hospitals amb el diagnòstic de sèpsia greu per pneumònia per virus de la influença. Es van determinar les subpoblacions de limfòcits, l'expressió d'HLA-DR en cèl·lules CD14+, ferritina i els nivells de biomarcadors (MR-proADM, PCR, PCT) a l'ingrés. Es va analitzar la seva relació amb el pronòstic de severitat i mortalitat. **Resultats:** Es van incloure 122 pacients amb pneumònia greu ingressats a l'UCI (75 H1N1, 33 H3N2 i 14 B) i 61 amb menor gravetat com a grup control. També es van comparar amb un grup de pneumònies bacterianes i per altres virus, incloent un grup amb pneumònia greu per SARS-CoV-2. Els valors de MR-proADM, PCT i PCR van ser estadísticament superiors en els pacients ingressats per pneumònia per grip que els no ingressats a la UCI, mantenint aquesta diferència en el subgrup H1N1. Els valors de MR-proADM, PCT i PCR van ser estadísticament superiors en els pacients no supervivents respecte als supervivents, en el grup total de grip i en H1N1. La MR-proADM presenta en l'anàlisi de corba ROC la major AUC per a la predicció de severitat i mortalitat, sent també l'única estadísticament significativa en l'anàlisi de la corba de mortalitat de Kaplan Meyer. Els pacients ingressats a l'UCI respecte als no ingressats presenten una disminució significativa de limfòcits, monòcits i NK CD56+, una expressió disminuïda d'HLA-DR i un augment dels nivells de ferritina. Aquesta diferència es manté en la comparació per supervivència. En l'estudi de les corbes ROC per a la severitat la HLA-DR té la major AUC seguida de la ferritina i per la mortalitat la ferritina va aconseguir la major AUC. **Conclusions:** Els nivells inicials de MR-proADM, PCR i PCT són efectius per determinar el resultat desfavorable i el risc d'ingrés a la UCI i la mortalitat en pacients amb pneumònia per virus de la influença, sent la MR-proADM la que presenta un major poder de predicció en l'anàlisi de la corba ROC i de supervivència. La alteració precoç de la immunitat condiciona el pronòstic i supervivència dels pacients amb pneumònia per grip, sobretot la disminució de l'expressió d'HLA-DR en monòcits CD14+ i els valors alts de ferritina.

### PARAULES CLAU

influenza; pneumònia; biomarcadors; immunitat; sèpsia; interacció virus-hoste

## ABSTRACT

Influenza infection causes excess morbidity and mortality annually worldwide. Despite being conceived as a mild disease, its fatal evolution in certain patients is rapidly progressive. The pathogenesis of influenza virus infection depends on viral virulence and host response. Early detection of cases that will evolve severely is crucial for their prognosis since it allows their admission to the ICU and the early initiation of support measures and specific treatment. **Objective:** to evaluate the prognostic utility of aspects of innate and acquired immunity in patients with severe sepsis of pulmonary origin due to pneumonia due to influenza virus, as well as the levels at admission of MR-proADM, of C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) and parameters of iron metabolism. **Material and methods:** Prospective observational, multicenter study. We included patients admitted to the ICUs of five hospitals with the diagnosis of severe sepsis due to influenza virus pneumonia. Lymphocyte subpopulations, HLA-DR expression in CD14 + cells, parameters of iron metabolism and biomarker levels (MR-proADM, PCR, PCT) at admission. We analyze its relation to severe prognostic and mortality. **Results:** 122 patients with severe pneumonia admitted to the ICU (75 H1N1, 33 H3N2 and 14 B) and 61 with less severity as a control group were included. They were also compared with a group of bacterial and other viral pneumonia, including a group with severe SARS-CoV-2 pneumonia. The MR-proADM, PCT and PCR values were statistically higher in patients admitted for influenza pneumonia than those not admitted to the ICU, maintaining this difference in the H1N1 subgroup. The MR-proADM, PCT and PCR values were statistically higher in the non-surviving patients compared to the survivors, in the total group of flu and in H1N1. The MR-proADM presents the highest AUC for the prediction of severity and mortality in the ROC curve analysis, being also the only statistically significant one in the analysis of the Kaplan Meyer mortality curve. Patients admitted to the ICU compared to those not admitted presented a significant decrease in lymphocytes, monocytes and NK CD56+, a decreased expression of HLA-DR on monocytes CD14+ and an increase in ferritin levels. This difference is maintained in the survival comparison. In the study of ROC curves for severity, HLA-DR had the highest AUC followed by Ferritin. For mortality ferritin reached the highest AUC. **Conclusions:** Initial MR-proADM, PCR and PCT levels are effective in determining adverse outcome and risk of ICU admission and mortality in patients with influenza virus pneumonia, MR-proADM has the highest potency. of prediction in the analysis of the ROC curve and survival. Early deterioration of immunity conditions the prognosis and survival of patients with influenza pneumonia.

## KEYWORDS

influenza virus; pneumonia; biomarkers; immunity; sepsis; virus-host interaction



# 1. INTRODUCCIÓN

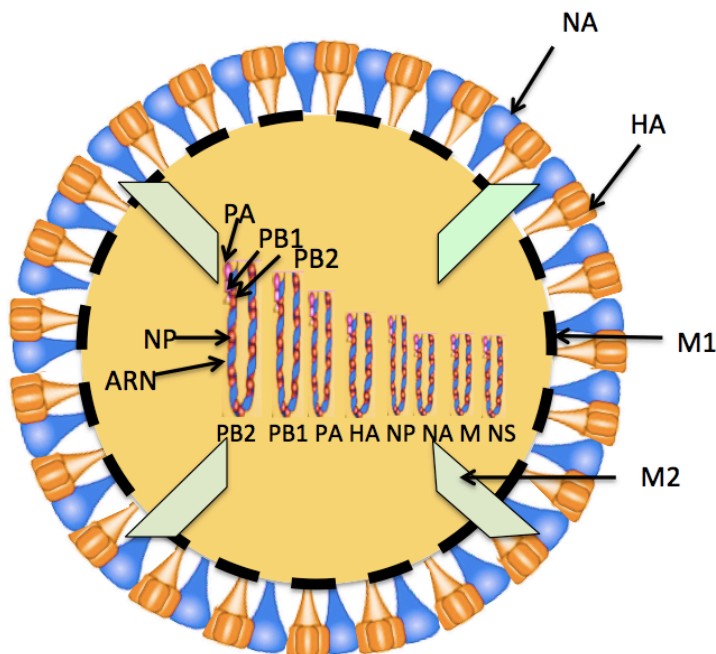
La infección por gripe causa anualmente un exceso de morbimortalidad a nivel mundial. A pesar de ser concebida como una enfermedad leve, su evolución fatal en ciertos pacientes es rápidamente progresiva. La patogenia de la infección por el virus de la gripe depende de la virulencia viral y la respuesta del huésped. La detección precoz de los casos que evolucionarán de forma grave es crucial para su pronóstico ya que permite su ingreso en UCI y el inicio precoz de las medidas de soporte y tratamiento específico. Objetivo: evaluar la utilidad pronóstica de biomarcadores (MR pro-ADM, PCT, PCR, ferritina), parámetros de la inmunidad innata y adquirida en pacientes adultos con sepsis grave de origen pulmonar debido a neumonía por virus de la influenza. Material y métodos: Estudio prospectivo, observacional y multicéntrico. Se incluyeron pacientes adultos que ingresaron en las UCIs de cinco hospitales con el diagnóstico de sepsis grave por neumonía por virus de la influenza. Se determinaron niveles de biomarcadores (MR-proADM, PCR, PCT), las subpoblaciones de linfocitos, la expresión de HLA-DR en células CD14 +, ferritina y otras proteínas relacionadas al ingreso. Se analizó su relación con el pronóstico de severidad y mortalidad. Resultados: Se incluyeron 122 pacientes con neumonía grave ingresados en la UCI (75 H1N1, 33 H3N2 y 14 B) y 61 con menor gravedad como grupo control. También se compararon con un grupo de neumonías bacterianas y por otros virus, incluyendo un grupo con neumonía grave por SARS-CoV-2. Los valores de MR pro-ADM, PCT y PCR fueron estadísticamente superiores en los pacientes ingresados por neumonía por gripe que los no ingresados en la UCI, manteniendo esa diferencia en el subgrupo H1N1. Los valores de MR-proADM, PCT y PCR fueron estadísticamente superiores en los pacientes no supervivientes respecto a los supervivientes, en el grupo total de gripes y en H1N1. La MR-proADM presenta en el análisis de curva ROC la mayor AUC para la predicción de severidad y mortalidad, siendo también la única estadísticamente significativa en el análisis de la curva de mortalidad de Kaplan Meyer. Los pacientes ingresados en la UCI respecto a los no ingresados presentan una disminución significativa de linfocitos, monocitos y NK CD56+, una expresión disminuida de HLA-DR y un aumento de los niveles de ferritina. Esta diferencia se mantiene en la comparación por supervivencia. En el estudio de las curvas ROC para la severidad la HLA-DR tiene la mayor AUC seguida de la ferritina. La ferritina tiene la mayor AUC para la predicción de mortalidad. Conclusiones: Los niveles iniciales plasmáticos de MR-proADM, PCR y PCT son efectivos para determinar el resultado desfavorable y el riesgo de ingreso en la UCI y la mortalidad en pacientes con neumonía por el virus de la influenza, siendo la MR-proADM la que presenta un mayor poder de predicción en el análisis de la curva ROC y de supervivencia. La alteración precoz de la inmunidad condiciona el pronóstico y supervivencia de los pacientes con neumonía por influenza, sobre todo la disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos CD14+ y los valores altos de ferritina.

Las epidemias de gripe anuales causan 3 a 5 millones de casos graves y 290 000 a 650 000 muertes en el mundo,<sup>1</sup> sin embargo, durante las pandemias el escenario puede ser devastador. Todas las pandemias conocidas han sido causadas por virus gripales de tipo A. La pandemia más virulenta fue la mal llamada gripe española en el año 1918, causada por un subtipo H1N1 que infectó aproximadamente el 30% de la población mundial y mató a más de 40 millones de personas<sup>2</sup>, aunque estudios recientes lo elevan hasta 100 millones de muertes<sup>3</sup>. Las tasas de letalidad de las pandemias posteriores fueron inferiores, calculándose un 0,03% de la población mundial durante la influenza asiática H2N2 de 1957 y la Influenza de Hong Kong H3N2 de 1968, y un 0,01 durante los primeros 12 meses de la pandemia H1N1 de 2009<sup>4</sup>.

La pandemia de gripe de 1918 se caracterizó por una mayor mortalidad en adultos jóvenes, obesos y mujeres embarazadas,<sup>5</sup> un fenómeno que sigue sin explicarse pero que se repitió en la pandemia de 2009. La gripe N1H1 afecta a pacientes jóvenes y otros con enfermedades importantes, y es la principal causa de neumonía viral adquirida en la comunidad en adultos. La morbilidad y la mortalidad son altas, con una tasa de hospitalización de alrededor del 10%, de las cuales 13-45% ingresan en Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs). A pesar de los avances en el tratamiento, la mortalidad se mantiene en torno al 30%.<sup>6</sup> Por tanto, la identificación temprana de la neumonía viral potencialmente grave es extremadamente importante para optimizar el tratamiento en estos pacientes.

## 1.1. VIRUS DE LA INFLUENZA: COMPONENTES Y CICLO INFECTIVO

Los virus de la gripe pertenecen a la familia Orthomyxoviridae caracterizada por un genoma ARN de cadena simple, segmentado, lineal, monocatenario de sentido negativo<sup>7</sup>. Están categorizados en cinco géneros (tipo A, B, C, Togovirus, Isavirus)<sup>8</sup>. Los causantes de las epidemias estacionales son los virus gripales de tipo A y B<sup>9</sup>.



**Figura 1.** Esquema de Virus de la Gripe. Adaptación de Krammer F, Smith G, Fouchier R, Peiris M, Kedzierska K, Doherty P et al. Influenza. Nature Reviews Disease Primers. 2018;4(1).

ARN: ácido ribonucleico, HA: hemaglutinina, NA: neuraminidasa, NEP: proteína exportadora nuclear, NLS: secuencias de localización nuclear, NP: proteína de unión a nucleoproteína, PA: subunidad polimerasa A, PB1: subunidad polimerasa B1, PB2: subunidad polimerasa B2, RNP: ribonucleoproteínas

En la figura 1 se muestran un esquema de la estructura del virus de la influenza. Los viriones poseen una forma esférica y en su interior albergan un nucleocápside que contiene ocho fragmentos de ARN monocatenario, una nucleoproteína y el complejo ARN-polimerasa<sup>10</sup>. Los

tres segmentos de ARN más grandes codifican las tres subunidades de las ARN polimerasas dependientes de ARN virales (PB1, PB2 y PA) que son responsables de la síntesis y replicación de ARN en células infectadas, y los dos segmentos siguientes de ARN codifican las glucoproteínas virales hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). El genoma de ARN está unido por la nucleoproteína viral (NP), que está codificada por el segmento 5 de ARN. Los segmentos 6, 7 y 8 de ARN codifican más de una proteína, la proteína de matriz (M1) y la proteína de membrana (M2) y la proteína no estructural NS1 y la proteína de exportación nuclear (NEP), que no se muestra. La proteína no estructural NS1 es un factor de virulencia que se ha visto involucrado en multitud de interacciones con la célula infectada que lo hacen imprescindible en las alteraciones de la maquinaria celular inducida por el virus<sup>11</sup>. Parece también tener un papel importante en la inhibición de la poliadenilación y exportación de RNA mensajeros celulares<sup>12</sup>. Además, posee una función de inmunomodulación mediante la supresión de la inmunidad innata a través de la inhibición de la producción de interferón de tipo I (IFN) en células infectadas e inhibe la inmunidad adaptativa atenuando la maduración de las células dendríticas (CD) humanas y su capacidad para inducir las respuestas de las células T. Este es el motivo por el cual cepas con NS1 mutados pueden ser utilizadas en vacunas atenuadas<sup>13</sup>.

Parece que la proteína M1 proporciona un armazón que ayuda a la estructura del virión, juega un papel importante en la unión de la ribonucleoproteínas (RNPs) y, junto con la NEP, regula el tráfico de los segmentos de ARN viral en la célula. La proteína M2 que constituye un canal iónico transmembrana esencial para la liberación de las RNPs al citoplasma durante la entrada del virus a la célula mediada por endocitosis<sup>14</sup>, colaborando también en el ensamblaje del virus<sup>15</sup>. Ambas proteínas se encuentran en la superficie del virus ancladas en la membrana lipídica.

En las últimas décadas se han ido descubriendo nuevas proteínas como PB1-F2, PA-X, PA-152 y PA-182. La PB1-F2 se localiza en la mitocondria y tiene una actividad proapoptótica<sup>16</sup>. PA-X modula la respuesta de la célula hospedadora y la virulencia viral frente a la infección. En modelos animales se ha observado que los ratones infectados por cepas sin estas proteínas presentan menor patogenicidad y menor eficiencia de replicación<sup>17</sup>.

En la parte más externa se sitúa la envoltura lipídica, que procede de la membrana citoplasmática de la célula infectada. En ella se anclan a modo de proyecciones radiales las glucoproteínas de origen vírico: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).<sup>18</sup> Las dos proteínas son determinantes antigénicos contra los que se dirige la respuesta inmunológica humoral neutralizante.<sup>19</sup>

La HA, componente más abundante, tiene como función la fijación del virus a los receptores mucoprotéicos de las células epiteliales ricos en ácido siálico del tracto respiratorio así como su fusión con la membrana celular.<sup>20</sup> La preferencia por enlaces glicosídicos particulares de ácidos siálicos de los sitios de unión de las hemaglutininas de las diferentes especies de la influenza explican el tropismo por diferentes especies. Las hemaglutininas de los virus humanos se unen muy bien a los ácidos siálicos ligados a galactosa por enlaces 2,6 alfa presentes principalmente en el epitelio respiratorio superior humano y de otros mamíferos; mientras que los virus aviares preferentemente se unen a los ácidos siálicos conectados con galactosa por enlaces 2,3 alfa encontrándose principalmente en el epitelio del intestino de las aves<sup>21</sup>. Esto concierne preferencia por el receptor pero no especificidad absoluta, de forma que bien por un alto inóculo viral o por algunas mutaciones puntuales en la HA se puede producir el salto a otras especies. La NA es una N-acetilneuraminidasa (sialidasa) y colabora con la HA en los procesos de fusión y penetración así como liberación de nuevos viriones, difusión de los mismos a través de la matriz extracelular y apoptosis celular<sup>22</sup>.

Las proteínas estructurales se unen a las moléculas de ARN formando las RNPs. Las subunidades PB1, PB2 y PA forman la polimerasa viral que se unen al promotor viral, fruto de la interacción de los extremos de cada uno de estos segmentos que presentan complementariedad parcial e invertida.<sup>23</sup> El resto del segmento de RNA está recubierto por subunidades de la proteína NP. Estas estructuras ribonucleoproteicas son las encargadas de llevar a cabo los procesos de transcripción y replicación<sup>24</sup>.

Las etapas de la replicación de la gripe A son compartidas por otros tipos de virus ARN monocatenario negativo. Cada uno de estos procesos tiene una o más proteínas virales que desempeñan un papel clave. Se pueden resumir en las siguientes:

- Adsorción de virus y endocitosis
- Síntesis de ARN mensajero y replicación del ARN viral
- Procesamiento post-transcripcional de ARNm viral
- Traducción y procesamiento post-traduccion de las proteínas del virus
- Ensamblaje y liberación de virus desde las células.

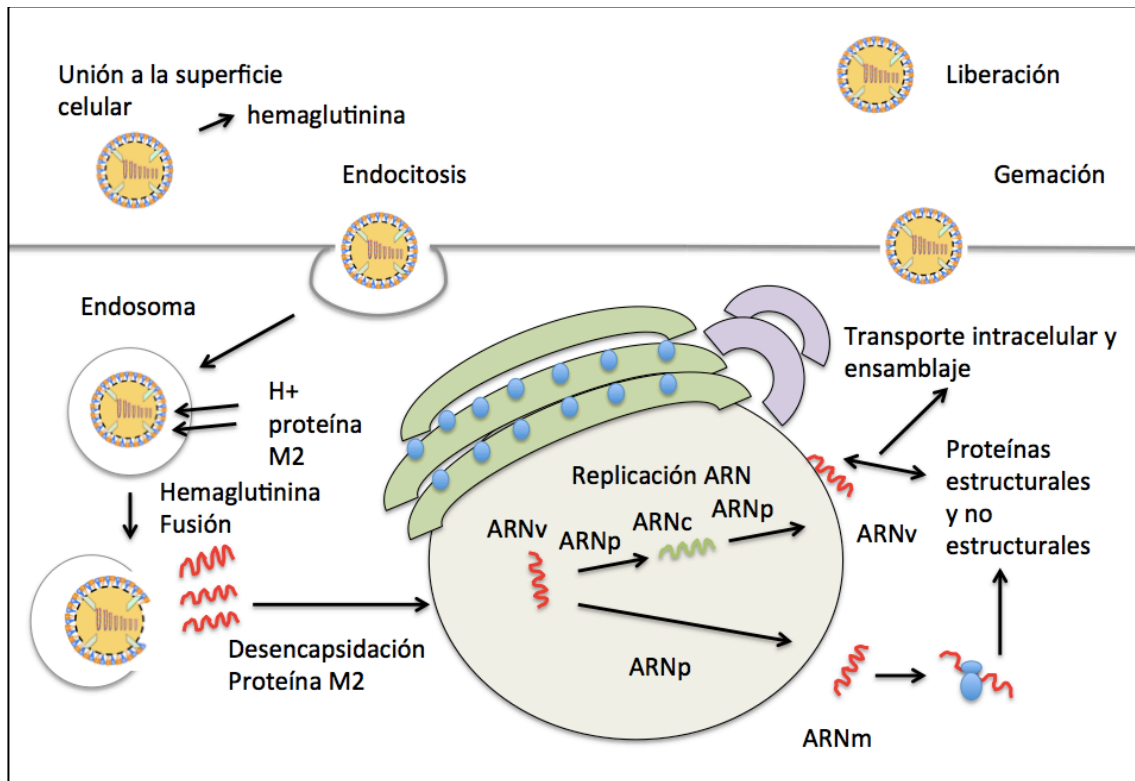


Figura 2: Ciclo infeccioso del Virus de la gripe. Adaptado de: Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica, 13e. Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann. ARNm: ARN mensajero. ARNv: ARN de polaridad negativa, ARNp: ARN polimerasa, ARNc: ARN complementario de longitud completa

### 1- Adsorción de virus y endocitosis

Después de unirse al receptor, el virus de la gripe es interiorizado formando vesículas en los puntos de adsorción. El principal mecanismo es la endocitosis mediada por clatrina. Se produce una acidificación de la vesícula endocítica en el trayecto al interior de la célula por la entrada de protones desde el endosoma al interior de la partícula, a través de los canales iónicos formados por la proteína M2. Esto produce cambios conformacionales en la HA, que

se vuelve susceptible a la digestión de proteasas, rompiendo el puente disulfuro que une las subunidades HA1 y HA2. La bajada de pH también produce la desestabilización de las interacciones entre las RNPs y la proteína M1. Como consecuencia las RNPs, se liberan en el citoplasma de la célula<sup>25</sup>.

## **2- Síntesis de ARN mensajero y replicación del ARN viral**

Los complejos de ribonucleoproteínas se translocan al núcleo mediante la interacción entre la maquinaria de transporte celular y las secuencias de localización nuclear (NLS) en la proteína NP donde se transcribirán y replicarán<sup>26</sup>. Una vez en el núcleo, el ARN genómico de polaridad negativa (ARN<sub>v</sub>) se utiliza como plantilla para la síntesis de dos clases de ARN de polaridad positiva: ARN mensajero (ARN<sub>m</sub>) y ARN complementario de longitud completa (ARN<sub>c</sub>)<sup>27</sup>. Por ello, durante la transcripción, la polimerasa viral multimérica interactúa con la polimerasa II del huésped. El siguiente paso es la copia de ARN<sub>v</sub> desde ARN<sub>c</sub>, que se ensambla con nuevas moléculas de NP y polimerasa, produciendo nuevas RNPs, que son exportados al citoplasma gracias a la acción de la proteína exportadora nuclear (NEP) y M1<sup>28</sup>.

## **3- Traducción y procesamiento post-traduccional de las proteínas del virus**

Los ARNs mensajeros virales migran al citoplasma donde se asocian preferentemente a la subunidad 40S del ribosoma en el proceso de iniciación de la traducción. Estas interacciones permiten el establecimiento de un proceso de iniciación de traducción viral que competiría con la traducción de los RNA mensajeros celulares. La NA y HA son postranccripcionalmente modificados en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi y posteriormente incorporados en las balsas lipídicas<sup>17</sup>.

## **4- Ensamblaje y liberación de virus desde las células.**

Parece que el ensamblaje tiene lugar en las balsas lipídicas. Los viriones se producen por gemación desde la membrana plasmática. Por tanto, es necesario que los diferentes componentes estructurales del virus (las RNPs, las proteínas M1, NEP y las proteínas de la



envoltura) confluyan en un mismo punto de la membrana plasmática. Para la liberación de los viriones es muy importante una acción equilibrada entre la HA, que se une a los receptores de ácido siálico de la membrana celular y la NA que rompe dicha unión para su liberación<sup>29</sup>.

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS INFLUENZA

El virus de la gripe A puede infectar un amplio espectro de especies animales. Estos se clasifican en subtipos en función de las combinaciones de dos proteínas de su superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Hasta la fecha se ha identificado 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA circulando en animales y seres humanos. Recientemente se han descubierto dos subtipos nuevos en murciélagos (H17N10 y H18N11)<sup>30</sup>. Los análisis filogenéticos demuestran una larga asociación del virus con este huésped y proponiéndolo como un nuevo reservorio del virus de la gripe. Sin embargo hasta el momento, los resultados de estos estudios siguen indicando que es muy poco probable que los virus de la influenza en murciélagos se realinien con otros virus de la influenza para crear virus nuevos potencialmente más peligrosos o infecciosos<sup>31</sup>.

El virus de la gripe A tiene una marcada capacidad para sufrir variaciones en sus antígenos, sobre todo superficiales, con gran repercusión desde el punto de vista epidemiológico. Existen dos grupos de variaciones: las variaciones menores y mayores. Las variaciones menores (*antigenic drift*) afectan sobre todo a la HA y suponen la aparición de una nueva cepa frente a la cual la población tiene sólo una inmunidad parcial por exposiciones anteriores a las cepas originarias. Con el cambio gradual de los antígenos superficiales surge una serie de nuevas variantes, cada una diferente de su predecesora y más alejada del subtipo inicial, pero conservándose éste. Los casos de gripe que se presentan estacionalmente, en forma esporádica o en brotes epidémicos, están producidos por las variantes menores. Las variaciones mayores (*antigenic shift*) suponen un cambio total en el antígeno HA, NA o ambos, frente al cual la población no tiene inmunidad. Las pandemias gripales ocurren generalmente como consecuencia de la aparición de un nuevo subtipo del virus de la Gripe A por una variación mayor. Estas proteínas virales pueden ser introducidas en la población humana a través del intercambio de segmentos génicos de virus humanos, aviáres y/o porcinos, durante la coinfección con múltiples cepas de virus en individuos o directamente desde virus aviáres o porcinos que adquieren la capacidad de infectar humanos<sup>32</sup>.

Las pandemias de gripe son acontecimientos impredecibles pero recurrentes que pueden tener consecuencias sanitarias, económicas y sociales en el mundo entero. Las pandemias de gripe se producen por la convergencia de dos factores clave: la aparición de un virus de la gripe nuevo o una de origen zoonótico capaz de causar una transmisión sostenida de persona a persona, y la escasa o nula inmunidad de la población frente a ese virus. Con el aumento del comercio mundial y los viajes, una epidemia localizada puede convertirse rápidamente en una pandemia, que deja poco tiempo para preparar una respuesta de salud pública<sup>8</sup>. Los subtipos actualmente circulantes en el ser humano son el A(H1N1) y el A(H3N2). El A(H1N1) también se conoce como A(H1N1)pdm09, pues fue el causante de la pandemia de 2009 y posteriormente sustituyó al virus de la gripe estacional A(H1N1) que circulaba hasta entonces. Los virus de tipo B no se clasifican en subtipos, pero los circulantes actualmente pueden dividirse en dos linajes B/Yamagata y B/Victoria. Los virus de tipo C se detectan con menos frecuencia y suelen causar infecciones leves, por lo que carecen de importancia desde el punto de vista de la salud pública. El cuarto género es de descripción más reciente se ha denominado “Virus Togoto” y el quinto género por los Isavirus<sup>8</sup>.

La última pandemia de influenza tuvo lugar en marzo de 2009, pero no fue hasta junio de 2009 que la Organización Mundial de la Salud (OMS) elevó el nivel de alerta de pandemia a su nivel más alto, que indica una transmisión comunitaria generalizada en al menos dos regiones diferentes de la OMS. La pandemia se declaró terminada en agosto de 2010 . Fue causada por el virus de la influenza A H1N1 que representa una reagrupación cuádruple de cuatro cepas diferentes de influenza de porcina, aviar y humana y que no se había reconocido antes en humanos ni en cerdos<sup>33</sup>. El virus H1N1pdm09 era muy diferente de los virus H1N1 que circulaban en ese momento; por consiguiente, las vacunas contra la influenza estacional ofrecieron poca protección cruzada contra la infección por el virus H1N1pdm09. A diferencia de las típicas epidemias en las cuales el mayor porcentaje de muerte se produce en personas mayores de 65 años, durante la última calcularon que el 80 % de muertes se dio en menores de 65 años. Los datos confirman la presencia de algún nivel de anticuerpo de reacción cruzada en personas de más de 60 años y la falta de dicho anticuerpo en niños y adultos<sup>34</sup>.

### 1.3. PAPEL DE LA RESPUESTA DEL HUÉSPED A LA INFECCIÓN POR VIRUS DE LA INFLUENZA

La primera línea de defensa frente a los agentes infecciosos es el sistema inmune innato esencial para el control de abundantes infecciones. Sin embargo, no siempre consiguen eliminar al agente infeccioso, y existen gérmenes que no son capaces de reconocer. Las células del sistema inmune innato inician y dirigen a la respuesta adaptativa con el objetivo de neutralizar al agente agresor. Al mismo tiempo se debe generar una respuesta antiinflamatoria compensatoria y un proceso de reparación del daño tisular. Si esta respuesta sobrepasa el ámbito local se convierte en una reacción sistémica con resultados catastróficos. La sepsis es la respuesta inflamatoria no controlada inducida por la infección. A este proceso genérico se añaden características del germen y del huésped que condicionan de forma individualizada la manifestación de la sepsis. Por unos mecanismos no aclarados totalmente, se producen una serie de alteraciones celulares que desembocan en el fallo de los distintos órganos y que constituyen la base de la disfunción orgánica, fundamento del concepto actual de la sepsis en la conferencia consenso Sepsis-3. En la figura 3 se esquematiza la respuesta inmune frente al virus de la gripe que se desarrollará en los siguientes puntos.

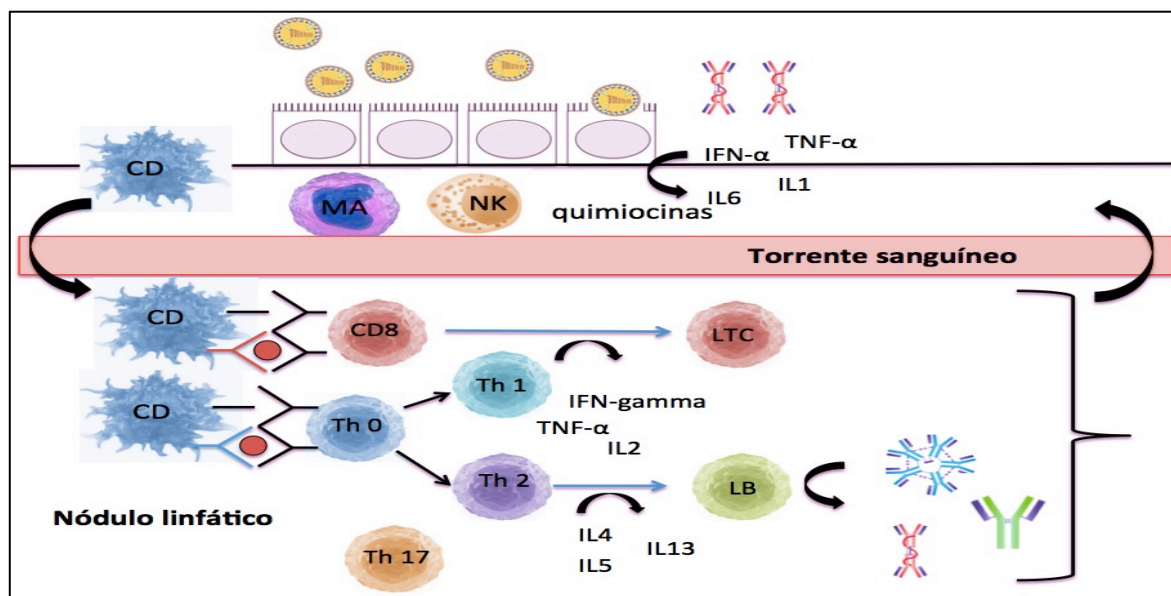


Figura 3. Esquema resumen de la respuesta inmune al virus de la gripe.

### 1.3.1. Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato se activa inicialmente ante la invasión del organismo por agentes patógenos. Este elimina los microorganismos en cuestión de minutos o de horas por mecanismos de defensa que no requieren inducción prolongada. La inmunidad innata se encuentra constituida por barreras físicas y químicas, por células como los integrantes del sistema mononuclear fagocítico (SMF), los polimorfonucleares neutrófilos, las células linfoides innatas (CLIs) como las células de la mucosa asociados invariantes T(MAIT), las células T<sub>gd</sub>, y su representante más conocido, los Natural Killers (NK); proteínas efectoras circulantes como el sistema del complemento, proteína C reactiva (PCR) y lectinas de unión a manosa y diversas citocinas. Este es el sistema filogenéticamente más primitivo y es compartido por la mayoría de los organismos pluricelulares. De inicio inmediato, su respuesta a los agentes patógenos va a ser elaborada desde la primera exposición de forma estereotipada e inespecífica y no confiere inmunidad a largo plazo. Dado que existe un retraso de 4-7 días antes de que la respuesta adaptativa sea ejecutada, la respuesta innata desempeña un papel crucial para controlar la infección durante dicho periodo. Además, si fuera necesario, posee un papel fundamental en la activación y mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa. Mientras que el sistema inmunitario adaptativo utiliza un amplio repertorio de receptores codificados por reordenamiento de genes para reconocer una enorme variedad de antígenos, la inmunidad innata depende de receptores codificados por la línea germinal, que reconocen características comunes a muchos de los agentes patógenos. A pesar de su inespecificidad el sistema innato, al igual que el adaptativo, es capaz de distinguir entre lo propio y lo no propio (tolerancia inmunológica)<sup>35</sup>.

Diferentes estructuras moleculares como los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o los productos endógenos procedentes de tejidos dañados (alarminas) son reconocidos a través de moléculas del huésped denominadas receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), cuyo representante más notable la familia Toll like receptors (TLR). Se ha propuesto que diferentes polimorfismos de

estos pueden explicar por qué ciertos individuos son más susceptibles a la producción del fenómeno de la tormenta de citoquinas que otros<sup>36</sup>.

El virus de la influenza (IAV) se replica en la mucosa respiratoria, principalmente en las células epiteliales respiratorias que producen grandes cantidades de viriones, que luego infectarán los macrófagos alveolares y las células dendríticas. El tracto respiratorio contiene varias moléculas bioactivas, que normalmente son efectivas ante pequeñas noxas como irritantes e infecciones de bajo nivel. Ante noxas más potentes como el virus de la gripe A, las células del tracto respiratorio responden movilizándolo al sistema inmune e induciendo una respuesta más poderosa y efectiva<sup>37</sup>.

Tras la infección por el IAV dos PRRs reconocen el ARN vírico y productos transcripcionales en el citoplasma de células infectadas: el gen inducible por ácido retinoico (RIG I) y el factor asociado a la diferenciación del melanoma (MIDA5). Tras la unión con su ligando permite la activación de proteínas adaptadoras que culminan en la activación de factores de transcripción como el factor regulador del interferón 3 (IRF3) y 7 (IRF7) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB). Tras la translocación de estos factores al núcleo inician la transcripción de genes que codifican IFN y citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 6 (IL6) o 1 beta (IL1 $\beta$ )<sup>38</sup>.

Los TLR pueden situarse desde la superficie de la células (tipos 2,4,5 y 6), donde reconocen patrones moleculares de bacterias, hongos y protozoos o en el interior de las células, en la superficie de endosomas y lisosomas (tipos 3, 7, 8 y 9) reconociendo ácido nucleico ajeno<sup>39</sup>. En relación a la infección por IAV, los TLR tipos 3, 7 y 8 están involucrados en el reconocimiento del ARN viral<sup>40</sup>. La estimulación de los TLR conlleva la producción de interferón tipo I (IFN alfa , beta, kappa, epsilon y limitina) y III (lambda 1, 2 y 3). Estos al interactuar con sus respectivos receptores desencadenan la transcripción de genes estimulados por IFN (ISGs)<sup>41</sup>. El producto de los ISGs forman parte de la primera línea de defensa antiviral, teniendo como diana diferentes pasos del ciclo vital del IAV, y modulando la transición a la inmunidad

adaptativa. Un ejemplo de ellos son: limitar la replicación y propagación del virus degradando el ARN celular y vírico (ISG OAS), inhibiendo la maquinaria de traducción celular (ISG PKR), interfiriendo con la transcripción primaria en el núcleo (ISG Mx1), y limitando las actividades postraduccionales (ISG MxA) e interacción con el complejo de polimerasa viral, que lleva al bloqueo de la replicación de virus (ISG Mx1 y MxA)<sup>37</sup>. El receptor del interferón de tipo III o IL-28R se encuentra en pocas células, razón por la que se ha postulado que ratones con alteración en esta vía tengan una atenuación leve en la respuesta contra el virus<sup>42</sup>. El grado de activación difiere de un tipo a otro de influenza, siendo las infecciones graves, por ejemplo de H1N5 caracterizada por una secreción deficiente de IFN y una respuesta inmune alterada<sup>43</sup>.

También cabe destacar la activación de receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), como la criopirina (NLRP3), que activa inflamomas en macrófagos, monocitos, neutrófilos y células epiteliales pulmonares para desencadenar la liberación y activación de citoquinas pro IL1B y pro IL18<sup>44</sup>.

Las células epiteliales de la vía aérea producen la primera ola de citoquinas desencadenando la inflamación local y sistémica. Las primeras citocinas liberadas son: IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL1 e IL6. Estas citocinas son los responsables de los síntomas sistémicos asociados a la infección como la fiebre y anorexia. Además de producir moléculas antivirales, también producen moléculas quimiotácticas y de adhesión que permiten el rápido reclutamiento de células efectoras innatas, como las células dendríticas (CDs), NK, y monocitos, activándolos en el lugar de infección para eliminar al virus y a las células infectadas<sup>37</sup>.

Los macrófagos activados actúan fagocitando a las células infectadas y participan en la activación de la inmunidad adaptativa. Las células epiteliales infectadas atraen a la zona de infección a monocitos circulantes y macrófagos a través de la interacción entre la quemocina CCL-2 y su receptores universal, CCR2, expresadas en variedad de células inmunes. El receptor CD200 (CD200R) en macrófagos interactúa con CD200 expresado en el epitelio alveolar y regula a la baja la respuesta inflamatoria, incluida la inhibición de la expresión de IL-6 y TNF $\alpha$  por macrófagos<sup>45</sup>.

Las células NK son también importantes en la eliminación de células infectadas. Pueden reconocer las células infectadas por el virus de la influenza y lisarlas mediante la unión de antígenos como la hemaglutinina a sus receptores NKp44 y NKp46 por antígenos unidos a anticuerpos, un proceso llamada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo<sup>46</sup>. Se ha propuesto que el virus de la gripe previene el reconocimiento de estos receptores de la HA gracias a la utilización de la NA<sup>47</sup>. Las células NK regulan las respuestas inmunes innatas y adaptativas mediante la rápida secreción de citoquinas, la regulación positiva de CD40 y la activación de células dendríticas<sup>48</sup>.

Otras moléculas importantes son la IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) -1, principales factores quimiotácticos para los neutrófilos y los monocitos, respectivamente.<sup>45</sup>

### **1.3.2. Transición a la respuesta inmune adaptativa**

Las células presentadoras de antígenos son las células encargadas de enlazar la respuesta inmune innata inicial y la adaptativa, un tipo de célula fundamental en el inicio de la inmunidad robusta contra el IAV<sup>49</sup>. En el caso del sistema respiratorio, las células dendríticas (CD) son las células especializadas presentadoras de antígeno. Estas se encuentran chequeando constantemente la presencia de patógenos invasores. Tras la infección con IAV, las CD pueden infectarse o fagocitar células infectadas por IAV. La respuesta inmune adaptativa comienza cuando los linfocitos T naïve y de memoria reconocen los antígenos virales presentados por las CD<sup>50</sup>. Para ellos, las CDs migran de los pulmones a los ganglios linfáticos a través de la interacción entre CCR7 y su ligando CCL19 y CCL21<sup>51</sup>.

En el ganglio linfático, las CD presentan antígeno del IAV a las células T CD4 + y CD8 +. Las CD autoinfectadas degradan la proteína viral en péptidos inmunitarios (epítopos) en el citosol y se exportan al retículo endoplasmático, donde se unen a la molécula del complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHCI). Posteriormente se transporta a la membrana celular a través del complejo de Golgi para su reconocimiento por las células T citotóxicas CD8 + (LCT). Sin embargo, las proteínas virales exógenas degradadas en endosomas / lisosomas están asociados con moléculas MHC de clase II. Estos complejos se presentan en la membrana



celular para su reconocimiento por las células CD4 + T helper (Th). Este proceso lleva a la proliferación y maduración de las células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos<sup>52</sup>.

### **1.3.3 Respuesta inmune adaptativa en la infección por influenza**

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por su especificidad y por contar con un mecanismo de memoria por el cual, ante un segundo encuentro con el mismo desafío, la respuesta es más rápida y eficaz. Además juega un importante papel en el aclaramiento viral y la recuperación de la homeostasis del huésped. Utiliza un amplio repertorio de receptores codificados por reordenamiento génicos que reconocen una amplia variedad de antígenos. Sus componentes celulares son los linfocitos T y B<sup>53</sup>.

Las células T CD8 + citotóxicas desempeñan un papel crucial en la protección de contra el virus de la gripe tanto en humanos como en modelos animales. Las células T CD8 + limitan la replicación viral y promueven la eliminación de células infectadas cuyo reconocimiento depende de la presentación de péptidos virales por moléculas MHC-I. Si bien la inmunidad mediada por anticuerpos es principalmente específica de la cepa y puede prevenir la infección, las células T (especialmente las células T CD8 +) proporcionan una inmunidad celular de reacción cruzada amplia contra diferentes virus de la influenza, gracias a la alta conservación de los epítomos y, por lo tanto, pueden disminuir la gravedad de la enfermedad. Idealmente, se requieren estrategias de vacunación que induzcan respuestas de células T de protección cruzada<sup>54</sup>.

Tras la infección por el virus de la gripe, las LCT son activadas en los tejidos linfoides y reclutadas en el lugar de la infección. Existen diferentes cofactores que estimulan su diferenciación hacia LCT como el IFN I, IFN gamma, IL2 e IL12. La disminución de la expresión de CCR7 y el aumento de la expresión de CXCR3 y CCR4 permite su migración hacia el pulmón. Su actividad lítica está mediada por la liberación de perforina y granzimas. Existe además una acción no citolítica de las granzimas, disminuyendo la replicación del virus

de la gripe mediante la escisión de proteínas involucradas. Además, producen citoquinas que mejoran la presentación de antígenos al estimular la expresión de MHC<sup>55</sup>.

Las células CD4 desempeñan un papel importante en la promoción de respuestas óptimas de células T CD8 + y células B durante la infección por gripe. Dependiendo del tipo de estimuladores, como antígenos, moléculas coestimuladoras, y citoquinas secretadas por los CPA, células epiteliales y células inflamatorias se desarrollará una respuesta preferentemente humoral o citotóxica, aumentando la diferenciación a células T colaboradoras (Th) de tipo 1, o 2. Las células T CD4 + también pueden diferenciarse en Th17, células T reguladoras (células Treg) y células T foliculares auxiliares<sup>56</sup>. Los Th1 expresan citoquinas antivirales como IFN gamma, TNF e IL2, aumentando la proliferación y activación de linfocitos T CD8+ y macrófagos activados<sup>57</sup>. Los linfocitos Th17 regulan la inmunidad celular contra el virus de la gripe y las células T reguladoras (Treg) modulan la respuesta inmune como mecanismo de prevención del daño tisular<sup>58</sup>. Las células TH2 producen IL-4, 5 y 13 para activar los linfocitos B. La célula B evolucionarán hacia una célula plasmática productora de anticuerpos.

Los principales isotipos de anticuerpos en la respuesta humoral específica al virus de la gripe son las inmunoglobulinas (Ig) A, M y G. Los anticuerpos IgA de la mucosa se producen localmente en los órganos linfoides asociados a la nasofaringe y tracto respiratorio inferior (NALT y BALT), donde las CPA interaccionan con linfocitos T y B, resultando en el desarrollo de precursores de células formadoras de IgA, que migrarán vía hematogena hacia los pulmones donde se diferencian en IgA-AFC secretora de anticuerpos virales. La acción de la IgA es fundamental como primera barrera para evitar que el virus atraviese la mucosa<sup>45</sup>. Las IgA en suero se producen rápidamente después de la infección por el virus de la influenza y la presencia de estos anticuerpos es indicativa de una infección reciente por el virus de la influenza. Las vacunas por vía cutánea inducen fundamentalmente la producción de IgG pero solo la nasal induce también la producción de IgA secretora<sup>59</sup>. Los anticuerpos séricos del subtipo IgG producen protección duradera y neutralizan al patógeno fundamentalmente mediante opsonización y activación del complemento. Los anticuerpos IgM complementan la

neutralización del virus de la gripe y son las secretadas en mayor cantidad en la infección primaria<sup>55</sup>.

Algunas células B se convertirán en células B de memoria que fabricarán anticuerpos de subtipo IgG de mayor afinidad durante la respuesta inmunitaria secundaria. La existencia de anticuerpos previos puede detectar epítomos antigénicamente similares, frenando la infección más rápidamente, fenómeno denominado como inmunidad heterosubtípica<sup>60</sup>. Este fenómeno podría explicar por qué la pandemia de 2009 fue más virulenta en pacientes menores de 65 años, ya que los mayores de esa edad podrían haber estado en contacto con cepas con variantes menores derivadas del virus H1N1 responsable de la “Gripe Española”, habiendo creado anticuerpos con reactividad heterosubtípica cruzada frente a la nueva cepa<sup>61</sup>. Existen también linfocitos TCD4 y TCD8 de memoria que se diferencian a partir de linfocitos T vírgenes y efectores durante la respuesta primaria. Estos permanecerán circulando en la sangre y tejidos linfoides, generando una respuesta más eficiente ante una infección secundaria<sup>62</sup>. Estos responden ante epítomos de proteínas víricas como la proteína M, NP etc, por lo que otorga también una inmunidad heterosubtípica<sup>63</sup>. La estimulación de este tipo de inmunidad también es un objetivo de las vacunas contra la gripe<sup>64</sup>.

La producción de una respuesta humoral con anticuerpos neutralizantes y TCD8 específica tras una infección natural o la vacuna es máxima tras varias semanas pero transitoria, disminuyendo progresivamente, por ello es importante la campaña vacunal y de prevención cada epidemia estacional<sup>65</sup>.

## 1.4. INMUNOPATOLOGÍA EN LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INFLUENZA

### 1.4.1. Repercusiones clínicas

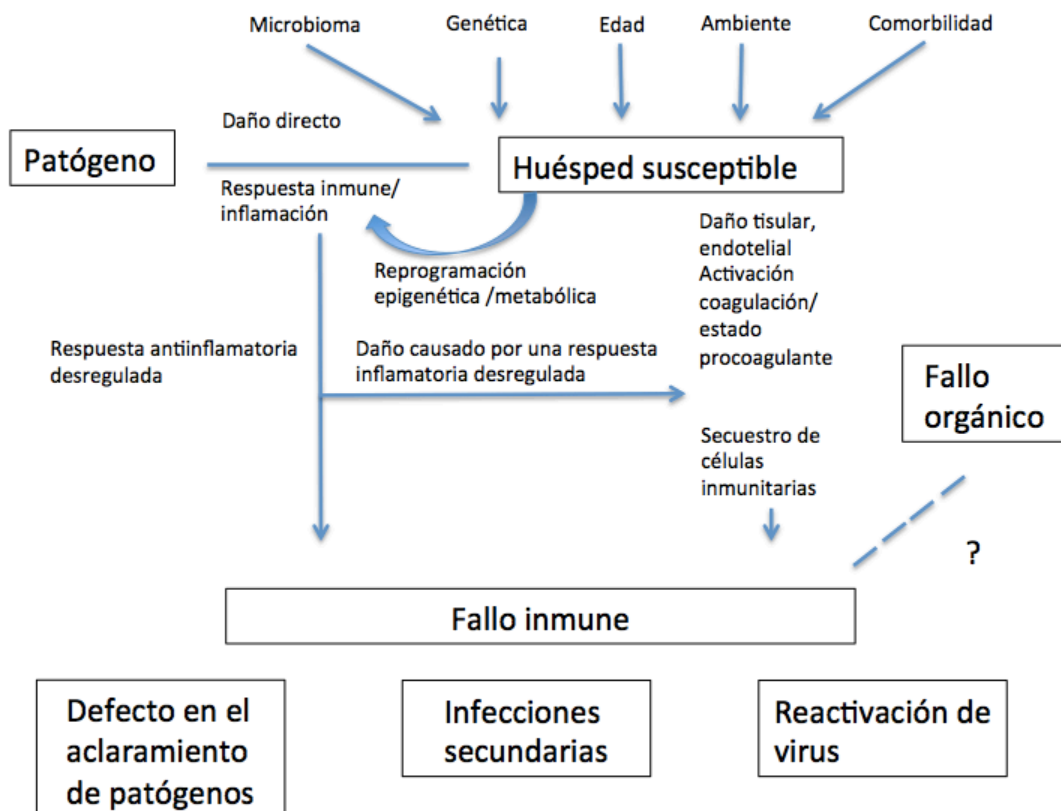
El virus de la gripe es responsable cada año de una morbilidad elevada, sin embargo, como en la mayor parte de la población produce una enfermedad banal, es percibida como una enfermedad benigna. En determinadas poblaciones susceptibles como embarazadas e inmunocomprometidos, pueden desarrollar complicaciones graves que causa un exceso de mortalidad no solo durante las pandemias, también durante la gripe estacional.<sup>66</sup> Las epidemias de gripe estacional suponen aproximadamente 290.000-650.000 muertes respiratorias anualmente, aunque parece ser mayor porque habitualmente no incluyen muertes por otras causas asociadas, como el fallo cardíaco. La patogenia de la infección por el virus de la influenza depende de la virulencia viral y la respuesta del huésped.<sup>67</sup>

El virus de la influenza afecta el tracto respiratorio de forma directa o indirecta a través de la respuesta inflamatoria generada. Esta inflamación puede propagarse sistémicamente aunque generalmente queda restringido a un compromiso pulmonar y una afectación respiratoria severa. La incapacidad del pulmón para realizar su función primaria de intercambio de gases es el resultado de múltiples mecanismos, incluida la obstrucción de las vías respiratorias, la pérdida de la estructura alveolar, la pérdida de integridad del epitelio pulmonar por la muerte directa de células epiteliales y degradación de la matriz extracelular crítica. La exposición de citocinas y antígenos virales al endotelio puede amplificar la inflamación, ya que el endotelio es una fuente importante de citoquinas proinflamatorias<sup>68</sup>.

Este espectro de manifestación puede ser desde un síndrome gripal banal hasta un shock-séptico y fallo multiórgano. Aproximadamente un 30-40% de los pacientes hospitalizados por gripe, desarrollarán una neumonía aguda. Estos pacientes también tienen mayor riesgo de sufrir una infección secundaria bacteriana, frecuentemente por *S. Pneumoniae* y *S. Aureus*. La neumonía primaria por influenza se caracteriza por una persistencia o empeoramiento de los

síntomas, mientras que la neumonía bacteriana secundaria aparece 1-3 semanas como una “recaída” después de los síntomas gripales iniciales. La coinfección bacteriana suele ocurrir unos días después del inicio de la enfermedad. El virus de la Influenza A es además la causa más frecuente de ARDS en el adulto. Por otro lado, al igual que predispone a una neumonía bacteriana secundaria también incrementa el riesgo de progresión a una sepsis bacteriana secundaria. En muchos casos la infección por el virus de la gripe está subestimada por los clínicos que sólo reparan en ella cuando existe clínica típica y un pico epidémico. Por ello es recomendable que, particularmente durante la temporada de invierno, se incluya el diagnóstico de la influenza no solo en pacientes con síntomas y epidemiología típicos, sino también en pacientes con neumonía severa, SDRA y sepsis con o sin coinfección bacteriana.<sup>68</sup>

La respuesta inmune generada tras la infección por gripe es muy importante en el control de la infección, sin embargo, puede determinar también el desarrollo de un exceso de inflamación y enfermedad. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria aberrante, condicionada por el estado basal del huésped o inducida por el germen, está asociada a una respuesta excesiva, que facilita el desarrollo de una neumonía primaria, daño pulmonar agudo, superinfección bacteriana, así como afectación sistémica (figura 4). En los siguientes apartados se repasarán diferentes aspectos de la respuesta inmunitarias así como del huésped que pueden influenciar en esta respuesta aberrante<sup>69</sup>.



**Figura 4:** Eventos clave en la inmunopatología de la sepsis

Adaptado de Rubio I, Osuchowski M, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler M, Lachmann G et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(12):422-436.

#### 1.4.2. El papel de la inmunidad en la respuesta del huésped a la infección

El espectro de las manifestaciones clínicas está determinada por la respuesta inflamatoria e inmune secundaria a la infección. En la infección leve, el huésped tiene una resistencia limitada o moderada, por lo que después de la respuesta inmune inicial, la homeostasis alterada se restaura rápidamente. Sin embargo, en infecciones causadas por serotipos más agresivos como la H1N1 o H5N1, se acompañan de una respuesta inflamatoria agresiva, siendo el organismo incapaz de restaurar la homeostasis. Esta combinación a menudo lleva a la llamada “tormenta de citoquinas” que se correlaciona directamente con la lesión del tejido y el pronóstico desfavorable de estos pacientes<sup>70</sup>.

Tanto las células infectadas como las células inmunitarias activadas son las encargadas de la liberación de las moléculas inflamatorias. La familia del interferón (IFN) tiene un papel crítico en la respuesta inmune innata a los virus. Estos se secretan después del reconocimiento de células infectadas. Tras la unión del IFN con sus receptores, se activa la vía de señalización de IFN, aumentando la expresión de genes estimulados por el IFN relacionados con proteínas con propiedades antivirales o inmunomoduladoras. Existen tres tipos de IFN: IFN I (IFN- $\alpha$  y IFN- $\beta$ ), IFN II (IFN- $\gamma$ ) y IFN III (IFN- $\lambda$ ). El tipo I y III aumenta tras la infección vírica inicial y son liberados fundamentalmente por células dendríticas y macrófagos. Por su parte, el IFN II es secretada por NK y linfocitos T activados.<sup>71</sup> Aunque la vía de señalización del IFN es importante para restringir la diseminación de los virus se ha observado en ratones infectados con virus H5N1 que la sobreproducción de IFN en etapas temprana de la infección conduce a un daño pulmonar irreversible<sup>70</sup>.

El TNF $\alpha$  es una de las primeras citoquinas liberadas al torrente sanguíneo. Produce una sintomatología muy parecida al shock séptico tras ser inyectado y los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  inyectados en animales los protegen de la muerte derivada de la sepsis.<sup>72</sup> Se va a unir a receptores en la superficie celular denominados receptores para TNF (TNFR1 y 2) que se encuentran en la mayoría de las células. Van a inducir la actividad microbicida de los monocitos, incremento de la producción y migración de PMN, activación de la coagulación y del complemento, alteración del tono vascular y aumento de la permeabilidad, aumento del catabolismo proteico y la gluconeogénesis<sup>73</sup> entre otros, que dan lugar a sintomatología típica de los pacientes sépticos como fiebre, diarrea, acidosis metabólica, neurotoxicidad, caquexia y CID<sup>74</sup>.

Sinérgicamente con el TNF actúa la IL1. Existen dos tipos de IL1, alfa y beta, que comparten actividad biológica y su secreción está regulada a través de la formación del inflamasoma NLRP3.<sup>75</sup> Durante la infección por el virus de la influenza, se ha demostrado que IL1 $\beta$  media en la patología inflamatoria pulmonar aguda.<sup>76</sup> Curiosamente, la administración de un inhibidor de NLRP3 (bloqueando la maduración de IL1 $\beta$  y IL18) durante la infección por influenza sugirió que la IL1 $\beta$  puede promover la recuperación cuando se administra en fases iniciales de

la infección, pero está asociada con una respuesta inflamatoria perjudicial, daño tisular y mortalidad cuando se administra en etapas tardías de la infección. Por lo tanto, la inducción temprana de IL1 $\beta$  por el virus protege a los huéspedes infectados al promover la actividad de las células T CD8 y las respuestas de anticuerpos, pero tiene consecuencias negativas si se mantiene durante toda la respuesta.<sup>77</sup>

La IL6 es una de las primeras citocinas liberadas. Se considera proinflamatoria y en diversos estudios clínicos se ha correlacionado con la severidad en pacientes con infección por virus de la gripe A. Sin embargo, los estudios en modelos animales indican su papel protector en este tipo de infecciones.<sup>77</sup> En pacientes reumatológicos tratados con Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal anti IL6, se ha observado que la inhibición de IL6 reduce la inflamación asociada con la infección así como sus síntomas durante la gripe.<sup>78</sup>

La IL17 parece que juega un papel importante en la respuesta inmune antiviral efectiva, sin embargo, podría estar implicada en la exacerbación de la inflamación pulmonar e inmunopatología asociada a la gripe.<sup>79</sup> Es secretada fundamentalmente por células Th17 y Tc17. En modelos animales se ha observado protector frente a la infección por Influenza<sup>80</sup> modulando la respuesta de linfocitos B en infecciones por H1N5 y H1N1<sup>81,82</sup> En otros sin embargo, se ha relacionado con el daño pulmonar mediado por el H1N1.<sup>83,84</sup> En humanos, tras el estudio de los niveles de citoquinas en 27 pacientes críticos con infección por H1N1, observaron que niveles altos de IL17 se asociaba a un aumento de la probabilidad de supervivencia.<sup>235</sup>

En respuesta a los estímulos inflamatorios como C5a, TNF-alfa, IL-1 o IL-6, se activa la fosfolipasa A2 que genera ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de membrana. El AA puede seguir dos vías de metabolización, la cicloxigenasa (COX) que estimula la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, y la lipoxigenasa (LO), responsable de la producción de leucotrienos. COX y NOS son dos de las enzimas principales que median la disfunción cardiovascular y contribuyen, junto con LO a la progresión al fallo multiorgánico en el paciente séptico.<sup>85</sup> También aumenta la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), inhibiendo la fibrinólisis, además de liberar citoquinas que inhiben la expresión de la



trombomodulina (TM), factor importante para la activación de proteína C (inactiva factores procoagulantes) y la disminución de la actividad procoagulante de la trombina.<sup>86</sup>

Los monocitos, macrófagos y neutrófilos son las células principales reclutadas en el espacio alveolar y son necesarias para el aclaramiento viral. La alteración de la función celular de estas células se han relacionado con el mal pronóstico en los pacientes con infecciones por gripe A. La apoptosis tardía y la respuesta prolongada de los neutrófilos se asocian con una mayor lesión orgánica, incluido el SDRA, y una menor supervivencia.<sup>87</sup> Tanto el receptor 1 de la muerte celular programada (PD-1) como los receptores de adenosina parecen desempeñar un papel importante<sup>88,89</sup> Las ROS liberadas por los neutrófilos son parte de la retroalimentación positiva de la respuesta inflamatoria y causa disfunción tanto endotelial como mitocondrial que contribuye al proceso de fallo multiorgánico. La disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos ha demostrado ser un predictor de infección nosocomial en pacientes con sepsis.<sup>90</sup>

Diversas quimiocinas liberadas parecen estar relacionadas con la severidad de la enfermedad por IAV. Se ha descrito niveles anormalmente elevados de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP1) en casos fatales de IAV. Por otro lado, se ha observado que los ratones carentes de MIP-1 exhiben una disminución del aclaramiento viral, pero al mismo tiempo una reducción de la mortalidad y el daño pulmonar. Las células epiteliales infectadas atraen a la zona de infección a monocitos circulantes y macrófagos a través de la interacción entre la quimocina CCL-2 y sus receptores CCR5 y CCR2. En estudios animales se ha observado que los ratones CCR5<sup>-/-</sup> muestran una respuesta inflamatoria excesiva y una mayor mortalidad, mientras que los ratones CCR2<sup>-/-</sup> mostraron una disminución de la respuesta inflamatoria y la mortalidad, pero con una carga viral significativamente más elevada.<sup>91</sup>

Los linfocitos T, tanto CD4 y CD8, tienen un papel importante en el aclaramiento viral pero también en su inmunopatología. Se puede desencadenar una lesión pulmonar letal mediante la transferencia de células T CD8 específicas de antígeno a ratones transgénicos que expresan el antígeno HA de la gripe. Sin embargo, no se desencadena dicha lesión en aquellos con defectos en la respuesta de crecimiento temprano epitelial 1 (Egr-1), un regulador crítico en el desarrollo

de las células T CD8. Esto explica que la enfermedad respiratoria grave de la influenza a menudo se caracteriza por la liberación temprana de citocinas de tipo Th1 y Th17, pudiendo ser diana de tratamientos inmunomoduladores.

La respuesta antiinflamatoria reactiva se basa en la liberación de citoquinas inhibitoras como TGF- $\beta$ , IL4, IL10, IL11, IL13 entre otras y sus receptores específicos así como antagonistas de receptores solubles de las citoquinas proinflamatorias.<sup>93</sup> Una profunda y mantenida respuesta antiinflamatoria puede llevar al paciente a un estado de profunda inmunosupresión, e incluso a la anergia.<sup>94</sup> La inmunoparálisis, como algunos se refieren a esta última situación, deja al paciente séptico a merced de infecciones nosocomiales banales para la mayoría de los inmunocompetentes. El desequilibrio en la respuesta de tipo Th1/Th2 relacionada con la presencia de IL-2 y IL-4 respectivamente, juega un papel importante en la fisiopatología de la tormenta de citoquinas o anergia respectivamente.<sup>95,96</sup>

En general, las estrategias terapéuticas para tratar la sepsis se han centrado en inhibir la fase hiperinflamatoria temprana. Sin embargo, es evidente que existe un estado de supresión inmune concomitantemente al estado inflamatorio que parece tener un papel importante en la inmunopatología, el desarrollo de infecciones persistentes, recurrentes, secundarias y nosocomiales. La supresión inmune inducida por sepsis afecta tanto a los efectores celulares del sistema inmune innato como al sistema adaptativo. Uno de los efectos más importantes es la disfunción de la célula presentadora de antígenos (APC). La disminución de la expresión de la HLA-DR y la producción alterada de citocinas, reducen las capacidades de las CPA para estimular las funciones inmunes impulsadas por los linfocitos. Por otro lado, la apoptosis de linfocitos y CPA se considera un sello distintivo de la supresión inmune. Además estas alteraciones persisten posterior al episodio agudo que a menudo resultan en reingresos hospitalarios y una supervivencia a largo plazo menor.<sup>97</sup>

### 1.4.3. Coinfección / Sobreinfección pulmonar

La prevalencia de coinfección bacteriana en los pacientes con influenza es desconocida. En una revisión sistemática y metaanálisis donde destaca la gran heterogenicidad de los estudios publicados, va desde el 2- 65%. Los gérmenes más frecuentes son *Streptococcus pneumoniae* y el *Staphylococcus aureus*<sup>98</sup>.

Además de la coinfección bacteriana, la introducción de técnicas rutinarias como la PCR, han permitido ampliar el espectro etiológico de las infecciones respiratorias, mostrando que en un porcentaje importante de ellas se presentan como coinfecciones víricas, sobre todo en la temporada invernal y los tipos dependen de los virus que circulan en dicho momento. El significado clínico de las infecciones mixtas, sin embargo, no está aclarado, ya que en muchos casos debido a que la alta sensibilidad de las pruebas moleculares pueden detectar virus más allá del episodio agudo.<sup>187</sup>

Una fuente de morbi-mortalidad elevada es la neumonía bacteriana secundaria, que se presenta tanto en los pacientes adultos como pediátricos graves entre un 25-50 %. Los microorganismos más frecuentes son de nuevo el *Streptococcus pneumoniae* y el *Staphylococcus aureus*.<sup>99</sup> Entre los mecanismos por los que parece aumentar el riesgo se encuentra el daño celular causado por el virus, la inmunidad desregulada secundaria o la alteración de la microbiota intestinal secundaria.<sup>100</sup>

### 1.4.4. Patologías y/o condiciones asociadas

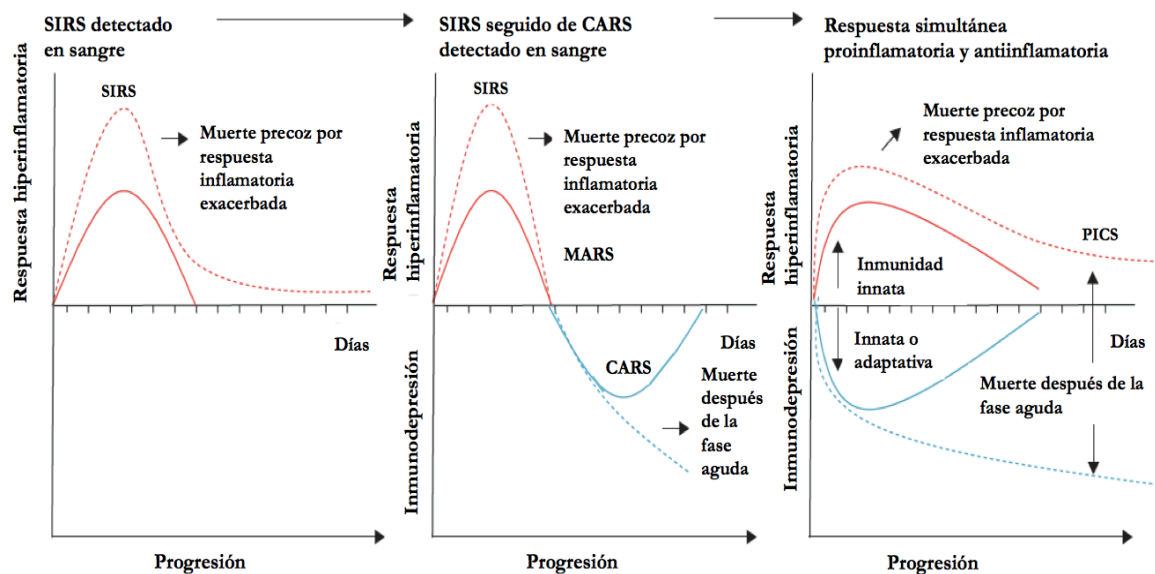
Diversos factores aumentan el riesgo de complicaciones graves por la Influenza. Estos son las edades extremas (menores de 2 años y mayores de 65), asma, afecciones neurológicas, trastornos sanguíneos como la anemia falciforme, enfermedades pulmonares crónicas, trastornos endocrinos como la diabetes, cardiopatías, enfermedades renales y hepáticas, obesidad, inmunodepresión (VIH, oncológicos o secundario a tratamiento inmunodepresivo) embarazadas entre otros. Existe una comprensión limitada de los mecanismos inmunológicos involucrados y de las variaciones genéticas que pudiesen contribuir a la enfermedad. No

obstante, estos factores se dan en una fracción de los casos graves, de hecho, la infección producida por pdmH1N1-2009 presentó alta morbimortalidad en adultos de edad media y jóvenes sanos. Por tanto, existen aún por aclarar los mecanismos responsables de la mala evolución en los pacientes graves, presentándose la genética y epigenética como factores importantes a estudiar. Se hipotetiza que dichos factores convergen en una disfunción inmune que condiciona la habilidad del paciente en la eliminación del patógeno.<sup>101</sup>

Por ejemplo, los pacientes obesos podrían presentar alteraciones inmunológicas debido a la secreción anormal de moléculas importantes en la regulación inmune por el tejido adiposo. La adiponectina, que reduce la actividad de macrófagos y que en estos pacientes, al igual que en gestantes, está disminuida, lo que podría amplificar las respuesta inflamatoria en respuesta a la infección<sup>102,103</sup>. Las embarazadas por su lado, presentan un fenómeno de inmunotolerancia y supresión activa de la respuesta inmune para evitar el rechazo del feto que podría explicar el aumento de la susceptibilidad a la infección. A nivel sistémico, hay aumentos de células T reguladoras, los linfocitos Th1 / Th2 se alteran en favor de Th2 y, por lo tanto, son predominantes las citocinas similares a Th2, como la IL10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), con una función disminuida de las células presentadoras de antígenos y disminución de la expresión de MHC, moléculas coestimuladoras y citoquinas proinflamatorias.<sup>104</sup>

#### **1.4.5. Biomarcadores inmunitarios en la neumonía grave por influenza**

Tradicionalmente la sepsis se ha identificado como una respuesta inflamatoria precoz causante de una gran mortalidad inicial y una fase antiinflamatoria compensatoria final, causante de la mortalidad tardía relacionada con la anergia. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que tanto el estado inflamatorio como antiinflamatorio son fenómenos simultáneos y duraderos, responsables de una inmunidad disfuncional. Factores como genética, edad, ambiente, comorbilidades, microbioma y la modulación de la epigenética y el metabolismo modularán el inmunofenotipo de cada paciente. En la figura 5 podemos observar la evolución conceptual en el tiempo de la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria.



**Figura 5:** Evolución histórica de los modelos explicativos de la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria en la sepsis. Adaptado de Rubio I, Osuchowski M, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler M, Lachmann G et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(12):422-436.

En los últimos años se ha postulado el papel terapéutico y no sólo pronóstico de los biomarcadores inmunitarios. Por un lado, a pesar de la administración temprana de antiviricos persiste una mortalidad alta en los pacientes ingresados en UCI por influenza. Dado el papel de la inflamación en la patogenia, el uso de inmunomoduladores adyuvantes podría ser una estrategia efectiva en el manejo de estos pacientes.<sup>105</sup> Por otro lado, se han informado niveles altos de citoquinas proinflamatorias o “tormenta de citoquinas” en pacientes con infección grave por el virus H1N1pdm09, H5N1 y H7N9, relacionándose con el pronóstico y mortalidad de estos pacientes.<sup>106</sup> Es por ello que en los últimos años ha sido habitual el uso de corticoides a altas dosis para limitar esta respuesta inflamatoria excesiva y mejorar el pronóstico. Sin embargo, en una revisión Cochrane en 2016 concluyen que los pacientes tratados con corticoides podrían haber tenido un riesgo mayor de muerte en comparación con los no lo recibieron.<sup>107</sup>

No cabe duda que la hipercitoquinemia descrita en los pacientes graves por influenza tienen una gran importancia en la fisiopatología. Sin embargo, a modo de simplificar obviamos la posible dualidad de muchas de las citoquinas liberadas, y por tanto del posible papel directo del daño tisular, pero también de la disfunción inmune, hasta ahora asociada al síndrome de la respuesta antiinflamatoria secundaria, la inmunosupresión y la muerte tardía. En los últimos años, y sobre todo después del consenso sepsis 3, se ha abandonado el SIRS como parte única del daño agudo y temprano de la sepsis, conociendo más sobre la fisiopatología y observando que ambas respuestas se inician de forma simultánea, probablemente compartiendo muchas vías de activación y propagación. Un ejemplo es el trabajo de Yu et al, que analiza los niveles de interleuquinas en suero de pacientes con H1N1 de diferente severidad y donde observó una producción combinada de citoquinas Th1/Th2, con una alta correlación entre la liberación de IL6 y 10, (citocina pro y antiinflamatoria respectivamente) y la severidad de la infección, reafirmando la idea de que ambas vías comparten protagonismo en la fisiopatología.<sup>108</sup>

Aunque el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la inmunodisfunción relacionada con la sepsis han avanzado en los últimos años, los ensayos clínicos que han probado estrategias de intervención inmune en pacientes sépticos han resultado fallidos. Venet et al, propone que la clave del éxito en futuros estudios es la estratificación de los pacientes, no solo en función de las características de la infección y parámetros específicos del paciente, sino también según su estado inmunitario en un momento dado. La necesidad de la estratificación de biomarcadores de los pacientes, por lo tanto, parece un requisito previo en los ensayos clínicos para evaluar las terapias inmunomoduladoras en estos pacientes. Hasta la fecha, el recuento absoluto de linfocitos y la disminución de la expresión de HLA-DR por parte de los monocitos parecen ser los marcadores más sólidos para la estratificación de pacientes en ensayos clínicos multicéntricos<sup>236</sup>.

## 1.5. IMPORTANCIA DEL HIERRO Y PROTEÍNAS RELACIONADAS EN LA RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN

El hierro es un micronutriente esencial para casi todos los organismos vivos e interviene en un gran número de importantes procesos biológicos como la eritropoyesis, metabolismo oxidativo, biosíntesis de ADN y la respuesta inmune.<sup>109</sup> Su capacidad de cambiar entre múltiples estados de oxidación lo convierten en un importante cofactor en la transferencia de electrones y reacciones de óxido reducción<sup>110</sup> Sin embargo, el exceso de hierro causa daño tisular por oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana y modificación de ácidos nucleicos, con la conversión de peróxido de hidrogeno en especies reactivas del oxígeno (ROS), resultando en una gran variedad de complicaciones que provocan daños orgánicos y muerte prematura.<sup>111</sup>

Este es un elemento tan esencial para el crecimiento y supervivencia de todos los organismos que su déficit puede impedir o dificultar el desarrollo de patógenos y su exceso favorecer las infecciones o su gravedad.<sup>112</sup> Como el contenido de hierro en líquido biológicos es bajo, algunos patógenos ha desarrollado complejos mecanismos para adquirirlo de forma eficiente. Por otro lado, una importante estrategia de defensa antimicrobiana se basa en la privación a los patógenos de este nutriente. Mientras que algunas de estas asociaciones pueden reflejar efectos del hierro en el crecimiento de patógenos, también pueden ser el resultado de la influencia del hierro en la respuesta inmune al patógeno. Hay estudios que muestran la influencia del hierro en la expansión de los diferentes subconjuntos de linfocitos T tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>113</sup> En pacientes con hemocromatosis existen proporciones desequilibradas de linfocitos T que producen altos ratios CD4+/CD8+.<sup>114</sup>

Durante la sepsis el metabolismo del hierro se ve afectado tanto a nivel local como sistémico. Uno de los hallazgos más frecuentes es la anemia. Si bien la causa es multifactorial: factores relacionados con la propia comorbilidad, fármacos utilizados, extracciones sanguíneas, o déficits nutricionales entre otros; las alteraciones en el metabolismo del hierro juegan un papel muy importante. Suele ser habitual la presencia de una eritropoyesis limitada por la falta de disponibilidad de hierro a consecuencia de una disminución de la absorción intestinal, de la

recirculación del hierro, un aumento de la captación y el almacenamiento de hierro por los macrófagos que se traduce en un aumento de ferritina paradójica.<sup>115</sup>

### 1.5.1. Ferritina

La ferritina es una proteína clave del metabolismo del hierro que es capaz de secuestrar grandes cantidades de hierro (hasta 4500 átomos de FeIII), y por lo tanto, con la doble función de desintoxicación y almacenamiento de hierro. La ferritina es una proteína intracelular que se localiza principalmente en el citoplasma, aunque también se encuentran trazas en suero y otros fluidos biológicos. Una forma relativamente recientemente identificada ha sido en la mitocondria.<sup>116</sup> La expresión de ferritina mitocondrial no es dependiente del hierro y se limita a las células con alta actividad metabólica, como testículos, corazón y cerebro. Los estudios in vitro demuestran que tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis del hierro celular y en la citoprotección contra el daño oxidativo.<sup>117</sup> Está compuesta por subunidades de cadena pesada (H) y ligeras (L). Dependiendo del tipo de tejido, la proporción de cadenas L y H varían.<sup>118</sup> Las cadenas de ferritina H poseen actividad ferroxidasa, otorgándoles actividad antioxidante.<sup>119</sup>

La inflamación juega un papel importante en la regulación de la expresión de la ferritina. Citoquinas inflamatorias, particularmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina-2 (IL-2), regulan aumentando la síntesis de ferritina al aumentar la unión de NF-kB al potenciador de la transcripción FER2 del IRE y la región de codificación.<sup>120</sup> Se han descrito también vías independientes de IRE bajo el estímulo directo de TNF $\alpha$ , IL-2 y otras IL.<sup>121,122</sup>

La expresión de ferritina se produce en varias células, incluyendo células mesenquimales, hepatocitos y macrófagos de monocitos. La mayoría de los estímulos relacionado con la inflamación y dirigido a la síntesis de ferritina parece aumentar la H-ferritina preferentemente, lo que reduce disponibilidad de hierro citosólico. Parece que la ferritina H posee una función supresora sobre la proliferación y diferenciación células hematopoyéticas, disminuyendo la



proliferación y el número de granulocitos, eritrocitos, macrófagos e inhibidora de la función inmune de los linfocitos.<sup>123</sup> Parece ser que esta acción mielosupresora depende la actividad ferroxidasa de la ferritina H, no teniendo esta capacidad la ferritina L y consecuentemente dicha función.<sup>124</sup> También hay evidencia de que la H-ferritina juega un papel importante en la señalización del receptor de quimiocinas y la migración celular mediada por receptores. Por ejemplo, se ha observado que la ferritina H en presencia de la quimiocina CSCL12, se une al receptor 4 de la quimiocina CXC (CXCR4), reprimiendo su activación.<sup>125</sup> Por otro lado la ferritina se une cininógeno de alto peso molecular (HK), molécula importante en la vía intrínseca de coagulación, que actúa como una vía de señalización antiinflamatoria, ya que la interacción directa de la ferritina con HK evita escisión de HK y una reducción concomitante en la liberación de bradiquinina.<sup>126</sup>

Además de la ferritina intracelular, existe la ferritina circulante, ampliamente utilizada como indicador fiable de depósitos de hierro corporal. Esta es pobre en hierro y se compone principalmente de subunidades L.<sup>127</sup> Aunque la ferritina sérica es medida de forma rutinaria se sabe que hay muchos factores, incluida la inflamación, infección y malignidad, que pueden elevar la ferritina sérica, complicando la interpretación de éste. A pesar de su uso tan extendido queda mucho sobre su fisiología por esclarecer. La fuente y la vía secretora detallada de la ferritina sérica no se conocen completamente. Se ha demostrado que los hepatocitos, macrófagos y células de Kupffer secretan ferritina. No se conoce la señal de secreción de la ferritina, pero parece que la ferritina L en suero y en tejidos está codificada por el mismo gen y que citoquinas como IL1 y TNF  $\alpha$  regulan transcripcionalmente su producción.<sup>128</sup>

Diversos estudios han otorgado otra posible función a la ferritina extracelular: la de portador de hierro para proporcionar hierro a las células.<sup>129</sup> Además de hierro, la ferritina tiene la propiedad de encapsular y suministrar otras moléculas. Gracias a su pequeño tamaño, relativo fácil ensamblaje-desensamblaje, capacidad de introducirse en el citoplasma y núcleo de las células es una de las moléculas más utilizadas en nanotecnología como transportador de moléculas.<sup>130</sup>

La ferritina sérica por tanto, es reconocida como un RFA y marcador de inflamación aguda y crónica, estando elevada en multitud en enfermedades como enfermedades renales crónicas, enfermedades autoinmunes, neoplasias e infecciones. La elevada ferritinemia refleja un aumento de almacén de hierro pero paradójicamente secuestrado. Esta deficiencia relativa de hierro se ha propuesto como un mecanismo de defensa para que el hierro no sea utilizado por patógenos y tumores.<sup>131,132,133</sup> Sin embargo, hay una creciente evidencia de que la ferritina sérica también tiene un papel activo en la modulación de la inmunidad e inflamación. Ruddell et al. propuso un nuevo papel para la ferritina extracelular como una molécula de señalización proinflamatoria en células estrelladas hepáticas. Observaron la activación NFκB de células tratadas con ferritina vía activación de la PI3 y MAP quinasas. Curiosamente, esta función era independiente del contenido de hierro de la ferritina, sugiriendo que la ferritina exógena puede asumir roles completamente independientes de su papel clásico como una proteína de unión al hierro.<sup>134</sup>

En el caso de hallazgos de hiperferritinemias en los pacientes sépticos es importante descartar el síndrome hemofagocítico (SHF). El síndrome hemofagocítico es un síndrome caracterizado por una inflamación excesiva y destrucción de tejido debido a una activación inmune anormal. El estado superinflamatorio parece ser causado por una regulación alterada de los macrófagos activados y linfocitos. Sus criterios diagnósticos son la presencia de fiebre, citopenia de 2 subpoblaciones, hipertriglicemia y/o hiperfibrinogemia, hiperferritinemia (>500 ng/ml), hemofagocitosis, receptor soluble de IL2 elevado (CD25), disminución de la actividad Natural Killer y esplenomegalia. Este síndrome puede ser primario, normalmente en niños, denotando un desorden genético o secundario a enfermedades autoinmunes o a infecciones graves. Tanto el SHF primario como el secundario puede desencadenarse por infecciones u otros eventos de activación inmunológica, y las mutaciones genéticas pueden ser encontradas en individuos de cualquier edad, con o sin antecedentes familiares. Las infecciones víricas suelen ser las más frecuentemente relacionadas con este síndrome, incluidos VEB, CMV, HV8, VVZ, VIH, y el virus H1N1.<sup>135</sup> El síndrome de activación de macrófago constituye una forma de SHF caracterizada por presentar una concentración alta de PCR. Es más frecuente en el síndrome de Still, LES y tras trasplantes de médula ósea.<sup>136</sup> Respecto a la Influenza Harms et al. realiza un

estudio patológico retrospectivo de 8 pacientes con infección fatal por el virus H1N1. En todos los casos se observó citofagocitosis, hallazgo poco común en estudios patológicos de otros subtipos de gripe. Se identificó citofagocitosis en secciones de médula ósea obtenido a partir de costillas en todos los casos. En aquellos con un curso más rápido de la enfermedad se documentó hemofagocitosis prominente en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. Dado que no todos los criterios fueron evaluados la posibilidad de SHF no puede ser descartado. Los autores concluyen que la posibilidad de el síndrome hemofagocítico debe investigarse en pacientes gravemente enfermos con infección por H1N1.<sup>137</sup>

La sepsis comparte muchas características con el SHF, incluyendo fiebre, citopenias y afectación hepática. Tanto la sepsis como el SHF pueden tener hallazgos de coagulación intravascular diseminada e inflamación generalizada. No existe una prueba para diferenciarlos pero, dado que necesitan diferentes tratamientos, es importante diferenciarlos. Lanchmann et al, realiza un estudio observacional retrospectivo en una cohorte mixta de pacientes críticos donde selecciona aquellos con ferritina  $>500 \mu\text{g} / \text{L}$  y los categoriza en diferentes grupos: SHF, sepsis, shock séptico y otras causas. De 2.623 pacientes con hiperferritinemia 40 (1.52%) tenían un diagnóstico emitido por expertos de SHF con una ferritina máxima estadísticamente superior que el resto de grupos. Los pacientes con sepsis y shock séptico tuvieron niveles máximos de ferritina más altos que los pacientes con otros diagnósticos (cada  $p < 0,001$ ). Determinaron que un valor de ferritina de  $9.083 \mu\text{g} / \text{L}$  tiene un 92.5% de sensibilidad y 91.9% especificidad para el diagnóstico de SHF (área debajo de la curva, 0,963; IC 95%, 0.949-0.978). Este valor dista mucho del valor de  $>500 \mu\text{g} / \text{L}$  propuesto por los criterios de SHF de 2004, enfocados en la población pediátrica. Un detalle a destacar, es que el 30% de los pacientes con SHF tenían diagnóstico de sepsis y el 57,5% de shock séptico, por lo que fueron infradiagnosticados.<sup>138</sup> Por tanto los autores recomiendan, acorde con otras publicaciones, que en los paneles de laboratorio de rutina de la UCI deben expandirse incluyendo la ferritina, triglicéridos, fibrinógeno, ASAT y sil-2R.<sup>139</sup>

### **1.5.2. Transferrina**

La transferrina (Tf) es una glicoproteína que une hierro y lo transporta a las células vía receptor

de transferrina (TfR)-endocitosis que refleja el estado orgánico de proteínas y hierro.<sup>140</sup> Está sintetizada mayoritariamente a nivel hepático y su función principal es el transporte de Fe, siendo los niveles de hierro sérico el principal regulador de su síntesis. La Tf se encuentra aumentada en presencia de un déficit de hierro con el objetivo de captar el Fe circulante para ser utilizado en la eritropoyesis, aunque su saturación está disminuida. Al tratarse de un reactante de fase aguda negativo, en situaciones de inflamación, sobrecarga férrica, infección o malignidad, se encuentra disminuida, no siendo útil para la valoración de la ferropenia.<sup>141</sup> En la circulación existe en varias formas que contienen hasta seis residuos terminales de ácido siálico en sus cadenas laterales de carbohidratos. En individuos sanos, predominan las formas trisialo-, tetrasialo- y pentasialo-.<sup>142</sup> Se ha observado que durante la sepsis aumenta la desialilación de la transferrina por aumento de la actividad de la neuroaminidasa. El patrón de sialilación de la transferrina es probablemente importante. Varios estudios en modelos animales han destacado el efecto de la desialilación en la captación hepática de hierro, aumentándola, y en la semivida de la transferrina disminuyéndola, pudiendo ser uno de los responsables de la rápida alteración del metabolismo del hierro en pacientes sépticos.<sup>143</sup>

## 1.6. BIOMARCADORES PRONÓSTICOS PRECOCES EN LA NEUMONÍA GRAVE POR INFLUENZA

Identificar los pacientes que desarrollarán una neumonía viral potencialmente grave es fundamental, porque la mortalidad es alta y es vital poder predecir la gravedad para permitir el ingreso inmediato a la UCI. En la mayoría de estos pacientes el curso clínico es un cuadro inespecífico de infección respiratoria que se hace grave (SARI) a los 4-5 días de inicio. Durante las horas siguientes al inicio de insuficiencia respiratoria (necesidad de oxígeno para mantener una saturación superior al 90%), se hace difícil distinguir que pacientes evolucionarán de una forma estable o presentarán un agravamiento fulminante que requiere oxígeno a altas concentraciones (opptiflow) y ventilación mecánica.

Se han evaluado diferentes *scores* para facilitar al clínico el diagnóstico y estratificar la gravedad de los pacientes, con el objetivo de un uso de recursos eficiente. El PSI y CURB-65 son los dos sistemas de puntuación principales con similar validez, diseñados para estratificar el riesgo de los pacientes que se presentan con Neumonía adquirida en la Comunidad (NAC). Sin embargo, estos sistemas de puntuación no parecen adecuados para los pacientes con gripe H1N1. En un estudio que compara la puntuación obtenida entre CAP por H1N1 y de otras etiologías, muestra una menor puntuación en los pacientes con gripe a pesar de tener una enfermedad más grave. Además, ninguno de los dos predijo la necesidad de ingreso en la UCI o ventilación mecánica. Esta discrepancia en los sistemas de puntuación parece ser explicado por el excesivo valor de la edad estos *scores* los puntos dados por la edad, minusvalorando la gravedad en el paciente joven, especialmente vulnerable en la infección por H1N1.<sup>146</sup>

Las nuevas definiciones de Sepsis ponen más énfasis en el desarrollo de fallo orgánico, en este caso respiratorio. Los sistemas de puntuación como el APACHE II o SOFA se han relacionado con el mal pronóstico en estos pacientes. Los sistemas de evaluación del fallo orgánico SOFA y qSOFA fueron propuestos por el consenso SEPSIS-3 para identificar a los pacientes de alto riesgo con sospecha de infección.<sup>147</sup>

Pero los sistemas de puntuación APACHE II y SOFA requieren el registro de los valores más

bajos de diversos parámetros clínicos y biológicos dentro de las primeras 24 horas de hospitalización.<sup>148</sup> En una serie pequeña, nuestro grupo reportó la limitada utilidad del qSOFA para detectar la gravedad en estos pacientes.<sup>149</sup> En contraste, los biomarcadores se pueden medir rápidamente, a las pocas horas de la admisión de los pacientes en Urgencias o en la UCI.

En las últimas décadas ha crecido el interés por hallar biomarcadores útiles para el manejo de estos pacientes. Un biomarcador es una característica objetivamente medible, capaz de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica.<sup>150</sup> Los biomarcadores tienen diferentes aplicaciones como herramienta diagnóstica, estratificador de gravedad, predicción y/o monitorización de una respuesta terapéutica.

La mayor parte de los estudios en este sentido se han basado en la NAC sin diferenciar entre bacteriana y otros microorganismos. Una reciente revisión diferencia a estos biomarcadores como cardíacos y no cardíacos. En la tabla 1 se muestran su posible mecanismo fisiopatológico y su utilidad en la NAC. Como podemos observar, se han estudiado muchos biomarcadores considerando que cada uno de ellos refleja un aspecto de la enfermedad diferente. Sin embargo, la aplicación clínica de muchos de ellos todavía es incierto debido a sus limitaciones y la heterogeneidad de la enfermedad.<sup>151</sup> Esta limitación es aún mayor en los pacientes con influenza ya que existe poca evidencia de su aplicación en estos pacientes, siendo inexistente para la mayoría de los biomarcadores descritos. De todos los mencionados, los más utilizados han sido la proteína C reactiva (PCR) y la procalcitonina (PCT).<sup>152</sup>

<b>BIOMARCADOR</b>	<b>MECANISMO FISIOPATOLÓGICO</b>	<b>POSIBLE USO EN NAC</b>
<b>CARDÍACOS</b>		
Troponinas	Lesión miocárdica	Supervivencia a corto-largo plazo
Péptidos natriuréticos	Volumen de líquido corporal, estrés cardíaco	Supervivencia a corto-largo plazo
MR-proADM	Vasodilatación, inflamación	Ingreso en UCI
Endotelina 1	Vasoconstricción	Supervivencia a corto-largo plazo
Copeptina	Volumen de líquido corporal,	Supervivencia a corto-largo plazo

	vasoconstricción	Ingreso en UCI
<b>NO CARDÍACOS</b>		
PCR	Inflamación	Supervivencia a corto plazo
PCT	Infección	Diagnóstico etiológico en ingreso en UCI Supervivencia a corto plazo
IL-6	Inflamación	Supervivencia a corto-largo plazo
TNF-alfa	Inflamación	-
Recuento linfocitario	Inmunidad adaptativa	Supervivencia a corto plazo
NETs	Infección, inflamación, Activación plaquetaria, lesión endotelial	Supervivencia a corto plazo
DD	Trombolisis	Supervivencia a corto plazo
Cortisol	Función adrenal	Supervivencia a corto plazo
FGF21	Regulación metabólica, Inflamación, Inmunomodulador	Supervivencia a corto plazo
Calprotectina	Actividad Neutrófilos	Discriminación de etiología bacteriana Supervivencia a largo plazo
Presepsina	Reconocimiento bacteriano	Supervivencia a corto plazo
PTX3	Respuesta inmune innata	Supervivencia a corto plazo

**Tabla 1.** Biomarcadores en la NAC. Adaptado de Méndez R, Aldás I, Menéndez R. Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia (Cardiac and Non-Cardiac). *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(2):54

MR-proADM: región media de la pro adrenomedulina. PCR: proteína C reactiva. PCT: procalcitonina. IL-6: interleuquina 6. TNF alfa: Factor de Necrosis Tumoral alfa. NETs: rampas extracelulares de los neutrófilos. DD: dímero D. FGF21: Factor de Crecimiento Fibroblástico 21. PTX3: pentraxina 3

La PCR es un marcador de respuesta inflamatoria aguda, y el aumento de su concentración se ha descrito en muchas enfermedades. Es sintetizada en los hepatocitos como respuesta a citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL6), y parece desempeñar un papel trascendental en la respuesta inmune. En una reciente revisión sistemática proporciona evidencia de que los niveles de PCR al diagnóstico son de media significativamente más altos en pacientes que desarrollan complicaciones graves de la gripe en comparación con aquellos que presentan un curso no severo de la enfermedad.<sup>153</sup>

La procalcitonina (PCT) es un precursor activo de la hormona calcitonina que pertenece genéticamente a familia CALC-1. Esta aumentado en la sepsis pero también en otras enfermedades como tumores, pancreatitis, apendicitis, quemaduras, politraumatismos y cirugía. Se considera un marcador sensible para las infecciones bacterianas y se ha considerado un biomarcador útil para la monitorización del tratamiento con antibióticos. Por otro lado es un biomarcador pronóstico en los pacientes sépticos.

La región media de la proadrenomedulina (MR-proADM) se ha incorporado recientemente como biomarcador. Es un péptido precursor de la adrenomedulina (ADM), proteína de la familia de los genes de la calcitonina que se manifiesta en presencia de una infección. La ADM es un péptido de 52 aminoácidos cuyo gen se expresa en distintos órganos; fundamentalmente en medula adrenal, corazón, riñón y pulmón, así como en el tejido adiposo.<sup>154</sup> Durante el estrés aumentan los niveles en sangre y se le reconocen funciones como vasodilatador, antimicrobiano y actividad antiinflamatoria, participando en el mecanismo defensivo del organismo ante la invasión bacteriana.<sup>155</sup> La vida media de la ADM es muy corta, aproximadamente de 22 minutos determinada por una rápida degradación por las proteasas y la formación de complejos con el factor de complemento H en la sangre.<sup>156</sup> Sus niveles plasmáticos son fugaces y difíciles de monitorizar, aunque se han descrito niveles altos en pacientes críticos sépticos,<sup>157</sup> relacionándose directamente con la relajación del tono vascular y por tanto, con la hipotensión de los pacientes en shock séptico.<sup>158</sup> También se han encontrado niveles altos en otras patologías como fallo cardíaco, insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal, cirrosis y neoplasias.<sup>159-164</sup> La Mr-proADM es un fragmento de 48 aminoácidos que se escinde de la molécula ADM final en una relación 1:1. Es funcionalmente irrelevante, pero representa proporcionalmente los niveles y la actividad de la ADM.<sup>165,166</sup> Su vida media es mayor, varias horas, y su determinación en plasma resulta posible en la práctica clínica. Se ha relacionado como marcador pronóstico en la sepsis, estratificando el riesgo de mortalidad en pacientes con sepsis mejorando los resultados de PCR y PCT.<sup>167</sup> Han sido numerosos los estudios que han evaluado su utilidad como biomarcador en Urgencias para ayudar a estratificar el riesgo. El estudio TRIAGE demostró que la combinación MRproADM y la información clínica mejora el poder de la estratificación de la gravedad y la necesidad de



ingreso en UCI de pacientes que atienden de forma consecutiva a urgencias sin seleccionar causa.<sup>168</sup> En un análisis secundario de la misma corte se observó que National Early Warning Scores (NEWS) también mejoraba su utilidad pronóstica al añadir biomarcadores, siendo el que más lo mejora la MR-proADM.<sup>169</sup>

En los diferentes estudios se ha observado su gran sensibilidad en aquellos pacientes con infecciones de origen respiratorio. En 2016 Viasus et al. realiza un metaanálisis sobre biomarcadores predictores de mortalidad en la NAC donde la pro-ADM se presenta como el biomarcador con mayor poder pronóstico.<sup>170</sup> De la misma forma, una reciente revisión sistemática concluye que la MR-proADM representa una herramienta tan útil como las puntuaciones específicas, mejorando su utilidad cuando se utiliza en conjunto, para la toma de decisiones como el ingreso en UCI, así como la mortalidad a corto y largo plazo, independientemente de la etiología microbiológica de la NAC.<sup>151</sup>

La evidencia sobre su uso en pacientes con gripe es limitado. Nuestro grupo fue el primero en reportar su utilidad en Urgencias para anticipar el riesgo de mortalidad y la necesidad de mecánica ventilación, en pacientes con neumonía grave por el virus H1N1, siendo más útil que la procalcitonina (PCT) o proteína C reactiva (PCR).<sup>171</sup> Posteriormente se ha analizado su utilidad frente a otros biomarcadores como NT-ProBNP, PCR y PCT en la predicción de mal pronóstico en pacientes en Urgencias con síndrome gripal, siendo la pro-ADM la que presenta mayor capacidad predictiva.<sup>172</sup>

## **2. HIPÓTESIS**

La gravedad de los pacientes con neumonía por el virus de la influenza está determinada por el daño pulmonar secundario a un estado hiperinflamatorio inmunomediado que puede predecirse de forma precoz mediante la determinación de biomarcadores.

## **3. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

1. Valorar la utilidad de la MR pro-ADM al ingreso en urgencias para pronosticar precozmente la mala evolución de los pacientes con neumonía por el virus influenza.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

2. Determinar si alguna alteración de la inmunidad precoz es un factor predisponente en la mala evolución de los pacientes que sufren neumonía por influenza.

3. Determinar la importancia de la ferritina y otras proteínas relacionadas con el hierro y su relación con la inmunidad en el pronóstico de estos pacientes.

4. Describir el inmunofenotipo característico e identificar aquellos predictores de severidad y riesgo en los pacientes ingresados por gripe A H1N1.

5. Comparar el estado de la disfunción inmune presente en estos pacientes con el de una cohorte de adultos con COVID-19 ingresados en UCI.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO

Estudio observacional, analítico, prospectivo, multicéntrico. Han participado los siguientes centros: Hospital Universitario de Jerez, Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz, Hospital Clínico Universitario de Puerto Real, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Santa María del Puerto, Hospital San Rafael de Cádiz.

### 4.2. ÉTICA

Estudio aprobado inicialmente por el Comité de Ética para la Investigación del Hospital SAS de Jerez (SNP-SEP.11 Identificador del estudio No. 351- 28 de enero de 2011) y posteriormente por el resto de los comités de los respectivos hospitales donde los sujetos fueron reclutados. Los pacientes fueron incluidos en el estudio una vez que ellos o su representante legal habían completado y firmado el formulario de consentimiento informado. El estudio cumplió con la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki con respecto a la conducta ética de la investigación en seres humanos. No se incluyeron pacientes menores de 18 años o con cáncer incurable.

### 4.3. POBLACIÓN ESTUDIADA

Criterios de inclusión: pacientes adultos ingresados de forma consecutiva en las UCI con el diagnóstico de sepsis de origen pulmonar por gripe durante un periodo de 5 años (5/02/2013 al 24/03/2018).

- Criterios y definiciones:

La disfunción orgánica se definió de acuerdo con los criterios de la International Sepsis Definition Conference 2001<sup>173</sup>. La neumonía por el virus de la Gripe se definió como una infección del tracto respiratorio inferior caracterizada por: signos y síntomas clínicos de infección respiratoria y opacidades radiológicas observadas en la radiografía de tórax, compatible con neumonía y con un muestra respiratoria positiva para la prueba de diagnóstico

del virus de la influenza. Los criterios de admisión a la UCI (criterios de gravedad ATS / IDSA) fueron los siguientes: los criterios principales (presencia de un criterio) necesidad de ventilación mecánica y/o presencia de shock séptico; criterios menores (presencia de dos o más criterios) presión arterial sistólica <90 mm Hg, frecuencia respiratoria > 30 rpm, PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub> <250, infiltrados multilobulares, confusión, urea > 55 mg / dl, hipotermia, leucopenia o trombocitopenia.

- Criterio de diagnóstico de gripe A o B:

Los criterios diagnósticos fueron síntomas clínicos con infiltrado pulmonar y PCR positiva para influenza. La PCR en tiempo real se realizó mediante la técnica "Genexpert" que da resultados A+; AH1+; B+. Las muestras se tomaron de secreción faríngea, de aspiración bronquial o lavado bronco alveolar (BAL). Los resultados A no AH1 se asumió como AH3 por ser en los informes epidemiológicos del Sistema Centinela de Vigilancia de la Gripe de España del CNE (Centro Nacional de Epidemiología) la cepas A circulantes en este periodo de tiempo en España.

Criterios de exclusión: se excluirán los pacientes menores de 18 años y con cáncer incurable.

#### **4.4. TAMAÑO MUESTRAL**

El número de casos ingresados en UCI con diagnóstico de neumonía grave por gripe en el área durante el periodo de estudio determinó el tamaño muestral. Finalmente han sido reclutados 122 pacientes en UCI y 61 en el grupo control ingresado en planta.

#### **4.5. VARIABLES**

Se incluyeron los siguientes datos demográficos, patológicos y clínicos:

Variables demográficas:

Se recogió el sexo, edad, procedencia, estancia desde shock séptico, estancia en UCI, *exitus* en UCI, a los 90 días y en el hospital.

### Comorbilidad:

Se recogieron los antecedentes de enfermedad oncológica, hematológica, obesidad (IMC>30), enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria e inmunodepresión.

La inmunodepresión fue definida como cualquier inmunodeficiencia primaria o secundaria a infección por VIH, neoplasia maligna, enfermedad autoinmune, trasplante de órganos sólidos, tratamientos inmunosupresores, o enfermedades hematológicas (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma, enfermedad de injerto contra huésped o trasplante de médula ósea).

### Variables de infección:

Resultados de cultivos al ingreso así como la coinfección o reinfección.

### Variables de fracaso orgánico:

Se determinó el número de órganos con disfunción al ingreso y máximo y la puntuación SOFA.

El número de órganos afectados se cuantificó de 0 a 8, considerándose: neurológico (escala de Glasgow  $\leq 14$ ), respiratorio ( $PaO_2/FiO_2 \leq 300$  o ventilación mecánica), cardíaca (elevación de CPK y troponina-HS), hemodinámico (PAM < 70 mmHg, uso de vasoactivos) renal (creatinina > 2 o diuresis < 0,5 ml/kg/h), hepático (bilirrubina > 2 mg/dl) y hematológico (CID o plaquetas < 150.000/ml), acidosis metabólica. Se utilizará el score SOFA. Pacientes con SOFA superior a 2 serán considerados con Sepsis (Casos), mientras los que tengan SOFA 0-2 serán considerados con infección sin repercusión sistémica (controles).

### Variables de escala de gravedad:

Se utilizaron las escalas Apache II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) y SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II)

#### Variables analíticas:

Se determinaron los siguientes valores analíticos: leucocitos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, Actividad de protrombina, TTPA, Dímero-D, INR, fibrinógeno, glucosa, creatinina, sodio, potasio, procalcitonina, MR-proADM, NT-proBNP, bilirrubina, AST, ALT, GGT, fosfatasa alcalina, LDH, albúmina, proteínas totales, colesterol, CPK, troponina-HS, gasometría arterial y venosa. Hierro, Transferrina, Ferritina. En los pacientes ingresados en UCI se determinaron los niveles de IL6 y ácido láctico.

#### Variables de inmunidad:

Se recogieron el recuento de leucocitos, PMN, monocitos, linfocitos y subpoblaciones linfocitarias: TCD3+, TCD4+, TCD8+, BCD19+, NK CD56+e Inmunoglobulinas A, G y M. Se determinó la expresión HLA-DR en monocitos CD14+.

## **4.6. TRATAMIENTO**

El tratamiento fue protocolizado según las recomendaciones de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Cuidados Coronarios (SEMICYUC).

([http://www.semicyuc.org/sites/default/files/protocolo\\_manejo\\_20091015.pdf](http://www.semicyuc.org/sites/default/files/protocolo_manejo_20091015.pdf)).

Los pacientes con alta sospecha de infección por influenza fueron tratados con oseltamivir, 75 mg por vía oral, dos veces al día. Debido a la sospecha de infección bacteriana, se agregó terapia antibiótica de amplio espectro hasta que los cultivos negativos y la PCT normal lo descartaran.

## **4.7. RECOGIDA DE DATOS**

Se recogieron datos demográficos, epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Las muestras de sangre fueron recogidas al ingreso del hospital. Los estudios básicos que incluyeron recuento

sanguíneo completo, bioquímica y coagulación se procesaron en el momento del ingreso (dentro de las 12 horas posteriores al ingreso en la UCI).

En la Sección de inmunología del Servicio de Hematología del Hospital de Jerez se determinaron las subpoblaciones linfocitarias mediante la técnica de citometría de flujo. Se utilizaron tres tubos: a) uno con 20 microlitros de los anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) anti-CD3-Fitc, anti-CD4-APC, anti-CD8-PE y anti-CD45-PercP para establecer las poblaciones de linfocitos T (CD4+ y CD8+); b) otro con los anticuerpos monoclonales CD19-Fitc, CD-56-PE y CD-3-PercP, para establecer el porcentaje de linfocitos B y NK; y c) Un tercero con anticuerpos anti-HLADR-PE, anti-CD45-PercP y anti-CD14-APC para detectar monocitos y establecer la expresión de la molécula HLA-DR en ellos. A cada tubo se le añaden 100 microlitros de S.P., y se incuban 15 minutos en oscuridad. La serie roja se lisa con 2 ml FACSTM Lysing solution (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) durante 10 minutos en oscuridad. Se centrifugan a 1700 rpm durante 5 minutos y por último, las células se lavan con 2ml de PBS. El análisis se realiza en un FacsCalibur de 4 colores (Becton Dickinson), sobre un total de 20.000 eventos adquiridos, siguiendo el programa Paint-a-gate. Las Subpoblaciones fueron analizadas sobre el gate linfoide.

Tras la realización del hemograma y las subpoblaciones linfocitarias, se separó el plasma del tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mediante centrifugación y se congeló a -80° hasta realizar las determinaciones de MR-ProADM.

La determinación de la región media de la proadrenomedulina en plasma se realizó por inmunofluorescencia, utilizando un inmunoanálisis automatizado tipo sandwich (*Thermo Scientific™ BRAHMS™ MR-pro-ADM KRYPTOR™; Hennigsdorf, Germany*) con tecnología TRACE (*Time resolved amplified cryptate emission*).

Para reducir el riesgo de sesgo de medición todas las muestras de los pacientes de otros hospitales fueron analizadas en el mismo laboratorio. Previamente han sido calibradas con muestras controles de sujetos sanos y con otras patologías.

## 4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables. Las variables cualitativas se expresaron usando un número y un porcentaje, mientras que las variables cuantitativas se expresaron usando medidas de tendencia central (media, mediana). Se estudió la normalidad mediante el test de Kolmogórov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. Los valores de los biomarcadores se presentan como rangos medios e intercuartiles (IQR). La prueba t de Student se usó para comparar variables continuas si la distribución era normal; de lo contrario, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias en las características demográficas y clínicas con respecto a la mortalidad se evaluaron al inicio utilizando la prueba de Chi-cuadrado para variables categóricas. Los valores de diagnóstico predictivos para gravedad (ingreso en la UCI, ventilación mecánica) y mortalidad se evaluaron mediante el análisis de la curva ROC (*receiver operating characteristic*). Se calculó la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y el área bajo la curva (AUC-ROC).

Se ha estimado la supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier. Se elaboró un modelo de riesgo proporcional de Cox, utilizando el método hacia atrás (backward), eliminando del modelo en cada paso las variables no significativas. Acorde a la literatura se escogieron como variables dependientes la tasa de mortalidad en la UCI, hospitalaria y a los 90 días y las variables independientes en el primer modelo (al ingreso) fueron: APACHE II, SOFA, edad, sexo; obesidad; inmunodepresión, cirugía, lactato, MR-proADM, PCT y PCR. Se verificó la bondad de ajuste para cada modelo de regresión logística a través de la prueba de Hosmer & Lemeshow. Las variables independientes fueron aquellas con un valor de  $p < 0,10$  en el análisis univariado; Se calcularon los valores de  $p$ , así como los correspondientes *hazards ratios* (HR) y coeficientes de regresión e intervalos de confianza del 95% (IC del 95%). Se consideró un nivel de significación del 95% ( $p < 0,05$ ).

Se compararon los resultados de los pacientes ingresados en la UCI pos gripe A N1H1 con una cohorte de adultos con COVID-19 ingresados en la UCI de 7 hospitales españoles en los que se recopilaron de forma prospectiva datos epidemiológicos y analíticos que incluyen



parámetros demográficos, terapéuticos, inflamatorios e inmunitarios, siguiendo el mismo protocolo de recogida de datos que en los pacientes con gripe.

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS) versión 16.0 y Med-Calcul® versión 12.5.0.

## 5. RESULTADOS

Se reclutaron 122 pacientes ingresados en las UCIs de 6 hospitales españoles con el diagnóstico de neumonías grave por gripe, durante un periodo de 5 años (5/02/2013 al 24/03/2018). Durante el mismo periodos de tiempo se analizó y se comparó con ellos, un grupo de 61 pacientes con infección respiratoria por gripe que no ingresaron en la UCI, con neumonía menos grave ingresadas en el hospital o dadas de alta desde la sala de Urgencias, que se incluyeron en el grupo de control (CG). Todos los pacientes fueron diagnosticados de infección respiratoria por gripe. También se determinaron los niveles de los biomarcadores en 88 neumonías bacterianas y 6 neumonías por otros virus distinto a los de la gripe. La mayoría de los pacientes ingresados en la UCI fueron positivo para la cepa N1H1 (75 casos). La cepa H3N2 se diagnosticó en 33 pacientes y por el virus B en 14. (Véase tabla 2). Adicionalmente se han incluido los datos de un grupo de pacientes con SARS-2 de una cohorte multicéntrica posterior (marzo-septiembre del año 2020) de pacientes infectados por COVID-19.

GERMEN	TOTALES	Ingresados en UCI	No ingresados en la UCI (controles)	Mortalidad en la UCI	Intubados en VM	Mortalidad en VM
Gripe A N1H1	113	75	38	29,3 %	64	34,3%
Gripe A H3N2	40	33	7	30,3 %	22	45,4%
Gripe B	30	14	16	28,5 %	12	33,3%
Totales Gripe	183	122	61	29,5	97	37,1%
Bacteriana	176	176	-	40,8	140	47,8%

**Tabla 2:** Número de neumonías por microorganismos.

La mortalidad del grupo total de gripes fue de 29,5 % en la UCI y 31,9 % en el hospital y a los 90 días. Por tipo de cepas: los pacientes afectados de gripe H1N1 fallecieron en un 29,3%, los

H3N2 un 30,3% y las gripes B un 28,5% en la UCI, sin diferencias significativas. Sin embargo la mortalidad hospitalaria en los pacientes con gripe B fue del 50%, mayor que la gripe por H1N1 (29,3%) y que la H3N2 (30,3%). La mortalidad fue significativamente menor que en el grupo de neumonías bacterianas reclutadas en el mismo periodo de tiempo. Respecto al grupo de pacientes que no ingresaron en la UCI y permanecieron en Urgencias o en planta del hospital no se registró mortalidad.

La distribución por sexo en el grupo de la gripe fue: 55% hombres y 45 % mujeres. La edad media fue de  $56,3 \pm 14,9$  años. La mediana de puntuaciones de severidad fueron: SOFA: 7 (4-10); APACHE II: 18 (12-25) y SAPS II: 44,5 (28-59). Al ingreso en la UCI, se observó un trastorno de oxigenación significativo con una relación mediana de Pa / FiO<sub>2</sub> de 122 (77,5-209), sin diferencia en los grupos de mortalidad. Un 26% tenían antecedentes de inmunosupresión (SIDA, tratamiento con corticoides o fármacos inmunosupresores). El 5,7% tenían antecedentes de una patología onco-hematológica (mieloma y leucemia). Las características clínicas y demográficas del grupo de estudio, así como las diferencias en los grupos de supervivencia están en la tabla 3.

Variable	Neumonía por Virus de la Gripe en la UCI (n = 122)	Supervivientes Neumonía por Virus de la Gripe en la UCI (n= 86)	No supervivientes Neumonía por Virus de la Gripe en la UCI (n = 36)
Edad mediana (IQR)	57 (45-69)	55,5 (45-65)	61 (49-74) *
Hombres (%)	55%	52,3%	61 %
Mujeres (%)	45%	47,7%	39 % *
Apache II mediana (IQR)	18 (12-25)	15,5 (11-22)	22 (18-27,5) *
SAPS II mediana (IQR)	44,5 (28-59)	37 (26,5-52)	56,5 (45-64)*
SOFA mediana (IQR)	7 (4-10)	6 (3-8)	11 (9-12)*
Lactato (mMol/L) mediana (IQR)	1,4 (0,98-2)	1,3 (1,1-2,7)	2,16 $\pm$ 1,62

<b>Estancia en UCI. (Días) (mediana IQR)</b>	9 (5-22)	9,5 (6-22)	8 (4-22)
<b>Inmunodepresión (%)</b>	26,2 %	29 %	19,4 %
<b>Hematológicos (%)</b>	5,7 %	5,6 %	6,1 %
<b>IMC mediana (IQR)</b>	27,6 (24-32,5)	27 (23,7-33)	28,4 (23-35)
<b>Obesidad (IMC&gt;30) (%)</b>	32,4 %	29,2 %	39,4 % *
<b>Fumador / COPD (%)</b>	36,4 %	36,5 %	36,1 %
<b>Diabetes Mellitus (%)</b>	28,7 %	27,9 %	30,6 %
<b>PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> mediana (IQR)</b>	122 (77,5-209)	144,5 83-217)	91 (55-185) *
<b>Ventilación mecánica (%)</b>	79,5 %	70,9 %	100% *
<b>Días en VM mediana (IQR)</b>	6 (1,75-16)	5 (0-12)	9 (4,5-20,5) *
<b>Posición en prono (%)</b>	62%	40,3 %	66,4 % *
<b>Maniobras de reclutamiento (%)</b>	16,2 %	12,5 %	24,2 %
<b>Shock séptico (%)</b>	54,9 %	40,7 %	88,9 %*
<b>Corticoides (%)</b>	29,5 %	29,1 %	30,6 %
<b>Diuréticos (%)</b>	31,4 %	30,6 %	33 %
<b>Técnica continua de reemplazo renal (CRRT) (%)</b>	13,9 %	8,1 %	27,8 % *
<b>Coinfección %</b>	39,34%	36%	(47% *
<b>Sobreinfección %</b>	(21/122) 17%	(11/86) 12,8%	(10/36) 27%
<b>Gram + (%)</b>	18,32 %	11,2 %	33,3 % *
<b>Gram - (%)</b>	8,2 %	7 %	11,1% *
<b>Polimicrobiano (%)</b>	3,2 %	4,65 %	0 % *

Hongos (%)	3,2 %	1,16 %	8,33 %
------------	-------	--------	--------

**Tabla 3:** Características demográficas y clínicas de pacientes con neumonía severa causada por el virus de la influenza A y B. Comparación basada en la mortalidad en la Unidad de Cuidados Intensivos. Los datos se presentan como mediana (IQR); Los valores expresados en porcentajes (%) indican la proporción en el grupo total, en los subgrupos de sobrevivientes y no sobrevivientes. \* P <0.05

En los subgrupos de supervivencia de los pacientes con neumonías graves por virus de la influenza A N1H1 se observa aumento de la estancia en la UCI de 6 días de media (15 vs. 21) en los pacientes no supervivientes. Los parámetros más afectados son los respiratorios y hemodinámicos: deterioro de la oxigenación, necesidad de la VM, incidencia de shock así como la necesidad de las medidas terapéuticas como la ventilación en posición en prono, el reclutamiento alveolar, la necesidad de aminas y la necesidad de HFVVC. También fue mayor en los pacientes no supervivientes la incidencia de coinfección/reinfección (68 % vs 30,2 %) con un 22,7% de Gram+, un 18,2% de Gram - y 9% de hongos aislados. Véase la tabla 4.

Variable	Neumonía por Virus N1H1 en la UCI; n = 75	Neumonía por Virus N1H1 en la UCI; supervivientes. n= 53; (70.49%)	Neumonía por Virus N1H1 en la UCI; no supervivientes. n = 22; (29,33%)
Edad mediana (IQR)	53 (44-64)	52 ( 42,7-64)	55 (47-70)
Hombres (%)	49,3%	49,1%	50 %
Mujeres (%)	50,7%	50,9 %	50 % *
Apache II mediana (IQR)	17 (12-23)	15 (12-21,7)	21 (18-25) *
SAPS II mediana (IQR)	45 (27-56)	37 ( 27-51)	53,5 (45-60)*
SOFA mediana (IQR)	8 (8-5-10,7)	6 (4-9)	11 (8-12) *
Lactato (mMol/L) mediana (IQR)	1,43 (0,98-1,8)	6 (4-9)	1,6 (1,-2,5)
Estancia en UCI. (Días) mediana	13 (7-23)	11 (7-23)	14,5 (7-26)

<b>(IQR)</b>			
<b>Inmunodepresión (%)</b>	28,2 %	30,2 %	22,7 %
<b>Hematológicos (%)</b>	6,9 %	5,1 %	10,5 %
<b>IMC mediana (IQR)</b>	27 (23-32)	27 (24-33,3)	27 (23-30,3)
<b>Obesidad (IMC&gt;30) (%)</b>	31 %	33,3 %	26,3 %
<b>Fumador / COPD (%)</b>	32,4 %	34,6 %	27,3 %
<b>Diabetes Mellitus (%)</b>	21,3 %	20,8 %	22,7 %
<b>PaO2/FiO2 mediana (IQR)</b>	90 (60-146)	107 (72-178)	55 (46-90)*
<b>Ventilación mecánica (%)</b>	85,3 %	42 %	100% *
<b>Posición en prono (%)</b>	60,3%	48,7 %	84,2 % *
<b>Maniobras de reclutamiento (%)</b>	27,6 %	20,5 %	42,1 %
<b>Shock séptico (%)</b>	56 %	45,3 %	81,8 %*
<b>Corticoides (%)</b>	33,3 %	45,3 %	31,8 %
<b>Diuréticos (%)</b>	34,5 %	33,3 %	36,8 %
<b>Técnica continua de reemplazo renal (CRRT) (%)</b>	10,7 %	5,7 %	22,7 % *
<b>Coinfección</b>	(25/75) 33,3%	(16/53) 30,2%	(9/22) 41% *
<b>Sobreinfección</b>	(17/75) 22,6	(9/53) 17%	(8/22) 36,3% *
<b>Gram + (%)</b>	10,6 %	5,66 %	22,72 % *
<b>Gram – (%)</b>	10,6 %	7,54 %	18,18% *
<b>Polimicrobiano (%)</b>	4 %	5,66 %	0 % *
<b>Hongos (%)</b>	4 %	1,88 %	9 %
<b>Días en VM mediana (IQR)</b>	7,5 (4-17)	7 (3-16,2)	12 (5,7-22,5)*

**Tabla 4:** Características demográficas y clínicas de pacientes con neumonía grave causada por el virus de la influenza. Comparación de las características de las distintas cepas aisladas en la Unidad de Cuidados Intensivos. Los datos se presentan como mediana (IQR); Los valores expresados en porcentajes (%) indican la proporción en los subgrupos de cepas. \* P <0.05

En la tabla 5 se compara las características entre los subgrupos de neumonías graves por influenza ingresadas en la UCI. Se observa unos niveles significativamente disminuidos de PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> en los pacientes con neumonías por N1H1: 90 (60-146) frente a los 182 (120-268) en los subgrupos H3N2 y de 241 (150-305) en los afectados por gripe B. También los supervivientes en el grupo H1N1 mostraron mayores relaciones Pa / FiO<sub>2</sub> con una mediana de 107 (IQR 72-178) frente a 55 (IQR 46-90) mmHg (p < 0.01). De la misma forma se observa un alto porcentaje de VM tanto en los pacientes con gripe A N1H1 y tipo B con respecto a los afectados por la H3N2. Otros recursos que denotan la gravedad como la ventilación en pronos o las maniobras de reclutamiento es significativamente mayor en los pacientes con gripe A H1N1 así como el uso de corticoides y diuréticos, aunque no significativo.

El porcentaje de coinfección fue en los pacientes con gripe B de 57,4%, seguido de la H3N2 con un 45,4% y finalmente la H1N1 de 33,3%. Respecto a la sobreinfección, se dio en porcentajes similares en los pacientes con gripe H1N1 y B, (22,6% y 21% respectivamente) y 9% en la gripe H3N2.

Destacar el alto porcentaje de coinfección y sobreinfección de las gripes por virus influenza B fundamentalmente por bacterias Gram + ( 43%), manifestándose inicialmente con un alto porcentaje de situación de shock y necesidad de aminas ( 64%).

Variable	Neumonía por Virus de la Gripe A H1N1 en la UCI. n = 75	Neumonía por Virus de la Gripe A H3N2 en la UCI n= 33	Neumonía por Virus de la Gripe B en la UCI. n = 14
Edad mediana (IQR)	53 (44-64)	61 (53-67)	64,5 (59-74)*
Hombres (%)	49,3%	57,6%	78,6 % *
Mujeres (%)	50,7%	42,4%	21,4% *

<b>Apache II mediana (IQR)</b>	17 (12-23)	19 (11-27)5	21 (14-27)
<b>SAPS II mediana (IQR)</b>	45 (27-56)	43 (26,5-63)	48 (36-63)*
<b>SOFA mediana (IQR)</b>	8 (8-5-10,7)	7 (3-10,2)	7 (4-10)
<b>Lactato (mMol/L) mediana (IQR)</b>	1,4 (0,98-1,8)	1,3 (0,98-2,2)	1,7 (1-4,5)
<b>Estancia en UCI. (Días) mediana (IQR)</b>	13 (7-23)	6 (3,75-16,2)	6 (2-14)
<b>Inmunodepresión (%)</b>	28,2 %	21,2 %	28,6 %
<b>Hematológicos (%)</b>	6,9 %	0 %	14,3 %
<b>IMC</b>	27 (23-32)	28 (24-30)	29,5 (27-35)
<b>Obesidad (IMC&gt;30) (%)</b>	31 %	27,3 %	50 % *
<b>Fumador / COPD (%)</b>	32,4 %	42,4 %	42,9 %
<b>Diabetes Mellitus (%)</b>	21,3 %	39,4 %	43 %
<b>PaO2/FiO2 mediana (IQR)</b>	90 (60-146)	182 (120-268)	241 (150-305)*
<b>Ventilación mecánica (%)</b>	85,3 %	63,6 %	85,7% *
<b>Posición en prono (%)</b>	60,3%	36,4 %	28,6 % *
<b>Maniobras de reclutamiento (%)</b>	27,6 %	0 %	7,1 %
<b>Shock séptico (%)</b>	56 %	48,5 %	64,3 %*
<b>Corticoides (%)</b>	33,3 %	24,2 %	21,4 %
<b>Diuréticos (%)</b>	34,5 %	30,3 %	21,5 %
<b>Técnica continua de reemplazo renal (CRRT) (%)</b>	10,7 %	18,2 %	21,5 % *
<b>Coinfección</b>	33,3%	45,4%	57,4%
<b>Sobreinfección</b>	22,6	9%	21%
<b>Gram + (%)</b>	10,6 %	24 %	43 % *
<b>Gram - (%)</b>	10,6 %	0 %	14,3% *
<b>Polimicrobiano (%)</b>	4 %	3 %	0 % *
<b>Hongos (%)</b>	4 %	3 %	0 % *



**Tabla 5:** Características demográficas y clínicas de pacientes con neumonía severa causada por el virus de la influenza. Comparación basada en la mortalidad en la Unidad de Cuidados Intensivos. Los datos se presentan como mediana (IQR); Los valores expresados en porcentajes (%) indican la proporción en el grupo total, en los subgrupos de sobrevivientes y no sobrevivientes. \* P <0.05

Las infecciones por otros gérmenes durante la evolución de las gripes en UCI tuvo importante trascendencia en la evolución de las mismas, tanto al ingreso (coinfeción) como durante su evolución en la UCI, sobretodo relacionado con la VM y el uso de catéteres venosos centrales y arteriales.

En 48 pacientes se sospechó clínicamente y por la elevación de biomarcadores, sobretodo PCT, la existencia de coinfección en pacientes graves con influenza. Antes de iniciar antibioterapia empírica se realizaron cultivos. En 23 de ellos no se aisló germen. En 28 pacientes (58,3%) se aislaron gérmenes, con predominio de los Gram positivos (16) sobre los Gram- (2), en 3 pacientes se aislaron ambos y 2 pacientes con comorbilidad de inmunodepresión (hematológicos) se aislaron hongos. (Tabla 6)

Durante la estancia en la UCI en 24 pacientes se sospechó la existencia de re-infección. En 8 pacientes los resultados microbiológicos fueron negativos, en 16 (66%) se aislaron microorganismos con predominio de Gram negativos y en 4 pacientes se aislaron de forma de cultivo único de *Candida albicans*. (Tabla 6)

En un grupo de 11 pacientes coinfectados se sospechó reinfección mediante datos clínicos y de laboratorio durante su estancia en la UCI. En 6 de ellos se logró aislar el germen responsable de la reinfección.

En el subgrupo de pacientes H1N1 ingresados en UCI, en 25 pacientes se sospechó la incidencia de coinfección al ingreso. En 14 pacientes no se logró aislar germen y en 11 (44%) se aislaron 6 Gram positivos, 2 mixtos y 2 hongos. En 17 pacientes se sospecho reinfección durante su evolución y en 14 pacientes (82%) se aislaron gérmenes con predominio de los Gram negativos. (Tabla 7)

En cuanto a virus no se encontró ningún caso de coinfección ni sobreinfección vírica.

<b>Coinfección y reinfección en pacientes con influenza ingresados en la UCI</b>			
<b>COINFECCIÓN</b>		<b>SOBREINFECCIÓN</b>	
<b>GÉRMENES</b>	<b>nº de casos aislados</b>	<b>GÉRMENES</b>	<b>nº de casos aislados</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	<i>Candida albicans</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	<i>Krebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Krebsiella pneumoniae</i>	3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Enterococcus faecium</i>	2	<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Candida albicans</i>	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Candida glabrata</i>	1	<i>E. coli</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
		<i>Serratia marcescens</i>	1
		<i>Stenotrofomona maltophila</i>	1
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>Total</b>	<b>23</b>
Gram+	24	Gram+	8
Gram-	4	Gram-	11
Hongos	2	Hongos	4

**Tabla 6.** Relación de gérmenes aislados mediante distintos cultivos en los pacientes con Gripe ingresados en la UCI.

<b>Coinfección y reinfección en pacientes con influenza AN1H1 ingresados en la UCI</b>			
<b>COINFECCIÓN</b>		<b>SOBREINFECCIÓN</b>	
<b>GÉRMENES</b>	<b>nº de casos aislados</b>	<b>GÉRMENES</b>	<b>nº de casos aislados</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	<i>Krebsiella pneumoniae</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Krebsiella pneumoniae</i>	2	<i>Enterococcus faecium</i>	3
<i>Candida albicans</i>	2	<i>Candida albicans</i>	2

<i>Staphylococcus aureus</i>	1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
		<i>Serratia marcescens</i>	1
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>Total</b>	<b>17</b>
Gram+	9	Gram+	6
Gram-	2	Gram-	9
Hongos	2	Hongos	2

**Tabla 7.** Relación de gérmenes aislados mediante distintos cultivos en los pacientes con Gripe A N1H1 ingresados en la UCI.

## 5.1. BIOMARCADORES

Durante las primeras 24 horas de estancia hospitalaria se compararon los niveles de biomarcadores más usados en el control de los pacientes sépticos: lactato, PCR, PCT además de MR-proADM.

### 5.1.1. Comparación del nivel de biomarcadores en UCI en las neumonías por diferentes microorganismos.

Comparando los niveles de biomarcadores en el ingreso hospitalario los niveles de PCT en el grupo de gripe ingresados en la UCI fue de  $0,4 \mu\text{g} / \text{l}$  (IQR 0,2 - 2,11) valores inferiores de forma significativa a los controles de neumonía bacteriana ingresadas en UCI ( $2,7 \mu\text{g} / \text{l}$ ; IQR 0,2 - 2,1;  $p < 0,01$ ). Los niveles de PCR al ingreso fueron  $14,4 \text{ mg} / \text{dl}$  (IQR 7,2 - 24,2) en el grupo de las Gripe ingresadas en la UCI y  $7,9 \text{ mg} / \text{dl}$  (IQR 2,9 - 17,1) en el grupo de gripes no ingresados en la UCI ( $p < 0,01$ ). En los pacientes con neumonía bacterianas los niveles de PCR al ingreso fueron estadísticamente superiores  $23,9 \text{ mg} / \text{dl}$  (IQR 12- 34,5). Los valores de lactato al ingreso de los grupos de neumonías ingresadas en la UCI son  $1,6 \text{ mMol/l}$  (IQR 1,1- 3,3) en los pacientes con neumonía bacteriana y en los pacientes con gripes graves ingresados en la UCI de  $1,4 \text{ mMol/l}$  (IQR 0,9 - 2). Por su lado, las neumonías bacterianas presentaron unos niveles de IL-6 de  $100 \text{ pg} / \text{mL}$  (51,7-1000), mayores que las neumonías por gripe ( $44,56 \text{ pg/ml}$ ) y por otros virus  $36 \text{ pg/ml}$ .

Los niveles de MR-proADM en los pacientes por gripe ingresados en UCI fueron de  $0,998 \text{ nmol/l}$ , inferior de forma significativa a los encontrados en los pacientes graves con neumonía bacteriana ( $2,3 \text{ vs. } 0,9 \text{ nmol/l}$ ;  $p < 0,0001$ ) y superiores a los de los pacientes con gripe no ingresados en la UCI ( $0,9 \text{ nmol/l vs. } 0,3$ ;  $p < 0,01$ )(tabla 8). En la tabla 9 se exponen los valores controles en pacientes distintos al objeto de estudio.

Biomarcadores CONTROLES	Críticos SIRS (n=45)		Críticos no inflamados (n=15)		Voluntarios sanos (n=16)	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
MR-proADM (nmol/l)	1,4	0,5- 3,2	0,04	0,02- 0,1	0,02	0,02- 0,02
PCT (µg/l)	1,2	0,4- 1,9	0,1	0,1- 0,1	0,02	0,01- 0,03
IL6 (pg/ml)	120,7	87,4- 154	10,3	4,27- 24,3	1,6	1 - 2
PCR (mg/dl)	27,2	2,9- 31,7	0,96	0,4 - 3,92	0,3	0,2- 0,4
Ferritina	289	115,8- 1421	65,5	49- 110	78	67- 113
Lactato (mMol/l)	1,5	0,9- 1,6	0,8	0,7- 0,9	0,6	0,485 - 0,7

**Tabla 8:** Niveles de biomarcadores al ingreso en los pacientes con distintos tipos de neumonías ingresados en la UCI. Los datos se presentan como mediana (IQR).

Biomarcadores	Neumonías por gripes ingresados en UCI n=122		Neumonías por gripes no ingresados en UCI n=61		Significación estadística p
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
MR-proADM (nmol/l)	0,9	0,6- 1,9	0,3	0,08 - 0,66	< 0,01
Procalcitonina (µg/l)	0,4	0,2-2,1	0,1	0,09 - 0,21	< 0,01
PCR (mg/dl)	14,4	7,1-4,2	7,9	2,9 - 17,1	< 0,01
IL6 (pg/ml)	44,5	22,8-76,6	-	-	
Lactato (mMol/l)	1,4	0,9 - 2	0,8	0,6- 0,9	< 0,01

**Tabla 9:** Niveles de biomarcadores al ingreso en los distintos grupos de controles. Los datos se presentan con mediana (IQR)

### 5.1.2. Comparación de los niveles de biomarcadores en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI

Todos los valores de los biomarcadores fueron significativamente mayores en los pacientes ingresados en UCI por neumonía por gripe, que en aquellos ingresados en la planta: 0,9 vs. 0,3 nmol/L para la MR-proADM, 0,5 vs. 0,1µg/l para la PCT y 14,4 vs 7,9 mg/dl para la PCR (véase tabla 10).

Biomarcadores al ingreso	Neumonías bacteriana n=88		p	Neumonías por gripes ingresados en UCI n=122		Neumonías por otros virus	
	Median	IQR		Median	IQR	Median	IQR
MR-proADM (nmol/l)	2,3	1,2-3,8	<0,01	0,9	0,6- 1,9	1,9	0,7-2,4
PCT (µg/l)	2,78	0,75– 10	<0,01	0,5	0,2-2,1	0,8	0,2-,4
IL6 (pg/ml)	100	51,7-1000	0,011	44,56	22,87-76,66	36	23-50
PCR (mg/dl)	23,95	12 - 34,5	<0,01	14,4	7,2-4,2	12,2	5-21,5
Ferritina	549,4	341-678	0,029	274,7	47,8 -996,7	74,3	34,7- 786,5
Lactato (mMol/l)	1,6	1,08-3,3	ns	1,4	0,98 - 2	0,245	0,22-0,98

**Tabla 10:** Comparación de los niveles de biomarcadores al ingreso en los pacientes con neumonía por gripe ingresados en UCI y no ingresados en UCI. Los datos se presentan como mediana (IQR).

De los distintos tipos de gripe estudiados los niveles fueron siempre mayores en los afectados por el virus de la gripe A N1H1. Así en el momento del ingreso los niveles de MR-proADM en el grupo total de los pacientes estudiados con gripe A N1H1 fue de 0,9 nmol/l, los de gripe A H3N2 0,5 nmol/l y los de la gripe B 0,1 nmol/l; ambas diferencias fueron estadísticamente significativa.

Estas diferencias se mantuvieron tanto en los pacientes ingresados en UCI como en los que no ingresaron en la UCI en los que los niveles de MR-proADM fue mayor en los afectados por N1H1. (Véase Tabla 11 y 12).

Tipo de Gripe								
Biomarcadores al ingreso	H1N1		<i>p</i>	H3N2		<i>p</i> *	B	
	Median	25 - 75 P		Median	25 - 75 P		Median	25 - 75 P
MR-proADM (nmol/l)	0,9	0,5 - 1,6	< 0,01	0,5	0,104 - 1,358	< 0,01	0,1*	0,02 - 0,5
Procalcitonina (µg/l)	0,3	0,109 - 0,785	<i>ns</i>	0,3	0,102 - 4,728	0,016	1,2*	0,1 - 25
PCR (mg/dl)	13,1	7,5 - 22	< 0,01	7,1	2,5 - 19,1	<i>ns</i>	15,8*	6,7 - 25
IL6 (pg/ml)	61,2	32,65-94,49	< 0,01	22,9	16,18-37,6	0,04	40 *	17-58,5
Lactato (mMol/l)	1,4	0,9 - 1,8	<i>ns</i>	1,3	0,9- 2,2	<i>ns</i>	1,6*	1 - 3,9

**Tabla 11:** Niveles de Biomarcadores al ingreso en los pacientes con distintos tipos de neumonías ingresados en la UCI. Los datos se presentan como mediana (IQR).

	Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l			<i>p</i>
	Grupo completo	Ingresados en la UCI	No ingresados en la UCI	
Todas las Gripes	0,7 (0,2-1,4)	0,9 (0,5-1,6)	0,3 (0,08-0,6)	< 0,01
Gripe A H1N1	0,9 (0,6-1,7)	1,2 (0,8-2,6)	0,5 (0,2-0,9)	< 0,01
Gripe A H3N2	0,6(0,1-1,4)	0,8 (0,2-1,6)	0,1 (0,05-0,2)	< 0,01
Gripe B	0,1 (0,02-0,5)	0,5 (0,2-0,7)	0,02 (0,02-0,12)	< 0,01

**Tabla 12:** Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos ingresados en la UCI o en planta y de los grupos de las distintas cepas estudiadas. Los datos se presentan como mediana (IQR).

### 5.1.3. Comparación de los niveles de biomarcadores en las neumonías por gripe según la supervivencia

Respecto a los grupos de supervivencia, solo el grupo total de gripes y los pacientes con infección por cepas de la Gripe A H1N1 presentan una diferencia significativa mayor de valores de MR-proADM en los pacientes fallecidos, tanto en el análisis del grupo total de gripes (1,6 nmol/l vs. 0,7 nmol/l;  $p < 0,01$ ), como en aquellas que se ingresaron en la UCI (0,8 nmol/l vs. 2,5 nmol/l;  $p < 0,01$ ) (tabla 13).

	Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l			
	Grupo completo	Supervivientes	No supervivientes	<i>p</i>
Todas las Gripes	0,7 (0,2-1,4)	0,7 (0,2-1,1)	1,6 (1-3,2)	<0,01
Gripe A H1N1	0,9 (0,5-1,6)	0,8 (0,4-1,1)	2,5 (1,3-3,7)	<0,01
Gripe A H3N2	0,5 (0,1-1,3)	0,3 (0,1-0,8)	1,1 (0,2-730)	<i>ns</i>
Gripe B	0,1 (0,02-0,4)	0,1 (0,1-0,7)	0,4 (0,2-1,1)	<i>ns</i>

**Tabla 13:** Niveles de Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas.

En la tabla 14 se muestran los niveles de PCT en los grupos de supervivencia. Los valores son más elevados en todos los subgrupos de gripes aunque de forma significativa sólo en el grupo total (0,3 vs. 0,2,  $p < 0,01$ ) y en los pacientes del subgrupo de gripes N1H1 (0,3 vs. 0,2,  $p < 0,01$ ).

	Niveles de Procalcitonina al ingreso en $\mu\text{g/l}$			
	Grupo completo	Supervivientes	No supervivientes	<i>p</i>
Todas las Gripes	0,3 (0,1-1,2)	0,225 (0,1-1,6)	0,7 (0,3-11,1)	<0,01
Gripe A H1N1	0,3 (0,1 - 0,7)	0,2 (0,1-0,6)	0,7 (0,4-2,4)	<0,01
Gripe A H3N3	0,3 (0,1 - 4,7)	0,3 (0,1-1,7)	4,7 (0,1-17,6)	-
Gripe B	1,2 (0,1 - 2,5)	1,2 (0,1-25)	12,23 (0,2-62)	-

**Tabla 14:** Niveles de Procalcitonina al ingreso en  $\mu\text{g/l}$  del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas.

Los niveles de MR-proADM de los pacientes con Gripe A N1H1 son estadísticamente superiores a los otros grupos de paciente afectados por otras cepas (H3N2 y/o B) tanto en los supervivientes como en los no supervivientes. (Véase tabla 15).

	Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l. Gripes ingresadas en UCI			
	Grupo completo	Supervivientes	No supervivientes	<i>p</i>
Todas las Gripes	0,998 (0,600-1,934)	0,8537 (0,580-1,400)	1,676 (1,032-3,208)	0,0012
Gripe A H1N1	1,249 (0,826-2,640)	0,996 (0,826-2,640)	2,535 (1,386-3,754)	0,0001
Gripe A H3N2	0,780 (0,205-1,602)	0,701 (0,183-1,188)	1,157 (0,287-1,730)	<i>ns</i>
Gripe B	0,458 (0,181-0,738)	0,580 (0,181-0,738)	0,423 (0,254-1,159)	<i>ns</i>



**Tabla 15:** Niveles de Niveles de MR-proADM al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.

Los niveles de PCT son estadísticamente superiores en los pacientes no supervivientes tanto en el grupo de gripe total como en el subgrupo H1N1. En los subgrupos H3N2 y B, aunque no significativo también sus valores son mayores en los no supervivientes. De la misma forma ocurre con los valores de PCR e IL-6. (Véase tablas 16-18).

Niveles de Procalcitonina al ingreso en $\mu\text{g/l}$ en gripes ingresadas en UCI				
	Grupo completo	Supervivientes	No supervivientes	<i>p</i>
Todas las Gripes	0,4 (0,2-2,1)	0,4 (0,1-1,6)	0,7050 (0,3-11,09)	0,024
Gripe A H1N1	0,4 (0,2-1,2)	0,3(0,11-0,87)	0,595 (0,38-1,59)	0,03
Gripe A H3N2	0,4 (0,1-5,1)	0,3 (0,1-1,9)	4,7 (0,1-17,6)	-
Gripe B	2,5(0,4-34,3)	2,5 (0,85-34,3)	12,2 (0,299-62)	-

**Tabla 16:** Niveles de Procalcitonina al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.

Niveles de PCR al ingreso en nmol/l en gripes ingresados en la UCI				
	Grupo completo	Supervivientes	No supervivientes	<i>p</i>
Todas las Gripes	0,3 (0,1-1,2)	14,4 (7,5- 24,2)	7,93 (2,9-17,1)	<0,01
Gripe A H1N1	13,1 (7,54-22)	15,5 (9,17-24,9)	8,5 (3-17,3)	<0,01
Gripe A H3N2	7,1 (2,5-19,1)	7,7 (2,7-19,8)	3,8 (-)	<i>ns</i>
Gripe B	15,8 (6,7- 25)	17,3 (7,8-38)	5,3 (0,6-16)	<i>ns</i>

**Tabla 17:** Niveles de PCR al ingreso en nmol/l del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.

Niveles de IL6 al ingreso en pg/ml en gripes ingresados en la UCI				
	Grupo completo	Supervivientes	No supervivientes	<i>p</i>
Todas las Gripes	44,5 (22,8-76,6)	39,2 (21,8-70,2)	68,1 (33,5-90,6)	0,045
Gripe A H1N1	61,2 (32,6-94,4)	48,3 (28,1-74,1)	83 (64,9-146,7)	<0,01
Gripe A H3N2	22,9 (16,1-37,6)	25(17,8-45,8)	15(14,5-29,1)	<i>ns</i>
Gripe B	40(17-58,5)	19,5(15-51)	58,5(45-62)	<i>ns</i>

**Tabla 18:** Niveles de IL6 al ingreso en pg/ml del grupo total y la comparación de los niveles en los grupos de supervivencia total y de los grupos de las distintas cepas estudiadas ingresadas en la UCI.

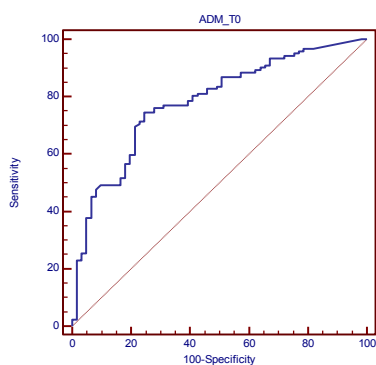
### 5.1.4. Análisis de las curvas ROC

Se realizó un análisis de la curva ROC para estudiar el valor pronóstico de los diferentes biomarcadores respecto a la severidad (ingreso en UCI y necesidad de ventilación mecánica). Para el grupo total de gripes el área bajo la curva AUC-ROC fue de 0,645 ( $p = 0,023$ ) para los niveles de PCR, 0,764 ( $p < 0,01$ ) para niveles de PCT y 0,781 para niveles de MR-proADM ( $p < 0,01$ ). El corte óptimo para la gravedad de la MR-proADM en el ingreso se estimó en 1.1 nmol / l, con una sensibilidad del 50% y una especificidad del 90% (tabla 19, Figura 4A).

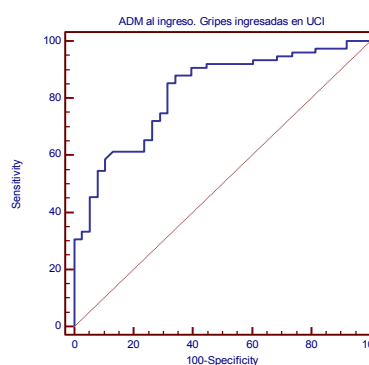
	AUC	Sensibilidad	Especificidad	Criterio
MR-proADM	0,781	50	90	>1,078
PCT	0,764	77	70,5	>0,17
PCR	0,645	58,2	70,5	>12

**Tabla 19:** Análisis de las curvas ROC para la severidad de los diferentes biomarcadores.

En el grupo Gripes H1N1 el área bajo la curva AUC-ROC para el pronóstico de gravedad fue de 0,685 ( $p < 0,01$ ) para los niveles de PCR, 0,775 ( $p < 0,01$ ) para niveles de PCT y 0,822 para niveles de MR-proADM ( $p < 0,01$ ). El corte óptimo de la MR-proADM en el ingreso se estimó en >1,1 nmol / l, con una sensibilidad del 55% y una especificidad del 90% (figura 6B).



**6.A.** Grupo total de gripes ingresadas en UCI



**6.B.** Subgrupo H1N1 ingresada en UCI

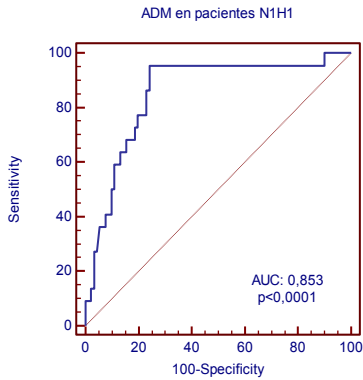
**Figuras 6:** Curvas ROC de MR-proADM para la gravedad.

El análisis de la curva ROC para pronosticar la mortalidad mostró los siguientes parámetros en el grupo total de pacientes con gripe: MR-proADM 0,753 ( $p < 0,01$ ), PCT 0,703 ( $p < 0,01$ ), CRP 0,61 ( $p = 0,033$ ) e IL-6 0,632.

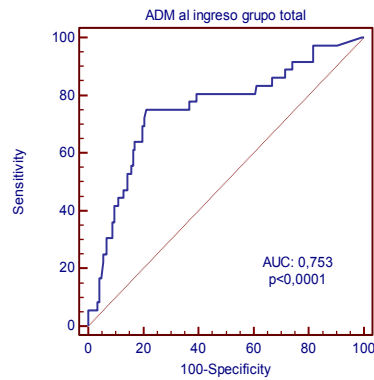
	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VP+	VP-	Criterio
<b>MR-proADM</b>	0,753	80	69,4	46,6	92,8	>1,2
<b>PCT</b>	0,703	86,1	55,4	34,8	93,5	>0,3
<b>PCR</b>	0,610	69,4	54,6	29,8	86,6	>12
<b>IL6</b>	0,632	67,8	61,29	44,2	80,9	>48,3

**Tabla 20:** Análisis de las curvas ROC para la mortalidad en UCI de los diferentes biomarcadores.

En el subgrupo de gripes H1N1 las AUC fueron: MR-proADM 0,8 ( $p < 0,01$ ), PCT 0,786 ( $p < 0,01$ ) y CRP 0,6 ( $p < 0,01$ ). El punto de corte óptimo de predicción de mortalidad para los niveles de MR-proADM en los pacientes con gripe N1H1 fueron  $\geq 1.2$  nmol / l, con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 75,82%, un VPP del 48,8% y el VPN del 98,6% (Figura 7).

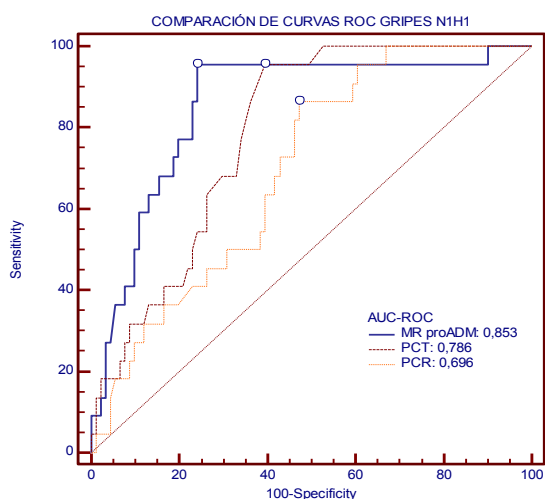


**7.A.** Grupo total de gripes ingresadas en UCI



**7.B.** Subgrupo H1N1 ingresada en UCI

**Figura 7:** Curva ROC de MR-proADM para la mortalidad.



**Figura 8:** Comparación de las curvas ROC de los biomarcadores en el grupo de gripes H1N1

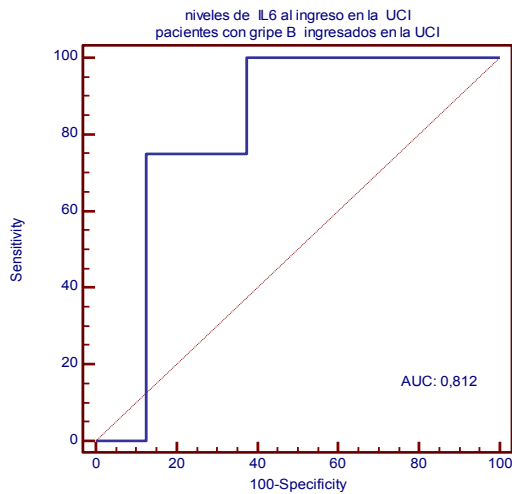
En el análisis por tipo de gripe, podemos destacar la MR-proADM tanto para la predicción de severidad y mortalidad en las gripes H1N1 y B, así como la IL-6 para la predicción de mortalidad de las gripes B, tablas 21-23.

	H1N1	H3N2	B
<b>MR-proADM</b>	0,822	0,820	0,846
<b>PCT</b>	0,775	0,712	0,821
<b>PCR</b>	0,685	0,727	0,768

**Tabla 21:** Análisis de las curvas ROC para la severidad de los diferentes biomarcadores para cada tipo de gripe.

	H1N1	H3N2	B
<b>MR-proADM</b>	0,853	0,665	0,726
<b>PCT</b>	0,786	0,612	0,571
<b>PCR</b>	0,696	0,508	0,518
<b>IL6</b>	0,711	0,720	0,812

**Tabla 22:** Análisis de las curvas ROC para la mortalidad en UCI de los diferentes biomarcadores para cada tipo de gripe.



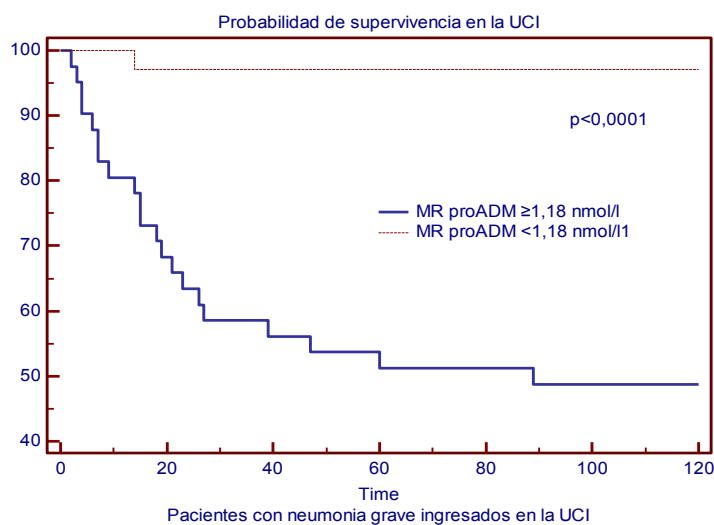
**Figura 9:** Curva ROC para los niveles de IL6 en los paciente con influenza B.

	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VP+	VP-	Criterio
<b>IL6</b>	0,812	100	62,5	57,5	100	>22

**Tabla 23** Análisis de las curvas ROC para la mortalidad en UCI para los niveles de IL6 en pacientes con gripe del tipo B.

### 5.1.5. Análisis de las curvas de supervivencia

Mediante el análisis las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que los pacientes con niveles de MR pro-ADM de  $\geq 1,18$  nmol/l y superiores en el ingreso hospitalario tenían aumento significativo de la mortalidad tanto en la UCI como hospitalaria ( $p < 0,01$ ) (Figura 10).



**Figura 10:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier

### 5.1.6. Análisis multivariante.

Se elaboró un modelo de riesgo proporcional de Cox, utilizando el método hacia atrás (backward), eliminando del modelo en cada paso las variables no significativas. Las variables dependientes utilizadas fueron la tasa de mortalidad en la UCI y a los 90 días y las variables independientes fueron: APACHE II, SOFA, edad, sexo; obesidad; inmunodepresión, cirugía, lactato, MR-proADM, PCT y PCR.

En el análisis univariado, el riesgo de mortalidad en la UCI y 90 días después del ingreso presentó asociaciones estadísticamente significativas con las siguientes variables: puntuación APACHE II, puntuación SOFA, PCR, PCT y MR-proADM niveles en la admisión.

En el análisis multivariado con el modelo de regresión de Cox realizado en el ingreso en la UCI, los niveles de PCT (HR: 1,05 ; IC95%: 1,-1,1) y MR-proADM (1,3; IC95%: 1,1 to 1,6) fueron factores estadísticamente significativos como predictores de mortalidad en UCI y solo los niveles de de MR pro-ADM (HR: 1,3; IC95%: 1,1-1,5) en la mortalidad hospitalaria (veáanse tablas 24 y 25).

Variable	Coficiente de regresión	Error estandar	p	Hazard Ratio	95% CI
Procalcitonina	0,048	0,016	<0,01	1,049	1,016 to 1,084
MR-proADM	0,286	0,080	<0,01	1,331	1,1389 to 1,556

**Tabla 24:** Análisis multivariante para la predicción de la mortalidad en la UCI.

Variable	Coficiente de regresión	Error estandar	p	Hazard Ratio	95% CI
MR-proADM	0,270	0,079	<0,01	1,310	1,121 to 1,530

**Tabla 25:** Análisis multivariante (Cox proportional hazards models) para la predicción de la mortalidad hospitalaria.

## 5.2. HIERRO Y PROTEÍNAS RELACIONADAS

### 5.2.1. Comparación de los niveles de hierro, ferritina y transferrina en UCI en las neumonías por diferentes microorganismos

La comparación de los niveles de ferritina entre las neumonías bacterianas y víricas, muestran un valor significativamente mayor en las bacterianas (549,4 ng/ml) frente a las neumonías por gripe ingresadas en la UCI 274,7 ng/ml. El hierro fue significativamente más bajas en las neumonías bacterianas ingresadas en UCI que en las neumonías por gripe (24 mg/dl vs. 66 mg/dl). De la misma forma la transferrina también es significativamente más baja en las bacterianas respecto a las gripes: 147 mg/ dl vs. 196 mg/ dl. (Véase tabla 26).

	Tipo de neumonía						
	Neumonía bacteriana		<i>p</i>	Neumonía por gripe ingresada en UCI		Neumonía por otros virus	
	Median	25 - 75 P		Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P
<b>Hierro</b>	24	21- 34	<0,01	66	32 - 91	84	36 - 100,5
<b>Transferrina</b>	147	133,7- 156	<0,01	196	142 - 272,25	245	180,5 - 265,3
<b>Ferritina</b>	549,4	341-678	0,029	274,7	47,8 - 996,7	74,3	34,8 - 786,6

**Tabla 26.** Comparación de los niveles de hierro, ferritina y transferrina en UCI en las neumonías por diferentes microorganismos

Respecto a los distintos subtipos de gripe, se encontraron diferencias significativas entre los afectados por la H1N1 y otros como la H3N2 y B. Los pacientes con gripe A N1H1 tuvieron niveles de ferritina superiores de forma significativas respecto a aquellos con N2H3 (304,75 vs. 63,65 ng/ml;  $p < 0,01$ ) y a los del grupo de las gripes B (304,75 vs. 64,25 ng/ml;  $p < 0,01$ ). (Véase tabla 27).



	Tipo de Gripes grupo total						
	H1N1		p	H3N2		B	
	Median	25 - 75 P		Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P
<b>Hierro</b>	54,5	23,5 - 85,	ns	82,5	67,5 - 116	84,5	66 - 127
<b>Transferrina</b>	207	151,5 - 267	ns	272,500	202- 322,5	248,5	217 - 287
<b>Ferritina</b>	304,8	78,2 - 1029	0,0002*	63,7*	32,6 - 147,6	64,3*	30,5 - 159,5

**Tabla 27.** Comparación de los niveles de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por diferentes tipos de gripe.

### 5.2.2. Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI

La diferencia en los valores de ferritina entre las neumonías por gripe que requirieron ingreso en UCI y en las que no, fueron estadísticamente significativa: 274,7vs. 95,4 ng/ml ( $p < 0,01$ ). (Véase tabla 28).

	Neumonías por gripe				p
	Ingresadas en UCI		No ingresadas en la UCI		
	Mediana	25 - 75 P	Mediana	25 - 75 P	
<b>Hierro</b>	66	32 - 91	74	49 - 118	ns
<b>Transferrina</b>	196	142,000 - 272,250	263,000	227- 290	ns
<b>Ferritina</b>	274,7	47,8- 996,7	95,4	33,9- 247	<0,01

**Tabla 28.** Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI.

En la comparación por subgrupos, la ferritina fue estadísticamente superior en los pacientes infectados por gripe A ingresados en la UCI. Estas diferencias se repiten de la misma forma en los pacientes que no ingresaron en la UCI y que permanecieron en Urgencias o en planta: 167,7 ng/ml; 52,4 ng/ml; 59,1 ng/ml, respectivamente) aunque sin significancia estadística. (Véase tabla 29).

Neumonías por gripe ingresadas en UCI							
	H1N1		p	H3N2			B
	Median	25 - 75 P		Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P
<b>Hierro</b>	43,5	24 - 79	ns	79	65,8 - 99	73	66 - 123
<b>Transferrina</b>	171,5	141 - 218	ns	273	194 - 323,5	240,5	182 - 272
<b>Ferritina</b>	558,1	180 - 1880	<0,01*	74,9*	30 - 206,6	64,3*	30,6 - 274,7

**Tabla 29.** Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las diferentes neumonías por gripe ingresadas en la UCI.

### 5.2.3. Comparación del valor del hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe según la supervivencia

Los niveles de ferritina fueron significativamente más elevados en los pacientes que fallecieron que en los supervivientes (670,1 ng/ml vs. 143,4 ng/ml;  $p=0,019$ ). (Véase tabla 30).

	Mortalidad grupo total de gripes				P
	Supervivientes		No supervivientes		
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
<b>Hierro</b>	71,000	43,250 - 106,500	55,000	31,250 - 90,750	ns
<b>Transferrina</b>	244,000	178,250 - 284,750	182,000	127,000 - 284,250	ns
<b>Ferritina</b>	143,400	36,450 - 378,425	670,100	94,625 - 2613,750	0,0119

**Tabla 30.** Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe ingresadas según la supervivencia.

Esta diferencia es más evidente y significativa en los pacientes afectados por la cepa N1H1 (tabla 31). Los niveles en los supervivientes fue de 245 ng/ml (50,9-544) y en los fallecidos de 1922,2 ng/ml (710,3-6077,3) ( $p<0,01$ ). Los pacientes afectados por las otras dos cepas, aunque

los niveles fueron más elevados en los fallecidos que en los supervivientes, las diferencias no fueron significativas.

	Mortalidad de las gripes H1N1				p
	Supervivientes		No supervivientes		
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
<b>Hierro</b>	58	22,8 - 85,3	33	27,5 - 67,5	ns
<b>Transferrina</b>	220	156 - 272,5	162	117,3 - 195,3	ns
<b>Ferritina</b>	245	50,9 - 544,1	1922,2	710,3 - 6077,3	<0,01

**Tabla 31.** Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en el hospital según la supervivencia.

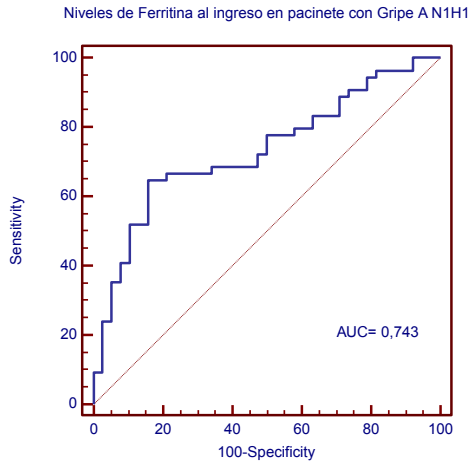
Esta diferencia significativa también se encuentra en los pacientes ingresados en la UCI en el grupo de neumonías graves por gripe A H1N1 (380,7 vs. 1922,2 ng/ml;  $p < 0,01$ ). Sin embargo, tanto los pacientes con infecciones por virus H3N2 y por virus B no mostraron diferencias significativas en los grupos de supervivencia (tabla 32).

	Exitus UCI gripe H1N1 UCI				p
	supervivientes		No supervivientes		
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
<b>Hierro</b>	54	22 - 83,5	33	27,5 - 67,5	ns
<b>Transferrina</b>	180	142,250 - 229,750	162	117,3 - 195,3	ns
<b>Ferritina</b>	380,7	118,3 - 961,6	1922,2	710,3 - 6077,3	<0,01

**Tabla 32.** Comparación del nivel de hierro, ferritina y transferrina en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según la supervivencia.

### 5.2.4. Análisis de las curvas ROC

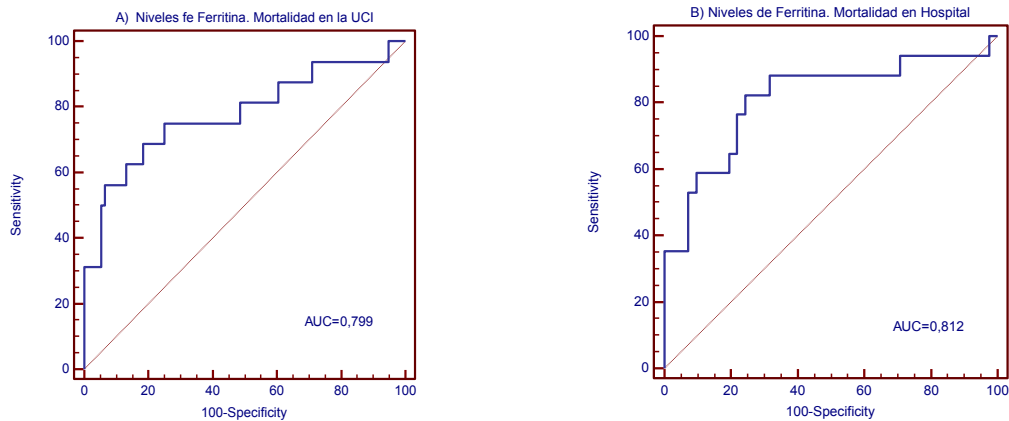
El área bajo la curva (AUC) para el pronóstico de gravedad (ingreso en la UCI) fue de 0,743 ( $p < 0,01$ ) para los niveles de ferritina en los pacientes con Gripe A N1H1, 0.561 para los pacientes con Gripe tipo A H3N2 y de 0.509 para los tipos B. (Figura 11)



	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VP+	VP-	Criterio
<b>Ferritina</b>	0,743	65,5	84,2	85,4	62,7	>325,2

**Figura 11:** Curva ROC de los niveles de Ferritina en los pacientes con Gripe A N1H1 para el pronóstico de gravedad.

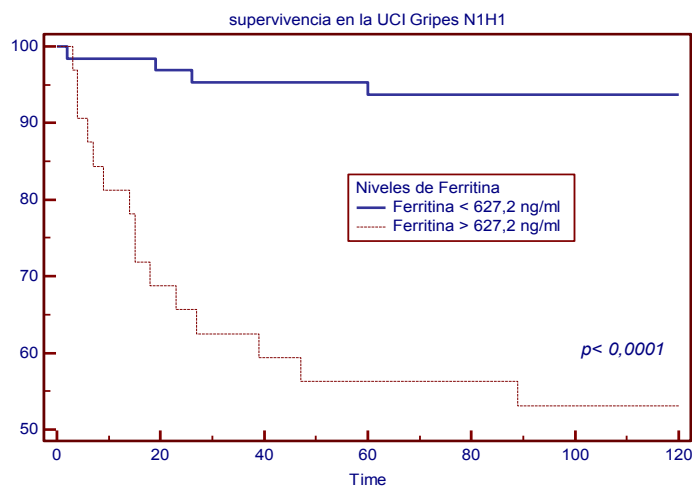
El área bajo la curva (AUC) para el pronóstico al ingreso de mortalidad en la UCI fue de 0,799 ( $p < 0,01$ ) y de 0,812 para pronosticar al ingreso la muerte hospitalaria en los pacientes con Gripe A H1N1 para punto de corte de 780 ng / ml (80% de sensibilidad y 83,54% especificidad). (Figura 12).



**Figuras 12:** Curva ROC de los niveles de Ferritina en los pacientes con Gripe A N1H1 para detectar: A el ingreso en la UCI; B para detectar la mortalidad hospitalaria.

### 5.2.5. Análisis de las curvas de supervivencia

En la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, niveles de ferritina igual o superiores a 627 ng / ml mostraron un aumento significativo de la mortalidad en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $p < 0.01$ ). (Figura 13).



**Figura 13:** Curva de supervivencia Kaplan Meyer para la ferritina.

### 5.2.6. Análisis multivariante

Se elaboró un modelo de riesgo proporcional de Cox, utilizando el método hacia atrás (backward), eliminando del modelo en cada paso las variables no significativas. Las variables dependientes utilizadas fueron la tasa de mortalidad en la UCI y a los 90 días y las variables independientes fueron: edad, sexo; obesidad; inmunodepresión, cirugía, niveles de hierro, transferrina y de ferritina al ingreso

En el grupo total de gripes y en el grupo H1N1, tanto la ferritina como los niveles transferrina al ingreso fueron predictores estadísticamente significativos de mortalidad al ingreso en el hospital, no siéndolos en el análisis de H3N2 y B (Tablas 33 y 34).

Covariables	Coefficiente de regresión	Error estandar	P	Hazard Ratio	95% CI
Ferritina	0,0001316	0,00003161	<0,01	1,0001	1,0001 to 1,0002
Transferrina	-0,005923	0,002574	0,021	0,9941	0,9891 to 0,9991

**Tablas 33.** Análisis multivariante. Predictores de mortalidad al ingreso del Hospital de las neumonías por gripe.

Covariables	Coefficiente de regresión	Error estandar	P	Hazard Ratio	95% CI
Ferritina	0,0001397	0,00003445	<0,0001	1,0001	1,0001 to 1,0002
Transferrina	-0,009499	0,004657	0,0414	0,9905	0,9816 to 0,9996

**Tablas 34.** Análisis multivariante. Predictores de mortalidad al ingreso del Hospital de las neumonías por H1N1.

### 5.3. INMUNIDAD E INFLAMACIÓN

#### 5.3.1. Comparación de la inmunidad de las neumonías ingresadas en UCI por diferentes microorganismos

Como muestra la tabla 35, la cifra de leucocitos media de los pacientes con neumonía por gripe al ingreso en UCI fue inferior a las cifras de los pacientes con neumonías bacteriana (15.930 vs. 9.370;  $p < 0,01$ ). Las cifras de linfocitos y monocitos, aunque fueron superiores en las neumonías bacterianas no llegaron a la significación estadística. En las subpoblaciones linfocitarias se encontró unos valores significativamente menores en las neumonías bacterianas respecto a las víricas del número de CD3+ (333 vs. 453;  $p = 0,033$ ) y CD4+ (158,9 vs. 265,3;  $p = 0,03$ ). Los valores de CD56 tanto relativos como absolutos fueron significativamente menores en las neumonías por gripes ingresadas en UCI que en las bacterianas (14,4% vs. 9,9%,  $p = 0,01$ ; 125,5 vs. 72,2,  $p = 0,04$ ).

	Neumonías ingresadas en la UCI						
	Bacterianas ingresadas en UCI (n=50)			Gripes ingresadas en la UCI (n=122)		Neumonías por otros virus en UCI (n=6)	
	Median	25 - 75 P	P	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P
<b>Leucocitos(cél/μl)</b>	15.930	7.390 – 22.700	$<0,01$	9.370	5.500 – 16.000	13.500	13.500 – 13.500
<b>Granulocitos(cél/μl)</b>	10.771	5,393 - 16,913	<i>ns</i>	7.791	4,238 - 13,379	11.948	11.948 – 11.948
<b>Monocitos(cél/μl)</b>	670	259 – 1.304	<i>0,088</i>	484	209 - 842	513	513 - 513
<b>Linfocitos(cél/μl)</b>	900	440 – 1.532	<i>ns</i>	741	470-1.111	810	810 - 810
<b>TCD3+ (%)</b>	67	52 - 79	<i>ns</i>	70	55,7-76,2	68,1	62 - 74,2
<b>TCD3+ (cél/μl)</b>	303	25-662	<i>0,033</i>	453	264,6-808,2	502	-
<b>TCD4+ (%)</b>	35,6	26,4 - 47,7	<i>ns</i>	40,7	29,8 - 51,04	50,9	45 - 56,9
<b>TCD4+ (cél/μl)</b>	158,6	15-454,3	<i>0,03</i>	265,3	145-476,7	364	-
<b>TCD8+ (%)</b>	25	18,1 - 33,625	<i>ns</i>	21,9	15,5-30,5	16,9	16,9 - 17
<b>TCD8+(cél/μl)</b>	129,8	9,3-228,45	<i>ns</i>	147	95-256,7	137,7	
<b>CD4/CD8 ratio</b>	1,6	0,9 - 2,4	<i>ns</i>	1,8	1,1 - 2,9	3	2,7 - 3,4
<b>T(CD4-/CD8-) %</b>	0,4	0,0 - 1,8	$<0,01$	1,6	0,5 - 2,7	0,0	0,0 - 0,3

T(CD4-/CD8-) n°	0	0,0-9,7	<0,0 1	10,6	3,1-23,2	0,0	0,0-1,1
BCD19+ (%)	10,6	7,250 - 17,4	<0,0 1	16,8	10,1 - 24,9	7,1	4,2 - 10
BCD19+ (cél/μl)	91,6	8,42-215,48	ns	101,2	56,3-236,6	81	-
NK CD56+ (%)	14,4	7,6 - 22,175	0,019	9,9	5,3 - 16,7	23	21 - 25
NK CD56+ (cél/μl)	126,5	62,9-160,3	0,048	72,2	34,7-152,8	202,5	-
HLA-DRmonocitos (MFI)	3315	642 - 6315	ns	2166	1128,5-3787,5	897,5	206 - 1589
IgA (mg/dL)	172	133,5 - 293	ns	246	195,75-276,25	134	92 - 211,25
IgG (mg/dL)	828	600,5 - 940,5	<0,0 1	1134	977 - 1398,5	1070	638 - 1292
IgM(mg/dL)	55	43,250 - 82,25	<0,0 1	153	109,5 - 189,25	152	74 - 175,3

Tabla 35: Comparativa del estado inmunitario de todas las neumonías ingresadas en la UCI.

### 5.3.2. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI

En el grupo de las neumonías por gripe, 122 pacientes fueron ingresados en la UCI y 61 pacientes ingresaron en planta o en Urgencias. En la Tabla 36 se resumen los resultados de los parámetros de la inmunidad.

	Gripes ingresadas en UCI (n=122)		Gripes no ingresadas en uci (n=61)		p
	Mediana	25 - 75 P	Mediana	25 - 75 P	
Leucocitos(cél/μl)	9.370	5.500 – 16.000	7.400	5.272 – 10.845	ns
Granulocitos(cél/μl)	7.791	4.238 – 13.379	5.219	3.263 – 8.481	ns
Monocitos(cél/μl)	484	209 - 842	580	398 - 841	0,013
Linfocitos(cél/μl)	741	470 – 1.111	1.342	767 – 1.927	<0,01
TCD3+ %	70	55,675 - 76,175	70,6	62,450 - 77,025	ns
TCD3+ (cél/μl)	473,45	264,59-808,2	874	483,9-1416,59	<0,01
TCD4+ %	40,700	29,819 - 51,047	34,133	26,759 - 43,032	ns
TCD4+ (cél/μl)	265,4	145,01-476,77	406,58	207,96-728	<0,01
TCD8+ %	21,889	15,531 - 30,451	28,7	22,695 - 35,046	ns



<b>TCD8+ (cél/μl)</b>	147,4	95,04-256,68	365,4	149,84-621,88	<0,01
<b>CD4/CD8 ratio</b>	1,8	1,1 - 2,9	1,2	0,9 - 1,7	<i>ns</i>
<b>T(CD4-/CD8-) %</b>	1,6	0,445 - 2,725	1,66	0,2 - 4,3	<i>ns</i>
<b>T(CD4-/CD8-) n°</b>	10,6	3,1 to 23,2	12	1,6-56,6	<i>ns</i>
<b>BCD19+ %</b>	16,8	10,1 - 24,9	10,4	6,250 - 14,9	<0,01
<b>BCD19+(cél/μl)</b>	101,3	56,3-236,6	118,2	64,8-201,1	<i>ns</i>
<b>NK CD56+ %</b>	9,9	5,3 - 16,7	14,4	6,3 - 21,5	0,024
<b>NK CD56+(cél/μl)</b>	72,2	34,8-152,8	138,2	53,5-380	<0,01
<b>HLA-DR monocitos (MFI)</b>	2198	1207,3 - 3929,8	7118	3768,8 - 9769,8	<0,1
<b>IgA (mg/dL)</b>	246	195,8 - 276,3	172	101,3 - 264,5	<0,01
<b>IgG (mg/dL)</b>	1134	977 - 1398,5	1260	974,8 - 1418	<i>ns</i>
<b>IgM (mg/dL)</b>	153	109,5 - 189,3	104	88,8 - 148,8	0,012

**Tabla 36:** Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe según el ingreso en UCI

Tanto las cifras de leucocitos como de granulocitos aunque superiores en los pacientes ingresados en UCI no fueron estadísticamente significativos. Esta cifra es menor en los pacientes sin coinfección bacteriana (70 de 122) en las que la cifra es de 8.500 leucocitos con 6.739 PMN. Los pacientes ingresados en la UCI presentan una cifra de linfocitos estadísticamente menor que los no ingresados (741 vs. 1.342  $p < 0,01$ ), así como de monocitos (484 vs. 580;  $p = 0,013$ ). También la expresión de HLA-DR en monocitos (células CD14+) al ingreso fue de 2198 MFI en los pacientes ingresados en la UCI y de 7118 MFI en el CG ( $p < 0,01$ ).

	Gripes H1N1 ingresadas en UCI (N=75)		Gripes H1N1 no ingresadas en UCI (N=38)		p
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
<b>Leucocitos (cél/μl)</b>	7.500	4.455 – 13.225	6.775	4.670 – 11.180	ns
<b>Granulocitos (cél/μl)</b>	5.965	2.870 – 10.308	5.251	2.830 – 8.810	ns
<b>Monocitos (cél/μl)</b>	315	151 - 648	560	405 - 906	<0,01
<b>Linfocitos (cél/μl)</b>	710	385 - 905	1.030	569 – 1.740	<0,01
<b>TCD3+ %</b>	72,3	62,4 - 75,9	69,8	63,1 - 76,9	ns
<b>TCD3+ (cél/μl)</b>	460,2	232,1-666,8	796,3	450,7-1254,9	<0,01
<b>TCD4+ %</b>	44,8	32,2 - 52,9	36,1	27,8 - 42,3	ns
<b>TCD4+ (cél/μl)</b>	260,7	121,8-464,2	383,1	206,3-652,7	ns
<b>TCD8+ %</b>	21,8	17,1 - 30	28,7	24,9 - 33,7	ns
<b>TCD8+ (cél/μl)</b>	138,2	73,2-195,2	292,3	134,6-546,1	<0,01
<b>TCD4/CD8 ratio</b>	2,1	1,4 - 2,9	1,3	0,9- 1,6	<0,01
<b>T(CD4-CD8-) %</b>	1,700	0,0 - 3,7	2,4	-0,1- 5,2	ns
<b>T(CD4-CD8-) n°</b>	9,7	0,0-21,2	14,3	-1,6-63,1	ns
<b>BCD19+ %</b>	15,7	11,0 - 24,2	11,6	6,3 - 16,6	<0,01
<b>BCD19+ (cél/μl)</b>	88,6	52,2-137,6	93,8	45,08-186,92	ns
<b>NK CD56+ %</b>	10,300	5,000 - 14,400	12,5	6,1 - 19,4	ns
<b>NK CD56+ (cél/μl)</b>	56,4	21,9-134,8	113,1	45,01-271,4	<0,01
<b>Expresión de HLA- DR en monocitos (MFI)</b>	1408	824 - 2729.	7854,5	5019 - 12515	<0,01
<b>IgA (mg/ dL)</b>	250	207 - 274	160,5	98 - 266	0,013
<b>IgG (mg/ dL)</b>	1131	1076 - 1370	1323	1013 - 1445	ns
<b>IgM (mg/dL)</b>	160,5	125 - 189	108,5	93 - 151	<0,01

**Tabla 37.** Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe N1H1 según el ingreso en UCI

En el estudio de las subpoblaciones linfocitarias se observa en los pacientes ingresados en UCI un menor número de CD3 (473 vs. 874; p<0,01), CD4 (265 vs. 406; p<0,01) y CD8 (147 vs.

365;  $p < 0,01$ ). No se observan diferencias significativas en la relación CD4/CD8. Los valores relativos de CD19 en los pacientes ingresados en la UCI fueron estadísticamente superiores en los pacientes ingresados en la UCI (16,8 vs. 10,4;  $p < 0,01$ ), no siendo estadísticamente significativos su valor absoluto. También lo fueron las concentraciones de IgA (246 vs. 172;  $p < 0,01$ ) e IgM (153 vs. 104;  $p < 0,01$ ). Las cifras con IgG fueron similares en ambos grupos. Las subpoblaciones de CD56 fueron inferiores en los pacientes ingresados en la UCI CD56 tanto en cifras relativas (9,9 vs. 14,4;  $p = 0,024$ ) como absolutas (72 vs. 138;  $p < 0,01$ ).

En el subgrupo de neumonías por H1N1 (tabla 37) no se observa diferencias en las cifras de leucocitos ni granulocitos entre los pacientes ingresados en la UCI y el grupo control. Sin embargo, si hay diferencias significativas en las cifras de linfocitos y monocitos de la misma forma que en el grupo total de gripes, siendo muy significativa la diferencia de expresión de HLA-DR (+CD14) que fue de 1408 MFI en los pacientes ingresados en la UCI y de 7854,5 MFI en el CG ( $p < 0,01$ ).

En el estudio de las subpoblaciones linfocitarias se observan una diferencia significativa en los valores de CD3 (460 vs. 796;  $p < 0,01$ ) y CD8 (138 vs. 292;  $p < 0,01$ ). La cifra de CD4 también es inferior pero no significativa. La relación CD4/CD8 si mostró aumento significativo en los pacientes de UCI (2,1 vs. 1,3;  $p < 0,01$ ). Los valores relativos de CD19 fueron estadísticamente superiores (15,7 vs. 11,6;  $p < 0,01$ ) en los ingresados en UCI por H1N1, así como los niveles de IgA (250 vs. 160;  $p = 0,01$ ) e IgM (160,5 vs. 108,5;  $p < 0,01$ ). El número de CD56 también fueron estadísticamente inferiores (56,4 vs. 113,1;  $p < 0,01$ ). En los pacientes afectados por la cepa H3N2, con un porcentaje importante de comorbilidad y/o coinfección se observa un aumento de las cifras de leucocitos, granulocitos y linfocitos. Respecto a la expresión de HLA-DR (+CD14) fue menor en los pacientes ingresados en la UCI (2615 vs. 5351;  $p = 0,04$ ). Los pacientes infectados con la cepa B muestran un aumento de la cifra de leucocitos y granulocitos y de los linfocitos CD19 de forma significativa con aumento no significativo de la IgM.

### 5.3.3. Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe según la supervivencia

Comparando todos los pacientes incluidos con gripes (183) se observa que la diferencia significativa entre los grupos de supervivencia está en la cifras de monocitos y linfocitos. En los supervivientes la cifra de monocitos es significativamente mayor que en los fallecidos (560 vs 254;  $p=0,0130$ ), así como la expresión HLA-DR (+CD14) fue también mayor en los pacientes supervivientes (3621 vs. 2376;  $p<0,01$ ). La cifra de linfocitos también es mayor en los supervivientes (891 vs. 538;  $p=0,016$ ). En el estudio de las subpoblaciones linfocitarias se observa en los no supervivientes un menor número de CD3 (260,8 vs. 602,1;  $p<0,01$ ), CD4 (220 vs. 351,4;  $p<0,01$ ) y CD8 (136 vs. 230,3,  $p<0,01$ ). En las subpoblaciones se observa un aumento significativo del porcentaje de +CD56 en los supervivientes (12% vs 7%;  $p=0,0243$ ) así como del número de células (98,8 vs. 48,1;  $p<0,01$ ). Al contrario, el porcentaje de +CD19 fue mayor en los pacientes que fallecieron tanto en la UCI como en el hospital (20,2% vs 12%;  $p<0,01$ ). Los niveles de IgA e IgM también fueron significativamente mayores en los pacientes que fallecieron (tabla 38).

Todas las gripes estudiadas (183)					
	Supervivientes (147)		No supervivientes (36)		P
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
<b>Leucocitos(cél/μl)</b>	8.700	5.695 – 13.258	8.605	4.000 – 18.180	ns
<b>Granulocitos(cél/μl)</b>	6.450	3.807 – 10.638	8.105	3.375 – 15.418	ns
<b>Monocitos(cél/μl)</b>	560	330 - 857	254	166 - 701	0,013
<b>Linfocitos(cél/μl)</b>	891	583 – 1.688	538	287 – 1.010	0,016
<b>TCD3+ %</b>	68,9	59,9 - 77,2	71,9	58,6 - 75,4	ns
<b>TCD3+ (cél/μl)</b>	602,1	376,99-1.139,3	260,8	194,6-683,4	<0,01
<b>TCD4+ %</b>	37,3	27,8 - 48,8	38,000	30,5 - 46,48	ns
<b>TCD4+ (cél/μl)</b>	351,4	200,9-629,6	220	99-489,2	0,013
<b>TCD8+ %</b>	26,4	18,064 - 33,289	22,270	14,2 - 32,2	ns
<b>TCD8+ células</b>	230,3	123,2-476,7	136	76,4-196,7	<0,01
<b>CD4/CD8 ratio</b>	1,6	0,9 - 2,5	1,7	1,1 - 3,7	ns

T(CD4-/CD8-) %	1,6	0,1 - 3,7	1,680	0,3 - 2,7	ns
T(CD4-/CD8-) n°	12	0,9-38,54	9,7	0,3-20,1	ns
BCD19+ %	12,8	7,3 - 19,9	20,2	11,5 - 24,5	<0,01
BCD19+ células	118	64,8-204,8	68,9	36,2-243,4	ns
NK CD56+ %	12	6,4 - 19,5	7	4,6 - 13,6	0,024
NK C56+ células	98,8	49,6-258,9	48,1	17,9-84,8	<0,01
HLA-DR en monocitos (MFI)	3621	1654,3 - 7229	2376	955 - 3.907,8	<0,01
IgA (mg/dL)	213	143,3 - 263	268	205,5 - 288	<0,01
IgG (mg/ dL)	1.148	983 - 1.365	1370	974 - 1.501	ns
IgM /mg/ dL)	128	96 - 168	176	111,3 - 226	0,012

**Tabla 38:** Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe según la supervivencia

La comparación de las gripes ingresadas en la UCI (122) respecto a la mortalidad (tabla 39) mostraron una significativa mayor cifra de monocitos (540 vs. 254,  $p=0,051$ ) y linfocitos (756 vs. 538,  $p=0,039$ ) y en los niveles de IgA (222,5 vs. 268,  $p=0,034$ ), así como el número de CD3 (591 vs. 360,8,  $p=0,039$ ) y CD56 (88,54 vs.48,10,  $p<0,01$ ).

	Gripes ingresadas en la UCI (n= 122)				<i>p</i>
	Supervivientes (86)		No supervivientes (36)		
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
Leucocitos(cél/μl)	9.820	6.200 – 15.060	8.605	4.000 – 18.180	<i>ns</i>
Granulocitos(cél/μl)	7.740	4.840 – 13.270	8.105	3.375 – 15.418	<i>ns</i>
Monocitos(cél/μl)	540	322 - 860	254	166 - 701	<i>0,051</i>
Linfocitos(cél/μl)	756	540 – 1.111	538	287 – 1.010	<i>0,026</i>
TCD3+ %	68,3	55,6 - 77,7	71,9	58,6 – 75,4	<i>ns</i>
TCD3+ (cél/μl)	591,3	325,5-825,7	360,8	194,6-683,5	<i>0,039</i>
TCD4+ %	41,3	28,9 - 51,9	38	30,5 - 46,5	<i>ns</i>
TCD4+(cél/μl)	280	170,4-473,1	220	99-489,2	<i>ns</i>
TCD8+ %	21,5	16,9 - 30,2	22,2	14,2 - 32,2	<i>ns</i>
TCD8+(cél/μl)	154	100,4-294,4	136	76,3-196,7	<i>ns</i>
CD4/CD8 ratio	2,1	1,2 - 2,8	1,7	1 - 3,7	<i>ns</i>
T(CD4-/CD8-) %	1,4	0,5 - 2,8	1,7	0,3 - 2,7	<i>ns</i>

T(CD4-/CD8-) n°	12,1	3,8-24,6	9,7	0,3-20,1	ns
BCD19+ %	15,7	9,7 - 25	20,2	11,6 - 24,5	ns
BCD19+(cél/μl)	111,4	70,6-220	68,8	36,2-243,4	ns
NK CD56+ %	11,7	6,500 - 18,1	7	4,550 - 13,6	ns
NK CD56+ (cél/μl)	88,5	47,58-160,5	48,1	17,9-84,8	<0,01
HLA-DR en monocitos (MFI)	2152,5	1285 - 4025,5	2376	955 - 3907,8	ns
IgA (mg/dL)	222,5	195 - 260	268	205,5 - 288	0,034
IgG (mg/ dL)	1127	998 - 1276	1370	974 - 1501	ns
IgM (mg/dL)	152	108 - 185	176	111,3 - 226	ns

**Tabla 39:** Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según la supervivencia

Para los pacientes ingresados en la UCI por neumonía grave por la cepa H1N1 la mortalidad en UCI y hospitalaria fue la misma. En la tabla 40 se muestra el estado inmunitario según la supervivencia. Las diferencias significativas en los componentes de la fórmula leucocitaria nuevamente se muestran en los monocitos y los leucocitos. La cifra de monocitos son el doble en los supervivientes (450 vs. 220;  $p=0,013$ ) y la expresión de HLA-DR (+CD14) fue también mayor en los pacientes supervivientes (1662 vs. 962;  $p=0,032$ ). La cifra de linfocitos fue estadísticamente superior en los pacientes supervivientes (751 vs. 387;  $p<0,01$ ). De los componentes de la subpoblaciones se observa en los pacientes que fallecieron un menor número de CD3 (247,18 vs. 520,8;  $p<0,01$ ), CD4 (150,31 vs. 323,61;  $p=0,01$ ) y CD8 (95,33 vs. 151,38;  $p<0,01$ ). Se encontró también diferencia estadísticamente significativa en porcentaje (5 vs. 12;  $p=0,0096$ ) y número de CD56 (21,97 vs 91,43;  $p<0,01$ ). Los niveles de IgM fueron significativamente mayores en los pacientes no supervivientes (178 vs. 152;  $p<0,01$ ).

Gripes H1N1 ingresadas en la UCI					
	Supervivientes UCI (n=53)			No supervivientes UCI (n=22)	
	Mediana	25 - 75 P	Mediana	25 - 75 P	p
Leucocitos(cél/μl)	7.920	4.923 – 13.715	5.160	2.700 – 11.320	ns
Granulocitos(cél/μl)	6.349	3.122 – 10.239	4.965	1.460 – 10.400	ns
Monocitos(cél/μl)	450	168 - 727	220	135 - 258	0,013

Linfocitos(cél/μl)	751	508 – 1.026	387	175 - 680	<0,01
TCD3+ %	70,7	60,9 - 76,7	72,7	67,2- 75,9	ns
TCD3+ (cél/μl)	520,8	271,3-809,1	247,2	84,6-446,8	<0,01
TCD4+ %	45	31,6 - 53,7	44,2	34,5- 46,8	ns
TCD4+(cél/μl)	323,6	158,2-495,6	150,3	45-286,4	0,011
TCD8+ %	21,3	18 - 29,1	25,4	15 - 31,1	ns
TCD8+(cél/μl)	151,4	95,9-227,9	95,3	23,9-147,8	<0,01
CD4/CD8 ratio	2,2	1,4 - 2,9	1,8	1,3 - 3,6	ns
T(CD4-/CD8-) %	1,8	0 - 4,2	1,4	0 - 2,5	ns
T(CD4-/CD8-) n°	10,2	0,0-36,3	4,5	0,0-11,1	ns
BCD19+ %	14	10,1 - 23,9	19	12,3 - 25,5	ns
BCD19+ (cél/μl)	92,1	57,9-177	53	26,6-108,1	0,015
NK CD56+ %	12	6,9 - 17,6	5	4,150 - 11,4	<0,01
NK CD56+ (cél/μl)	91,4	52,8-175,7	21,9	7,8-43,6	<0,01
Expresión de HLA-DR en monocitos (MFI)	1662	1084,3 - 2687,8	962	552 - 2304,8	0,032
IgA (mg/dL)	222	204,3 - 255	269	251,3- 280	ns
IgG (mg/dL)	1122	1017,5 - 1215,8	1374	1159,8 - 1471	ns
IgM (mg/dL)	152	127,8 - 185,8	178	125,3 - 189,8	<0,01

**Tabla 40:** Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe N1H1 ingresadas en la UCI según la supervivencia

En las tablas 41 y 42 se muestran las diferencias en los parámetros de inmunidad e inflamación en aquellos pacientes sometidos o no a VM., tanto en el grupo general de gripes como en el subgrupo H1N1. Aquellos pacientes que fueron sometidos a VM presentaron una disminución significativa de NKCD56+ (113,9 vs. 60,7;  $p=0,048$ ) y monocitos (680 vs. 434,7;  $p=0,041$ ), y un aumento significativo de ferritina (79,4 vs. 315,6;  $p=0,017$ ) e Il-6 (27 vs.55;  $p=0,017$ ). En el subgrupo H1N1 se observa una tendencia similar, presentando además una disminución significativa de la expresión de HLA-DR (1376,5 vs. 1980,5;  $p=0,048$ ) y un aumento significativo de la PCR (16,9 vs. 6,7).

Todas las gripes					
	Sin VM (n=25)		Con VM (n=97)		p=
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	8.500	4,427 - 18,260	10.000	5.703 - 15.253	ns
<b>PMN(cél/ µl)</b>	6900	2980-16475	7840	4299-13345	ns
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	802	692 - 1331	710	433 - 1004	ns
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	320,8	250,8 - 464,6	245,8	125,0 - 478,7	ns
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	149,8	111,1- 311,3	146,6	85,7-236,8	ns
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	91,3	79,981 - 203,5	108,4	54,6 - 237,0	ns
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	113,9	54,4 - 159,9	60,7	23,1 - 142,9	0,048
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	680	457,5-925	434,7	197,8-763,1	0,041
<b>HLA-DR (MFI)</b>	2504,0	1740,000 - 4487,0	2086,0	1038,000 - 3558,2	0,054
<b>IgA(mg/dL)</b>	255,0	219,5- 277,2	241,0	183,0 - 275,5	ns
<b>IgM(mg/dL)</b>	160,0	113,0 - 169,5	152,5	109,0 - 193,0	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1154,0	1094,0 - 1366,0	1131,0	874,0 - 1399,0	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	72,0	44,7 - 97,5	64,5	32,0 - 89,5	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	79,4	24,8 - 451,9	315,6	64,2 - 1443,7	0,0204
<b>PCR(mg/dl)</b>	6,7	4,3 - 20,9	14,7	8,1 - 24,7	ns
<b>IL6 (pg/ml)</b>	27,0	17,2 - 47,1	55,0	27,6 - 85,9	0,017
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	0,819	0,5 - 1,2	1,1	0,6 - 2,4	ns
<b>PCT(µg/l)</b>	0,430	0,1 - 1,6	0,4	0,2 - 2,4	ns

Tabla 41: Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según necesidad de VM.

Gripes H1N1					
	Sin VM (n=25)		Con VM (n=97)		p=
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	4.390	3.310 - 14.285	7.710	4.965 - 12.705	ns
<b>PMN(cél/ µl)</b>	2470	2134-12780	6324	3260-9956	ns
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	760	677 - 1.237	687	359 - 896	ns
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	370,8	247,6 - 612,5	221,3	112,5 - 464,2	ns
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	141	105,2-228,4	136	72,6-195,2	ns
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	88,8	36,5 - 91,9	85,5	52,6 - 147,3	ns
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	117,3	74,9 - 199,6	50,1	15,3 - 94,4	0,047
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	539	179,6-872,7	429	185,3-751	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	1980,5	1634,5 - 3390,5	1376,5	772,0 - 2561,0	0,048



<b>IgA(mg/dL)</b>	255,0	227,0 - 269,0	249,5	204,0 - 274,0	ns
<b>IgM(mg/dL)</b>	160,5	133,5 - 163,5	161,5	125,0 - 190,0	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1109,0	1037,0 - 1140,5	1169,5	1078,0 - 1374,0	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	38,0	14,5 - 104,5	43,5	26,000 - 74,0	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	372,8	64,7 - 557,4	725,2	192,5 - 2200,0	0,034
<b>PCR(mg/dl)</b>	6,7	5,5 - 19,4	16,9	9,870 - 25,2	0,045
<b>IL6 (pg/ml)</b>	27,9	25,4 - 54,4	66,8	39,1 - 98,1	0,015
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	0,9	0,7 - 1,1	1,4	0,9 - 2,9	<0,01
<b>PCT(µg/l)</b>	0,4	0,1 - 4,2	0,5	0,2 - 1,1	ns

**Tabla 42:** Comparación del estado inmunitario en las neumonías por gripeH1N1 ingresadas en la UCI según necesidad de VM.

### 5.3.4. Inmunofenotipos según factores de riesgo

Si estudiamos la distribución por edad de los pacientes ingresados en UCI por gripe encontramos que el 70% de los pacientes son menores de 65 años, porcentaje que aumenta al 80% en el análisis del subgrupo H1N1. En las tablas 43 y 44 se exponen los parámetros de inmunidad e inflamación. Ambos grupos presentan unos valores similares, destacando en ambos grupos un recuento leucocitario estadísticamente mayor en los mayores de 65 años (12735 vs 8500,  $p=0,013$ ) y que no existen diferencias significativas en el estudio inmunitario, a excepción de la cifra de PMN (6.850 vs. 12.880;  $p=0,024$ ). En el subgrupo H1H1 destaca también un menor valor de linfocitos TCD4+ (276,2 vs. 72,6,  $p=0,041$ ) y BCD19+ (91,1 vs. 43,6;  $p=0,015$ ).

Todos los pacientes con Gripe ingresados en la UCI con edad mayor o menor de 65 años					
	Menor de 65 años (n=86)		Mayor de 65 años (n=36)		p=
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	8500	4700 - 14800	12735	7135 - 17345	0,013
<b>PMN(cél/ µl)</b>	6450	3122-10627	11575	5,9025-15952	0,0054
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	750	440 - 1133	710	520 - 1004	ns
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	287,7	160,3 - 525,1	237,3	111,3 - 438,2	ns
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	147	95-288	144	91,9-250,4	ns
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	113,2	60,8 - 290,0	88,8	49,6 - 203,5	ns
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	65,7	31,3 - 158,6	80,4	48,7 - 145,4	ns

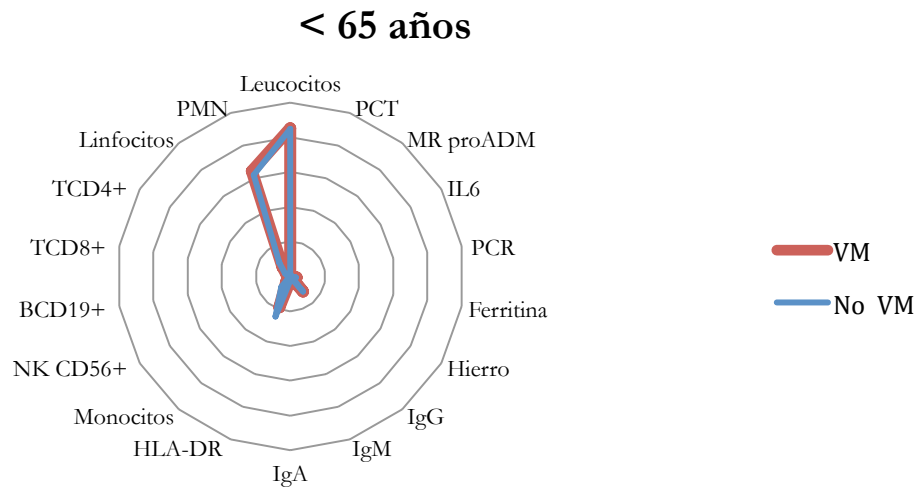
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	410	168-854	584	293-858	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	2129	1056 - 3495,5	2978	1545,5-4497	ns
<b>IgA(mg/dL)</b>	235,5	199,0 - 269,0	268,0	183,0 - 281,5	ns
<b>IgM(mg/dL)</b>	152,0	108,0 - 184,0	176,0	122,5 - 226,3	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1131,0	998,0 - 1328,0	1258,0	975,0 - 1576,8	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	64,5	28,0 - 90,0	79,0	40,8 - 92,8	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	368,3	76,9 - 1245	50,4	31,4 - 385,9	0,01
<b>PCR(mg/dl)</b>	14,4	7,8 - 25,0	12,4	5,5 - 21,2	ns
<b>IL6 (pg/ml)</b>	49,9	27,0 - 88,6	35,6	17,1 - 69,4	ns
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	1,0	0,7 - 2,3	0,8	0,4- 1,7	ns
<b>PCT(µg/l)</b>	0,4	0,2 - 2,1	0,4	0,1 - 2,3	ns

**Tabla 43:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según edad.

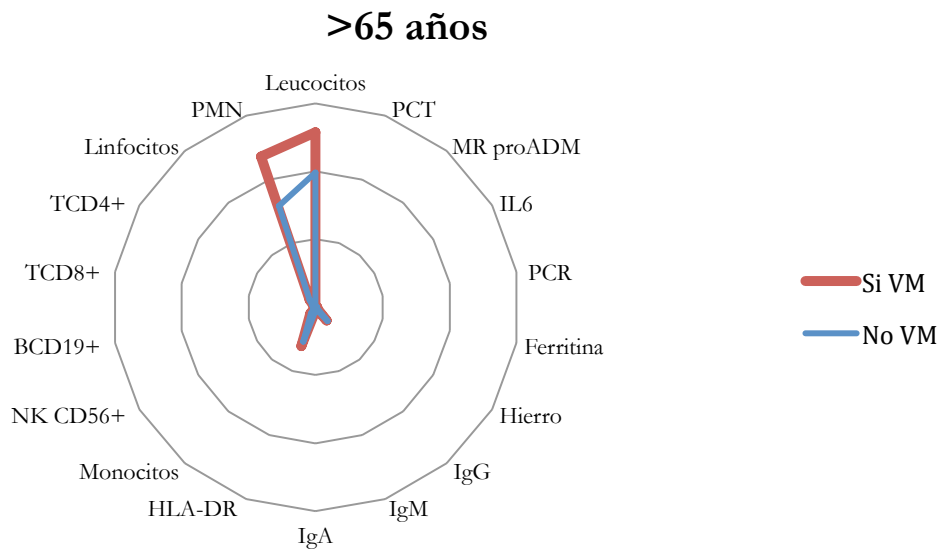
Todos los pacientes con Gripe N1H1 ingresados en la UCI con edad mayor o menor de 65 años					
	Menor de 65 años		Mayor de 65 años		p=
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	6860	3750 - 10910	12880	6912 - 14578	0,024
<b>PMN(cél/ µl)</b>	4867	2552-9420	11780	5751-13705	0,0123
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	696	386 - 920	720	323 - 903	ns
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	276,3	135,0 - 466,6	72,6	50,3 - 311,9	0,041
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	141,2	76-189	110	51,17-298,5	ns
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	91,1	54,3 - 137,6	43,6	21,8 - 163,6	0,015
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	55,2	21,7 - 131,6	57,2	17,9 - 112,4	ns
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	270	136,5-654,3	257	233,4- 645,4	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	1394,0	815,0 - 2564,0	1388,5	828,5- 2481,0	ns
<b>IgA(mg/dL)</b>	243,0	205,0 - 263,0	274,5	255,0 - 285,0	ns
<b>IgM(mg/dL)</b>	156,5	121,0 - 190,0	177,5	163,500 - 183,5	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1127,5	1030,0 - 1321,0	1329,5	1160,5 - 1487,5	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	54,5	22,000 - 86,0	31,5	28,0 - 38,0	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	558,1	194,800 - 1880,000	600,850	48,700 - 2063,500	ns
<b>PCR(mg/dl)</b>	14,5	8,8 - 24,4	19,5	11,3 - 25,4	ns
<b>IL6 (pg/ml)</b>	65,3	34,0 - 96,4	68,8	34,8 - 80,5	ns
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	1,2	0,8- 2,6	1,3	0,9 - 3,0	ns
<b>PCT(µg/l)</b>	0,4	0,2 - 1,1	0,4	0,2 - 1,9	ns

**Tabla 44:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según edad.

Si comparamos por edad la tendencia de los valores inmunitarios e inflamatorios, entre aquellos con mayor gravedad y que requirieron VM y aquellos que no requirieron, observamos que en los menores de 65 el trazado es similar, mientras que en los mayores de 65 años este trazado se diferencia, a expensas de un mayor recuento leucocitario y PMN (figura 14). En la figura 15 observamos dicha diferencia según el grupo de edad de los ventilados.



**A: menores de 65 años.**



**B: mayores de 5 años.**

**Figuras 14.** Diferencia en el inmunofenotipo y biomarcadores respecto a la gravedad dentro de los grupos de edad: A: menores de 65 años; B: mayores de 65 años.

## Ventilación mecánica

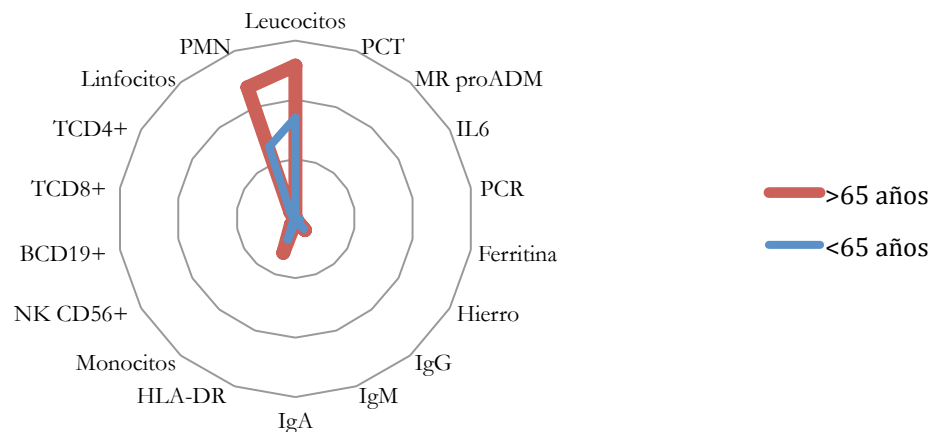


Figura 15. Inmunofenotipo y biomarcadores en los paciente ventilados según el grupo de edad.

En cuanto a los pacientes con antecedente de inmunodepresión presentan unos valores similares, tanto en el grupo total de gripes ingresadas en UCI como en el subgrupo H1N1 (tablas 45 y 46). Lo mismo ocurre en los pacientes con IMC >30 en ambos grupos (tablas 47 y 48).

Todos los pacientes con Gripe en UCI con antecedentes de inmunodeficiencia					
	Sin inmunodeficiencia (n=90)		Con inmunodeficiencia (n=32)		p=
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	8940	5310 - 15830	11085	5795 - 17295	ns
<b>PMN(cél/ µl)</b>	7740	4250-13850	8140	3695-12832	ns
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	725	482 - 1133	750	452 - 1110	ns
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	265,4	144,2 - 498,9	266,5	164,5 - 453,1	ns
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	140,8	81-227,9	185,8	129,9-309,4	ns
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	101,3	60,4 - 237,0	106,1	39,3 - 203,5	ns
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	74,1	37,767 - 185,9	55,9	21,9 - 94,4	ns
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	493	210-755	437	156,5-894,5	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	2504,0	1740,0 - 4487,0	2086,0	1038,0 - 3558,3	ns
<b>IgA(mg/dL)</b>	250,5	203,0 - 279,0	210,0	151,3 - 254,8	ns

<b>IgM(mg/dL)</b>	152,5	107,0 - 186,0	155,0	112,8 - 198,3	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1171,5	978,0 - 1401,0	1127,0	980,5 - 1247,5	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	66	32-89	66	33-97,25	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	193,7	50,1 - 988,2	364,9	38,6 - 967,2	ns
<b>PCR(mg/dl)</b>	13,3	6,7- 22,6	17,4	7,9- 28,3	ns
<b>IL6 (pg/ml)</b>	45,9	22,4- 79,5	53,5	33,8 - 79,8	ns
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	0,9	0,5 - 1,8	1,3	0,8 - 2,6	ns
<b>PCT(µg/l)</b>	0,4	0,2 - 1,6	1,1	0,4- 5,0	0,017

**Tabla 45:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según antecedente de inmunodepresión.

Gripes H1N1 con antecedente de inmunodeficiencia					
	Sin inmunodeficiencia (n=54)		Con inmunodeficiencia (n=21)		p=
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	7405	4500 - 12530	7920	4,157 - 14,285	ns
<b>PMN(cél/ µl)</b>	6157	2870-10030	4976	25149-11554	ns
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	701	384 - 882	732	382 - 1142	ns
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	269,8	128,289 - 461,03	225,4	70,97 - 447,3	ns
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	138,1	74,3-180,4	165,7	72,6-298,2	ns
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	90,45	54,89 - 136,5	55,632	28,324 - 172,8	ns
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	52,800	28,3 - 130,44	72,1	13,6 - 143,5	ns
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	292,5	162,5-568	322,4	118-846,9	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	1385	851,5 - 2687	1903	782,7-2563,2	ns
<b>IgA(mg/dL)</b>	252	205,5 - 274	250	208 - 255	ns
<b>IgM(mg/dL)</b>	161	122 - 184,7	160	147 - 209,5	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1154	1076,5 - 1377	1127	1005 - 1247,5	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	32	21,2-69,7	55	33-97,2	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	670,1	183,1-2130,5	431	205,3-1031	ns
<b>PCR(mg/dl)</b>	14,8	9,2 - 24,6	18	8,4 - 28	ns
<b>IL6 (pg/ml)</b>	66,5	32,2 - 95,5	58	35,1 - 89	ns
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	1,1	0,8 - 2,6	1,5	1,1 - 3,2	ns
<b>PCT(µg/l)</b>	0,4	0,2 - 0,9	0,5	0,4 - 2,6	ns

**Tabla 46:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según antecedente de inmunodepresión.

	OBESIDAD IMC>30 (todas las gripes)				<i>p</i>
	IMC<30 (74)		IMC>30 (31)		
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	10.200	4.900 – 15.830	8.340	5.878 – 16.588	<i>ns</i>
<b>PMN(cél/ µl)</b>	7725	3152 – 12.880	7841	4.868 – 14.499	<i>ns</i>
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	710	450 - 1111	779	480 – 1.258	<i>ns</i>
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	267,5	150,3 - 466,5	258,7	129,0 - 557,2	<i>ns</i>
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	147	95 - 282,3	148,4	96,1 - 245	<i>ns</i>
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	106	56,5 - 190,9	88,7	56,1- 397,2	<i>ns</i>
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	64	29,1 - 139,1	74,1	41,4 - 241,7	<i>ns</i>
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	522	191 - 850	480	209 - 787	<i>ns</i>
<b>HLA-DR (MFI)</b>	2104,5	1087 - 3331	2861	1394,2 - 4409,7	<i>ns</i>
<b>IgA(mg/dL)</b>	247,5	183 - 276	245	203,2 - 278,5	<i>ns</i>
<b>IgM(mg/dL)</b>	154	110 - 191	152	112 - 182,5	<i>ns</i>
<b>IgG(mg/dL)</b>	1129,5	974 - 1378	1215	1000,2 - 1400,7	<i>ns</i>
<b>Hierro(µg/dL)</b>	69	33 - 98	57	22,5 - 77,7	<i>ns</i>
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	284,7	50,1 - 1025	274,7	39,5 - 722,6	<i>ns</i>
<b>PCR(mg/dl)</b>	15,1	6,7 - 25	13	7,2 - 19,2	<i>ns</i>
<b>IL6 (pg/ml)</b>	45,1	21,8 - 80	54,2	26,8 - 75,3	<i>ns</i>
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	0,9	0,5 - 2,2	0,9	0,74 - 1,78	<i>ns</i>
<b>PCT(µg/l)</b>	0,7	0,2 - 4,6	0,3	0,2 - 0,8	<i>ns</i>
<b>Mortalidad</b>		25,67 %		41,93 %	

Tabla 47: Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según antecedente de obesidad.

	OBESIDAD ( IMC>30) (gripes N1H1)				<i>p</i> =
	IMC<30 (41)		IMC>30 (17)		
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	5.850	3.500 – 1.3018	7.100	4.982 – 10.360	<i>ns</i>
<b>PMN(cél/ µl)</b>	3.880	2.454 – 9.919	5.965	4.267 – 9.512	<i>ns</i>
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	700	360 – 1.116	592	299 - 879	<i>ns</i>
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	269,8	128,9 - 483,1	184,8	104,4 - 420,8	<i>ns</i>

<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	146,1	73,1- 238,9	127,1	75,476 - 168,2	<i>ns</i>
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	91,7	39,2 - 151,3	81,0	53,9 - 131,5	<i>ns</i>
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	54,1	21,9 - 127,9	64,4	14,9 - 152,1	<i>ns</i>
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	258	139 - 533	250	0,1- 0,6	<i>ns</i>
<b>HLA-DR (MFI)</b>	1394	804,2 - 2561	1662	902,2 - 2868,2	<i>ns</i>
<b>IgA(mg/dL)</b>	250	204,8 - 264,0	254,0	211,8 - 275,5	<i>ns</i>
<b>IgM(mg/dL)</b>	160	119,5 - 199,5	161,0	133,3 - 179,5	<i>ns</i>
<b>IgG(mg/dL)</b>	1.128	1.016 – 1.371	1.215	1.111,2 – 1.340,7	<i>ns</i>
<b>Hierro(µg/dL)</b>	54	31,8 - 91,3	27	19,5 - 61,3	<i>0,042</i>
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	489	189,375 – 1.890,5	627,2	152,37 – 1.951,7	<i>ns</i>
<b>PCR(mg/dl)</b>	18	11,6 - 26,1	13,3	8,6 - 18,9	<i>ns</i>
<b>IL6 (pg/ml)</b>	67	33,1 - 91,4	62,5	39,2 - 98,4	<i>ns</i>
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	1,2	0,8 - 2,9	1,4	0,9 - 2,5	<i>ns</i>
<b>PCT(µg/l)</b>	0,6	0,2 - 1,8	0,2	0,2 - 0,5	<i>0,014</i>
<b>Mortalidad</b>		34,1 %		29,41 %	

**Tabla 48:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según antecedente de obesidad.

Finalmente, comparando aquellos pacientes que presnetaron coinfección al ingreso se observa un mayor recuento leucocitario (12.560 vs. 7.710,  $p=0,027$ ), PMN (10,005 vs. 6,012,  $p=0,023$ ), así como una PCR mayor (21,2 vs. 10,9,  $p<0,01$ ). Estas diferencias se mantienen en el subgrupo H1N1, (tablas 49 y 50).

	COINFECCION TODAS LAS GRIPES				P=
	Sin coinfección (70)		Con coinfección (48)		
	Median	IQR	Median	IQR	
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	7.710	5.000 – 13.340	12.560	6.435 – 17.870	0,027
<b>PMN(cél/ µl)</b>	6.012	3.459 – 11.780	10.005	5.290 – 147.28	0,023
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	751	486 - 1100	715	452 - 1140	<i>ns</i>
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	265,3	151,7 - 464,5	263,9	145,4 - 529,5	<i>ns</i>
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	147,4	81,1 - 235,7	159,7	95,1- 282,4	<i>ns</i>
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	108,4	62,4 - 245,8	100,4	44,9 - 237,2	<i>ns</i>

<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	67,0	37,8 - 171,7	73,2	27,3 - 144,4	ns
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	503	191 - 820	449	235 - 897	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	2166	990,7 - 4483,7	2110,5	1255 - 3027	ns
<b>IgA(mg/dL)</b>	245,0	203,8 - 275,8	254,0	182,5 - 278,5	ns
<b>IgG(mg/dL)</b>	1134,0	966,5 - 1372,0	1156,5	1041,5 - 1498,0	ns
<b>IgM(mg/dL)</b>	152,0	107,0 - 186,3	163,5	119,5 - 187,5	ns
<b>Hierro(µg/dL)</b>	64,0	31,3 - 95,3	66,0	32,500 - 84,0	ns
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	274,7	47,8 - 792,9	344,3	43,5 - 1874,5	ns
<b>PCR(mg/dl)</b>	10,9	6,7 - 19,5	21,2	9,965 - 29,1	<0,001
<b>IL6 (pg/ml)</b>	54,7	27,0- 85,0	47,5	23,5 - 76,7	ns
<b>MR proADM(nmol/L)</b>	0,9	0,6 - 1,4	1,4	0,458 - 2,7	ns
<b>PCT(µg/l)</b>	0,3	0,1 - 0,5	2,6	1,1 - 19,7	<0,01
<b>Mortalidad</b>	18/70	25,7%	17/48	35,4%	*

**Tabla 49:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe ingresadas en la UCI según coinfección al ingreso.

COINFECCION EN N1H1					
Leucocitos(cél/ µl)	Sin coinfección (50)		Con coinfección (25)		P=
	Median	IQR	Median	IQR	
PMN (cél/ µl)	6.940	4.440 – 11.250	10.640	4.250 – 14.825	ns
PMN (cél/ µl)	4.923	2.665 – 9.400	7.841	2.870 – 11.867	ns
Linfocitos(cél/ µl)	720	444 - 907	527	329 - 937	ns
TCD4+ (cél/ µl)	269,8	138,8 - 459,2	213,7	83,2 - 487,2	ns
TCD8+ (cél/ µl)	146,1	74,6 - 183,7	127,1	74,3 - 227,9	ns
BCD19+ (cél/ µl)	92,0	54,6 - 136,5	60,0	34,8 - 137,3	ns
NK CD56+ (cél/ µl)	64,4	28,4 - 131,7	48,1	11,7 - 130,4	ns
Monocitos(cél/ µl)	296	150 - 687	315	150 - 475	ns
HLA-DR (MFI)	1569	735,2 - 2687	1394	956,7 - 2348	ns
IgA(mg/dL)	249,0	204,2 - 274,0	255,0	207,250 - 268,5	ns
IgG(mg/dL)	1127,0	974,0 - 1305,2	1131,0	1120,2 - 1394,2	ns
IgM(mg/dL)	155,0	112,7 - 188,7	175,0	148,2 - 188,2	ns
Hierro(µg/dL)	43,0	22,5 - 77,7	44,0	24,7 - 82,0	ns
Ferritina (ng/ml)	412,0	171,6 - 1192,0	1869,0	359,0 - 5693,2	0,036
PCR(mg/dl)	13,1	7,9 - 20,0	22,9	14,1 - 28,9	<0,01
IL6 (pg/ml)	65,6	34,4 - 92,1	62,5	32,2 - 134,6	ns



<b>MR proADM(nmol/L)</b>	1,0	0,7 - 1,5	2,2	1,2 - 3,5	<0,01
<b>PCT(µg/l)</b>	0,3	0,1 - 0,4	1,8	0,7 - 5,1	<0,01
<b>Mortalidad</b>		26%		36%	*

**Tabla 50:** Comparación del estado inmunitario e inflamatorio en las neumonías por gripe H1N1 ingresadas en la UCI según coinfección al ingreso.

### 5.3.5. Análisis de las curvas ROC

Se realizó un análisis de la curva ROC para estudiar el valor pronóstico de los diferentes biomarcadores inmunitarios respecto a la severidad (ingreso en UCI y necesidad de ventilación mecánica) y mortalidad (tablas 51-56).

	<b>AUC</b>	<b>SE</b>	<b>95% CI</b>
<b>Monocitos</b>	0,586	0,0453	0,497 to 0,675
<b>Linfocitos</b>	0,677	0,0449	0,589 to 0,765
<b>Expresión de HLA-DR en monocitos (MFI)</b>	0,820	0,0357	0,750 to 0,890
<b>NK CD56+ %</b>	0,601	0,0463	0,511 to 0,692
<b>NK CD56+</b>	0,662	0,402	0,574 to 0,749
<b>IgM</b>	0,650	0,0460	0,560 to 0,740

**Tabla 51.** Valores de las curvas ROC para predecir la severidad en pacientes ingresados en el hospital con neumonía por gripe.

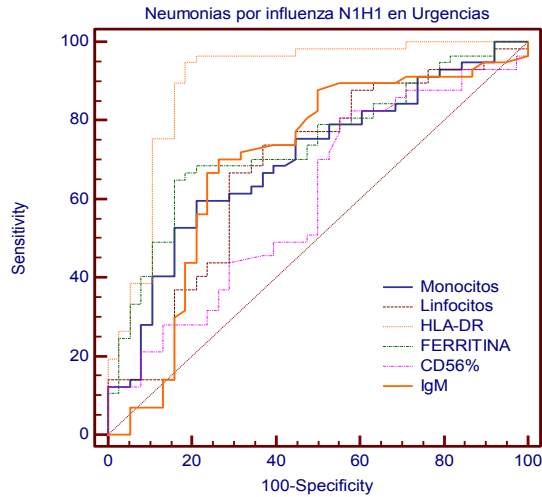
	<b>AUC</b>	<b>SE</b>	<b>95% CI</b>
<b>Monocitos</b>	0,698	0,0544	0,592 to 0,805
<b>Linfocitos</b>	0,678	0,0578	0,564 to 0,791
<b>Expresión de HLA-DR en monocitos (MFI)</b>	0,899	0,0375	0,824 to 0,971
<b>NK CD56+%</b>	0,600	0,0598	0,483 to 0,717
<b>NK CD56+</b>	0,663	0,572	
<b>IgM</b>	0,694	0,0596	0,577 to 0,811

**Tabla 52.** Valores de las curvas ROC para predecir la severidad en pacientes ingresados en el hospital con neumonía por gripe H1N1.

	<b>AUC</b>	<b>SE</b>	<b>95% CI</b>
<b>Monocitos</b>	0,643	0,0622	0,521 - 0,765
<b>Linfocitos</b>	0,642	0,0674	0,510 - 0,774
<b>HLA-DRmonocitos (MFI)</b>	0,537	0,0674	0,405 - 0,669
<b>IgA</b>	0,632	0,0650	0,505 - 0,760
<b>NK CD56+</b>	0,666	0,602	0,548 to 0,784

<b>IgM</b>	0,609	0,0650	0,481 - 0,736
------------	-------	--------	---------------

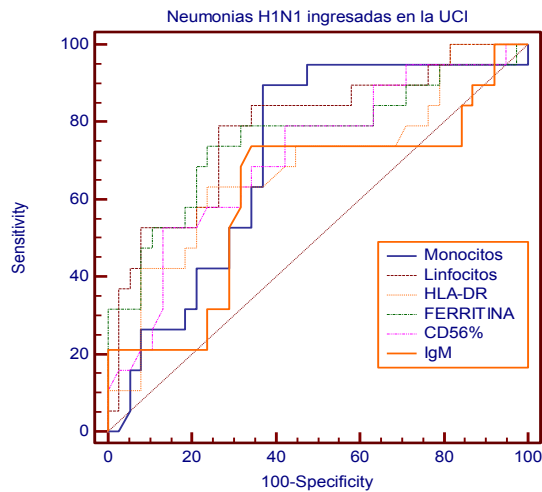
**Tabla 53.** Valores de las curvas ROC para predecir la mortalidad en pacientes ingresados el hospital con neumonía por gripe.



**Figura 16.** Representación de las curvas ROC para la predicción de severidad en los diferentes parámetros de la inmunidad

	<b>AUC</b>	<b>SE</b>	<b>95% CI</b>
<b>Monocitos</b>	0,711	0,0715	0,571 - 0,851
<b>Linfocitos</b>	0,783	0,0668	0,652 - 0,914
<b>Expresión de HLA-DR en monocitos (MFI)</b>	0,684	0,0787	0,529 - 0,838
<b>NK CD56+ %</b>	0,712	0,0739	0,567 - 0,857
<b>NK CD56+</b>	0,863	0,0481	0,769 to 0,957
<b>BCD19+</b>	0,696	0,0781	0,543 to 0,849
<b>IgM</b>	0,616	0,0849	0,450 - 0,783

**Tabla 54.** Valores de las curvas ROC para predecir la mortalidad en pacientes ingresados en la UCI con neumonía por gripe H1N1.



**Figura 17.** Representación de las curvas ROC para la predicción de mortalidad en los diferentes parámetros de la inmunidad.

### 5.3.6. Análisis multivariante

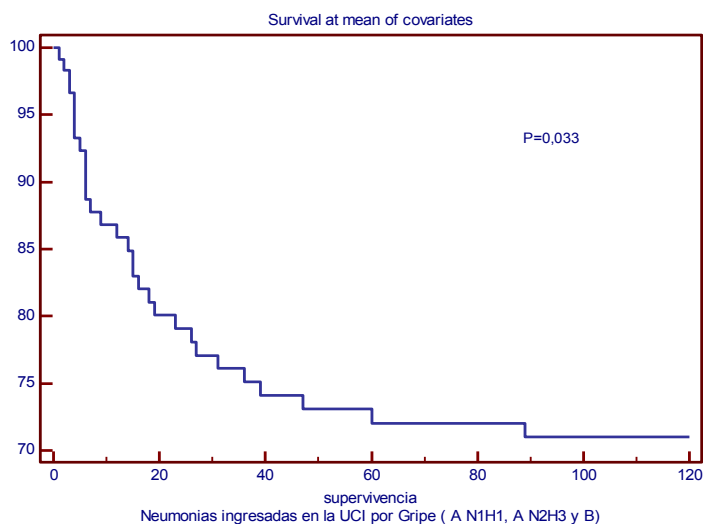
Se elaboró un modelo de riesgo proporcional de Cox, utilizando el método hacia atrás (backward), eliminando del modelo en cada paso las variables no significativas. Las variables dependientes utilizadas fueron la tasa de mortalidad en la UCI y a los 90 días y las variables independientes fueron: edad, sexo; obesidad; inmunodepresión, cirugía, cifra de monocitos, linfocitos Expresión de HLA-DR en monocitos, TCD4+, TCD8+ , NK CD56+, BCD19+, niveles de Ig A, M y G.

En el análisis del grupo total (A H1N1, A H3N2 y B) al ingreso del hospital el recuento de monocitos, los valores de HLA-DR de los monocitos, el número de linfocitos CD19+ y número de células NK CD56+ fueron factores estadísticamente significativos predictores de mortalidad en UCI (véase la tabla 57).

Variables	Coefficiente de regresión	Error estandar	P	Hazard Ratio	95% CI
Monocitos	-1,1298	0,5472	0,0389	0,3231	0,1112 to 0,9391
HLA-DR monocitos (MFI)	-0,0001622	0,00007406	0,0285	0,9998	0,9997 to 1,0000
NK CD56+	-0,002516	0,001525	0,0991	0,9975	0,9945 to 1,0005
BCD19+	0,001766	0,0006566	0,0071	1,0018	1,0005 to 1,0031

**Tabla 55.** Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso en el hospital del grupo total.

Por otro lado, el análisis del grupo total al ingreso en la UCI, el recuento de monocitos, linfocitos CD19 y los valores de IgM fueron factores estadísticamente significativos como predictores de mortalidad en UCI (véase la tabla 58).



**Figura 18.** Análisis multivariante. Curva de supervivencia de neumonías ingresadas en UCI.

Variables	Coefficiente de regresión	Error estandar	P	Hazard Ratio	95% CI
Monocitos	-1,3259	0,5581	0,0175	0,2656	0,0894 to 0,7886
BCD19+	0,001181	0,0006226	0,0578	1,0012	1,0000 to 1,0024
IgM	0,001276	0,0006559	0,0517	1,0013	1,0000 to 1,0026

**Tabla 56.** Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso en UCI.

En el subgrupo H1N1, los valores de HLA-DR, el número de células NK (+CD56) y los niveles de IgM fueron factores estadísticamente significativos como predictores de mortalidad tanto al ingreso en hospital como en UCI (véase tablas 59 y 60).

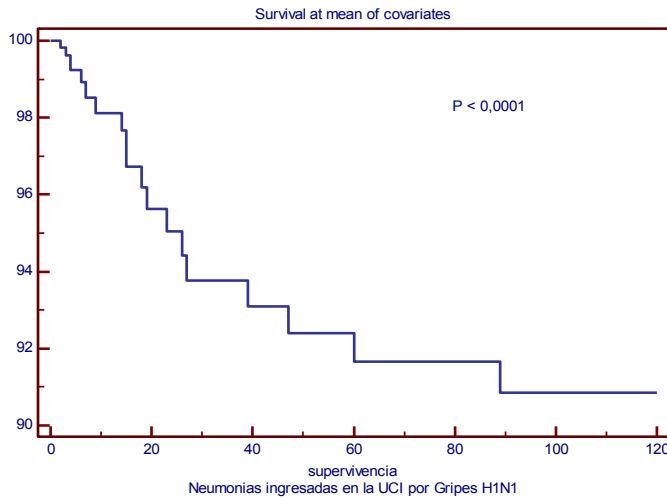


Figura 19. Análisis multivariante. Curva de supervivencia de neumonías H1N1 ingresadas en UCI.

Variable	Coefficiente de regresión	Error estandar	P	Hazard Ratio	95% CI
HLA-DR monocitos (MFI)	-0,0003684	0,0002084	0,077	0,9996	0,9992 to 1,0000
NK CD56+	-0,02766	0,008224	<0,01	0,9727	0,9572 to 0,9884
IgM	0,01115	0,004462	0,012	1,0112	1,0025 to 1,0201

Tabla 57. Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso del Hospital de las neumonías por H1N1.

Variable	Coefficiente de regresión	Error estandar	P	Hazard Ratio	95% CI
HLA-DR monocitos (MFI)	-0,0003684	0,0002084	0,0770	0,9996	0,9992 to 1,0000
NK CD56+	-0,02766	0,008224	0,0008	0,9727	0,9572 to 0,9884
IgM	0,01115	0,004462	0,0124	1,0112	1,0025 to 1,0201

Tabla 58. Análisis multivariante. Parámetros inmunitarios predictores de mortalidad al ingreso en UCI de las neumonías por H1N1.

## 5. 4. INMUNOFENOTIPOS PREDICTORES DE SEVERIDAD EN LA GRIPE A N1H1

Para la realización de los 4 subgrupos hemos obtenido los siguientes puntos de corte: ferritina 350 ng/ml y HLA-DR 4500 MFI. Estos corresponden a los valores de la mediana de ferritina y HLA-DR de los pacientes ingresados en UCI con una MR-proADM de 1,2 nmol/L, punto de corte para la mortalidad en la curva ROC. Con ello hemos realizado 4 grupos y hemos analizado las cifras de linfocitos, leucocitos, monocitos, subpoblaciones linfocitarias, inmunoglobulinas, biomarcadores, mortalidad y puntuación SOFA y APACHE (tabla 61).

- Grupo 1: Ferritina <325 y HLA-DR >4500: normal (N)
- Grupo 2 : Ferritina >325 y HLA-DR >4500: hiperinflamado (HI)
- Grupo 3: Ferritina <325 y HLA-DR <4500: inmunodeprimido (ID)
- Grupo 4: Ferritina >325 y HLA-DR<4500: mixto (HI+ID)

	Grupo 1 (n=30) Normal (N) Ferritina <325; HLA-DR>4500		Grupo 2. (n=18) Hiperinflamado (HI) Ferritina >325; HLA-DR>4500		Grupo 3. (n=22) Inmunodepresión (ID) Ferritina <325; HLA-DR<4500		Grupo 4. (n=36) Mixto (HI+ID) Ferritina >325; HLA-DR<4500	
	<i>Median</i>	<i>IQR</i>	<i>Median</i>	<i>IQR</i>	<i>Median</i>	<i>IQR</i>	<i>Median</i>	<i>IQR</i>
<b>Leucocitos(cél/ µl)</b>	6.140	4.930-9.540	4.725	2.040-8.800	6.410	4.000-11.560	8.340	4.130-12.710
<b>PMN(cél/ µl)</b>	4.670	2.820-8.480	3.915	1.390-7.710	4.860	2.320-8.370	6.630	3.150-1.038
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	1.050	770-1.730	620	560-940	760	480-1.130	560	340-860
<b>TCD4+ (cél/ µl)</b>	466,6	209,1-762,7	369,4	323,6-643,2	266,3	127,9-444,4	213,8	114,8-464,4
<b>TCD8+ (cél/ µl)</b>	292,32	136,0-546,1	140,9	116,6- 173,4	147,8	64,8-272,7	133,9	76,1-256,0
<b>BCD19+ (cél/ µl)</b>	93,9	64-172,6	71,5	38,7-93,9	106,6	54,3-186,9	76,5	37,3-155,8
<b>NK CD56+ (cél/ µl)</b>	108,5	46,3- 260,2	50,7	19,3-77,7	91,7	54,1-208,3	45,2	16,9-118,6
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	64	0,4-0,9	155	0,1- 0,3	363	0,2-0,7	258	0,1-0,5
<b>HLA-DR (MFI)</b>	8152	5290,3-12921	7764	7180- 10629	1337,5	858- 2166	1385	682,8-2627
<b>IgA(mg/dL)</b>	115	88-232	260,5	234-278	234,5	205-274	254	207,2-274,7
<b>IgG(mg/dL)</b>	1328	1001,7-1431,5	1326	998- 1445	1160	1030- 1259	1131	1098,5-1373
<b>IgM(mg/dL)</b>	102	88,5-145,5	186	102-225	138,5	108- 161	175	145,5-199
<b>Hierro(µg/dL)</b>	70	40,3- 107,2	47	17-86	64	28- 109	32	21,2-59,2
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	95,4	24,2-210,8	907,1	529,1-1789	78,15	44,1-192,5	1245	598,6-2995,6
<b>PCR(mg/dl)</b>	9,7	6,7-20,6	5,4	2,2-10	13,9	8,8-24,2	15,5	9,4-24,5
<b>IL6 (pg/ml)</b>	50,3	-	50,3	-	70,2	35,9-98,1	63,8	29,8-90,6
<b>MR</b>	0,6	0,244-1,01	0,5	0,2-0,6	1	0,8-1,6	1,4	0,9-2,6

proADM(nmol/L)								
PCT( $\mu\text{g/l}$ )	0,1	0,1-0,2	0,5	0,1-0,9	0,2	0,1-0,5	0,5	0,3-1,1
Ingreso en UCI n ; %	2/30	6,66%	5/18	27,5%	18/22	81,8%	26/39	92,3%
Mortalidad %	0%		0%		18,2%		38,5%	

**Tabla 59.** Parámetros según inmunofenotipos.

La distribución de pacientes en los 4 grupos es homogénea y podemos encontrar un comportamiento diferencial entre ellos. La mayor mortalidad se encuentra en el grupo donde la HLA-DR se encuentra inferior a 4500 (G3: 18,2% y G4: 38,5%), siendo nula en el primer y segundo grupo. La linfopenia es un hallazgo constante en los cuatro grupos, sin embargo es menos acusado en el grupo 1 (G1: 1.050  $\text{cél}/\mu\text{l}$  , G2: 620  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G3: 760  $\text{cél}/\mu\text{l}$  y G4: 560  $\text{cél}/\mu\text{l}$ ). La linfopenia en los grupos 3 y 4 es más acusada en los CD4 que en los grupos 1 y 2 (G1:466  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G2: 369  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G3: 266  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G4: 213  $\text{cél}/\mu\text{l}$ ). Los linfocitos TCD8 se encuentran también disminuidos en los grupos 2, 3 y 4 respecto al primero (G1: 292  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G2: 140  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G3:147  $\text{cél}/\mu\text{l}$  G4: 133  $\text{cél}/\mu\text{l}$ ) siendo la afectación de las subpoblaciones en el cuarto grupo mínimo. El valor de CD56 se encuentra disminuido en los grupos con una ferritina mayor (G1: 108,5  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G2: 50,7  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G3: 91,7  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G4: 45,2  $\text{cél}/\mu\text{l}$ ). El recuento de monocitos por su lado se mantienen por encima 100  $\text{cél}/\mu\text{l}$  en todos los grupos (G1: 640  $\text{cél}/\mu\text{l}$  , G2: 155  $\text{cél}/\mu\text{l}$ , G3: 263  $\text{cél}/\mu\text{l}$  y G4: 258  $\text{cél}/\mu\text{l}$ ).

El valor de la MR-proADM se encuentra más elevado en los grupos de HLA-DR bajo: (G1: 0,6 nmol/l, G2: 0,5 nmol/l, G3: 1 nmol/l, G4: 1,4 nmol/l). En la figura 20 se muestra la correlación de la MR-proADM con la expresión de HLA-DR, siendo negativa ( $r=-0,462$ ,  $p<0,01$ ). Por su lado, la PCR también se encuentra más elevada en estos grupos (G1: 5,4 mg/dl, G2: 13,9 mg/dl, G3: 15,5 mg/dl, G4: 9,7 mg/dl). En la figura 21, se muestra su correlación negativa y estadísticamente significativa con el HLA-DR ( $r= -0,265$ ,  $p<0,01$ ).

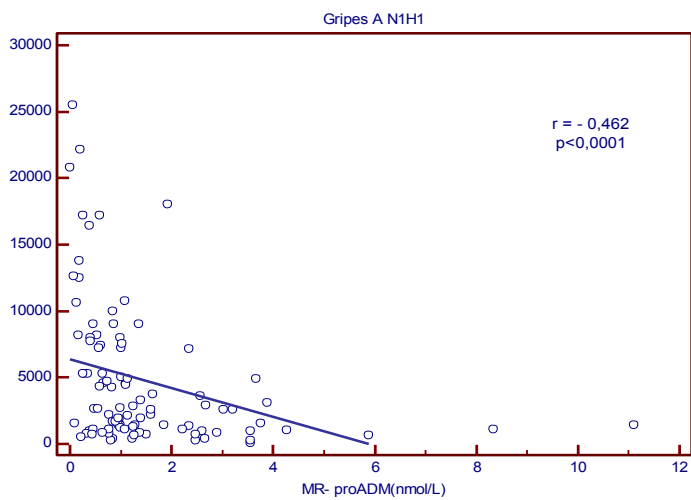


Figura 20. Correlación entre MR-proADM y HLA-DR.

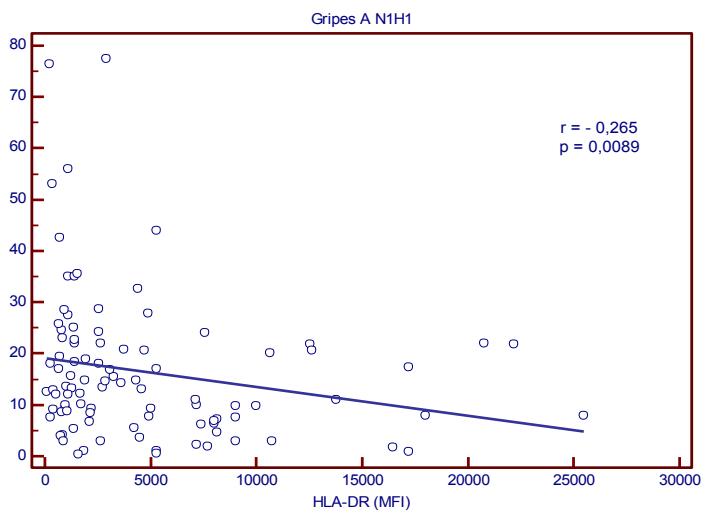
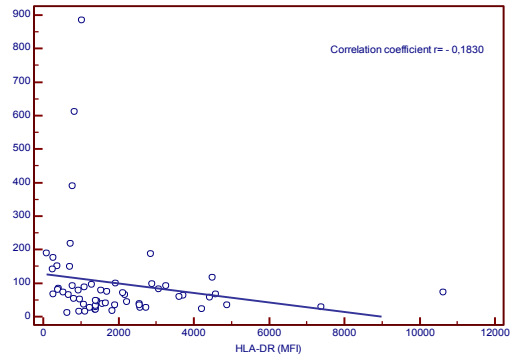
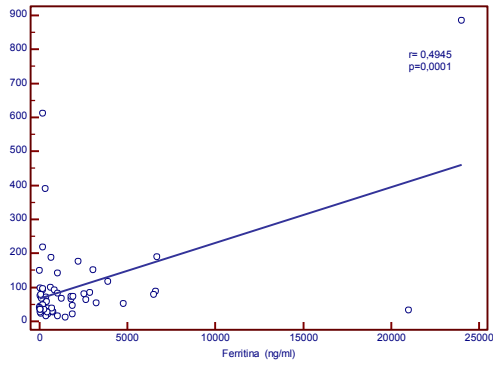


Figura 21. Correlación entre PCR y HLA-DR.





**Figura 22.** A y B. Correlación de los niveles de IL6 con los niveles de Ferritina y HLA-DR en pacientes ingresados en la UCI con gripe A N1H1.

## **5.5. COMPARACIÓN DEL ESTADO DE DISFUNCIÓN INMUNE DE LOS PACIENTES CON NEUMONÍA POR GRIPE H1N1 Y SARS-COV-2**

Se evaluaron adultos sintomáticos COVID19 en el departamento de emergencias por PCR positiva para Covid-19, de estos 59 ingresaron en la UCI. La tasa de mortalidad fue del 42,3% en los 59 que requirieron ingreso en UCI, del 55% en los 47 que requirieron ventilación mecánica.

La comparación de los parámetros inflamatorios (tabla 62) mostró un aumento en los pacientes co SARS Covid-19. Los niveles medios de ferritina en plasma 1345 ng / ml (819,25-2124,25) frente a 558,1 ng / ml (180-1880) de los pacientes con influenza H1N1pdm ingresada en la UCI, los niveles plasmáticos medios de ferritina son significativamente mayores en los pacientes con COVID-19 1345 ng/ml (IQR 819,3-2124,3) frente a 558.1 ng / ml (IQR 180-1880) ( $p < 0,01$ ). Los valores de PCR son altos pero similares en ambos grupos ( 15,5 vs 14,2 mg/dl). Los valores de IL6 en los pacientes con COVID-19 son de 146 pd/ml (IQR 32,9-1201).

	Gripes H1N1 ingresadas en UCI (N=75)		Covid-19 ingresadas en UCI (N=59)		p
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
<b>Edad</b>	53	44-64	65	57-68,75	<0,01
<b>Leucocitos(cél/ µl )</b>	7.500	4.455 – 13.225	8.675	6.750 – 12.000	ns
<b>Granulocitos(cél/µl)</b>	5.965	2.870 – 10.308	6.765	4.635 – 8.835	ns
<b>Monocitos(cél/ µl)</b>	315	151 - 648	435	280 - 675	ns
<b>Linfocitos(cél/ µl)</b>	710	385 - 905	730	530 – 1.150	ns
<b>TCD3+ %</b>	72,3	62,4 - 75,9	79	69,8 - 87,3	ns
<b>TCD3+ células</b>	460,2	232,1-666,8	890,9	519,6-1383,3	0,0028
<b>TCD4+ %</b>	44,8	32,2 - 52,9	50,1	43,1 - 61,2	ns
<b>TCD4+ células</b>	260,7	121,8-464,2	586,2	267-969,3	<0,01
<b>TCD8+ %</b>	21,8	17,1 - 30	26,6	13,940 - 33,7	ns
<b>TCD8+ células</b>	138,2	73,2-195,2	274,7	155,1-411,4	0,014
<b>CD4/CD8 ratio</b>	2,1	1,4 - 2,9	1,6	1,4 - 4,7	ns
<b>T(CD4-CD8-) %</b>	1,7	0,0 - 3,7	0,4	0,6 - 1	0,055
<b>T(CD4-CD8-) nº</b>	9,7	0,0-21,2	3,7	4,9-15,7	ns
<b>BCD19+ %</b>	15,7	11 - 24,2	9,8	3,7 - 14,5	<0,01
<b>BCD19+ células</b>	88,6	52,2-137,6	77,1	36,1-213,5	ns
<b>NK CD56+ %</b>	10,3	5 - 14,4	8,4	5,7 - 14,8	ns
<b>NK CD56+ células</b>	56,4	21,9-134,8	79,6	58,0-160,2	ns
<b>HLA-DR (MFI)</b>	1408	824 - 2729	1323	854,3-1739,5	ns
<b>IgA (mg/ dL)</b>	250	207 - 274	205	164 - 287	ns
<b>IgG (mg/ dL)</b>	1131	1076 - 1370	914	630,3 – 997,3	ns
<b>IgM (mg/dL)</b>	160,5	125 - 189	72	58,5 - 128,5	<0,01
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	558,1	180 - 1880	1345	819,25-2124,25	<0,01
<b>IL6 (pg/ml)</b>	64,1	31,6-141,9	274,7	89,8-1207	<0,01
<b>PCR(mg/dl)</b>	15,5	9,2-24,9	14,2	5,2-24,4	ns
<b>Mortalidad</b>		29,3%		42,3%	ns

**Tabla 60.** Comparación de parámetros inmunitarios, inflamatorios y biomarcadores entre gripe H1N1 y COVID-19.

## 6. DISCUSIÓN

En nuestra serie, los pacientes con gripe presentaron el perfil característico descrito en otras publicaciones.<sup>174,175</sup> La edad media fue de  $56,3\pm 14,9$  años para el grupo total de gripes y  $53,1\pm 14$  para la H1N1. El 56.8% de los pacientes tenía menos de 50 años y el 84% menos de 60. La edad media en los no supervivientes en el grupo total de gripes fue de  $60,7\pm 15$ , superior al de la gripe N1H1, que fue de  $55,8\pm 15$ . A pesar de que la tasa de letalidad de la última pandemia fue inferior al 0,05%, un tercio de los casos graves eran personas jóvenes y de mediana edad sanas anteriormente, un grupo poco afectado durante las epidemias estacionales, que afectan predominantemente a los pacientes pediátricos, con una inmunidad poco desarrollada, y los ancianos, caracterizados por el fenómeno de inmunosenescencia. Esta tendencia fue observada también durante la pandemia de 1918.<sup>176</sup>

La incidencia de sexo femenino fue de un 45% en el grupo total, mientras que en el subgrupo de gripes A N1H1 fue ligeramente más frecuente en las mujeres, aunque no de forma significativa. En series sobre todo iniciales tras la pandemia, donde diferencian el sexo en cada estrato de edad, se observa una frecuencia mayor de enfermedad grave en mujeres entre los adultos en edad reproductiva (18-49 años), sin ser necesariamente embarazadas, mientras que en aquellos que no diferencian entre franjas de edad, el hombre normalmente predomina. Sin embargo, esta tendencia ha podido modificarse ya que, si bien por motivos genéticos y hormonales las mujeres generan mayores respuestas de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y experimentan una mayor morbilidad y mortalidad que los hombres, también poseen una respuesta humoral más potente creando una inmunidad cruzada tras la vacunación o el contacto con estirpes similares más eficaz. Además las mujeres tradicionalmente se adhieren con mayor frecuencia a los programas de vacunación en caso de estar indicado.<sup>177</sup>

La incidencia de obesidad (IMC > 30) fue del 32,4% con un IMC medio del  $28,6\pm 8$  en general y del 39,4 % en el grupo de mortalidad. Este dato es acorde a los estudios epidemiológicos durante la pandemia de gripe A H1N1 en el 2009 y en estudios posteriores, donde la obesidad se muestra como un factor de riesgo de hospitalización y necesidad de ventilación mecánica<sup>178</sup>. Sin embargo, en un estudio multicéntrico llevado a cabo para estudiar el efecto sobre el pronóstico de la obesidad sobre estos pacientes, se observó que tras ajustar la mortalidad a la

severidad y factores de confusión, la obesidad no estaba asociada significativamente con la mortalidad.<sup>179</sup> Esto concuerda con la llamada paradoja de la obesidad observada en otras patologías por ejemplo en las NAC bacterianas.<sup>180</sup>

La mortalidad del grupo total de gripes fue de 29,5 % en la UCI y 31,9 % en el hospital y a los 90 días. La mortalidad hospitalaria en los pacientes con gripe B fue del 50%, mayor que la gripe por H1N1 (29,3%) y que la H3N2 (30,3%) y similar a las registradas en las neumonías bacterianas. Destacar que en los pacientes con Gripe B sufren un alto porcentaje de coinfección/reinfección, fundamentalmente con bacterias Gram+, acompañando en su evolución con un alto porcentaje de situación de shock y necesidad de aminas. Además de mayor edad y comorbilidades como obesidad, enfermedades hematológicas, hábito tabáquico y diabetes mellitus. En un análisis secundario de la GETGAG/SEMICYUC, los pacientes con NAC por H1N1 ingresados en UCI tuvieron una mortalidad del 18,8 %, frente al 39% de la mortalidad del grupo de neumonía adquirida en el hospital. A pesar de ser pacientes con neumonías adquiridas en la comunidad, esta diferencia puede deberse a la mayor comorbilidad y gravedad al ingreso de los pacientes en nuestra serie, posiblemente por criterios de ingreso en UCI más exigentes.<sup>181</sup>

Nuestra serie presenta una puntuación SOFA mediana de 7 (IQR 4-10). Un número significativo de pacientes en el ingreso en la UCI se mantuvo hemodinámicamente estable, sin necesidad de fármacos vasoactivos y con niveles normales de lactato, con solo insuficiencia respiratoria y puntaje SOFA moderadamente bajo en el momento del ingreso. Posteriormente, un gran número de pacientes desarrollaron shock séptico y requirieron fármacos vasoactivos.

Los pacientes con neumonías graves por virus de la influenza A N1H1 se presentan más complejos con afectación de parámetros los respiratorios y hemodinámicos: deterioro de la oxigenación, necesidad de la VM, incidencia de shock así como la necesidad de las medidas terapéuticas como la ventilación en posición en prono, el reclutamiento alveolar, la necesidad de aminas y la necesidad de HFVVC. También son mayores en las neumonías por H1N1 el uso de corticoides y diuréticos.

En nuestra muestra, los pacientes inmunodeprimidos representan el 28% (34/122), incluidos 2 pacientes oncohematológicos. En ellos la mortalidad fue del 22%, menor que la del grupo total (30%). Nuestros datos respaldan la idea de que un historial individual de compromiso inmunológico, tratamiento con medicamentos inmunosupresores, enfermedades hematológicas o SIDA no está relacionado con un pronóstico desfavorable de la gripe. Esto difiere de los datos publicados. En el análisis de una cohorte de 1899 pacientes del GETGAG/SEMICYUC ingresados en la UCI por infección grave por H1N1, 238, es decir, 12,5% fueron categorizados como pacientes inmunocomprometidos, y en estos pacientes la mortalidad fue significativamente mayor: 19.9% vs 49.6%.<sup>182</sup> Además, la adquisición hospitalaria de la gripe A (H1N1), una variable independientemente asociada con la mortalidad, es tres veces más frecuente en los pacientes inmunodeprimidos, siendo en nuestra muestra todas NAC.<sup>183</sup>

Cabe destacar la ausencia de un grupo de riesgo reconocido: mujeres embarazadas. Desde que los obstetras están concienciados del riesgo aumentado de complicaciones en esta población, la protocolización de la vacunación independientemente del trimestre de gestación y factores de riesgo asociados, y el inicio precoz de tratamiento con antivíricos ya desde urgencias, han podido ser el motivo de la ausencia de representación en nuestra serie.

Como hemos comentando en la introducción, la coinfección bacteriana en los pacientes con gripe es muy variable oscilando entre el 2-65 % en las distintas series. En nuestro caso la incidencia de coinfección confirmada fue del 22,9%. Entre los microorganismos más frecuentes se encuentran los *Streptococcus pneumoniae* y el *Staphylococcus aureus*, coincidiendo con los más frecuentes en la literatura.<sup>184</sup>

Por otro lado, la sobreinfección se sospechó en el 30% de los pacientes con gripe ingresados en UCI, siendo confirmada en el 13% por aislamiento de gérmenes. Los microorganismos más frecuentemente aislados fueron gram-negativos.

Los aislamientos microbiológicos fueron considerados infección frente a colonización teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos clásicamente por la comunidad

científica<sup>237,238</sup> aunque no deja de ser objeto de debate ya que varios factores interfieren en su interpretación<sup>239</sup>. Los aislamientos por *Cándida albicans*, incluso en cuantificaciones significativas, no solemos tratarlas, en base a la estrategia Tarragona<sup>240</sup>. Sin embargo en los casos descritos con aislamiento por cándida en el BAL o secreciones bronquiales recibieron tratamiento a criterio del clínico en base a la situación de neutropenia y otros factores de riesgo como nutrición parenteral, corticoides, situación clínica con fiebre y deterioro respiratorio no explicado por otras causas. Los 4 pacientes en los que se aisló *Candida albicans* fueron considerados inmunodeprimidos por ser hematológicos o tratados previamente con corticoides. Otros gérmenes aislados fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Acinetobacter baumannii*, microorganismos relacionados con la ventilación mecánica y catéteres venosos centrales o arteriales.

Teniendo en cuenta el tipo de influenza encontramos diferencias. La gripe B se encontraba coinfección en el 57,4%, seguido de la H3N2 con 45,4% y finalmente la H1N1 con un 33,3%. La gran incidencia de coinfección explicaría en parte, el patrón de mayor de gravedad que los casos confirmados de virus H3N2 y B, respecto a temporadas previas.<sup>185</sup>

Tanto la coinfección como la sobreinfección son una fuente de morbimortalidad reconocido, lo que está a corde con nuestros datos: tanto la coinfección como la sobreinfección fueron más frecuentes en los no supervivientes tanto en el grupo total de gripes ingresadas en UCI (coinfección: 36% vs. 47%,  $p < 0,05$ ; sobreinfección: 12% vs. 27%,  $p > 0,05$ ), como en el grupo H1N1 (coinfección: 30,2% vs. 41%  $p < 0,05$ ; sobreinfección: 17% vs. 36%,  $p < 0,05$ ). Para hacer frente a una infección, el organismo recurre a estrategias no mutuamente excluyentes: resistencia, es decir, neutralización o destrucción del patógeno; o tolerancia, la capacidad de resistir los daños producidos por el patógeno o por la defensa del huésped. Los mecanismos de aumento de la mortalidad después de coinfecciones bacterianas asociadas a la influenza incluyen una resistencia antibacteriana fallida e inmunopatogenicidad sinérgica, además de tolerancia fallida<sup>186</sup>.

Respecto a las coinfecciones/sobreinfecciones víricas, no encontramos ningún caso. Según la

literatura, un porcentaje no desdeñable de las infecciones respiratorias agudas por virus son mixtas, asociados a aquellos que circulan en el momento epidemiológico.<sup>187, 241</sup> La mayoría de los estudios publicados es sobre población pediátrica, motivo por el cual puede diferir los datos encontrados en nuestra población, sólo adulta.



## 6.1. BIOMARCADORES

La diferenciación de la etiología de la neumonía nos permite el uso racional de antibióticos. Sin embargo, existe poca literatura sobre el papel de los biomarcadores en la diferenciación de etiología en la NAC. En un reciente revisión y metanálisis en población pediátrica, observaron que la PCR era mayor en las neumonías bacterianas que en las víricas, pero existe un problema en la fijación de un valor de corte adecuado que sea sensible y específico para diferenciar entre los dos. La PCT parece mostrarse más específico que la PCR para diferenciar entre ambas etiologías. La MR pro-ADM sin embargo, no fue útil en la predicción de la etiología, aunque sí en su severidad.<sup>188</sup>

En el estudio TRIAGE<sup>166</sup>, un gran ensayo multicéntrico, Schuetz et al demostraron que la combinación de MR-proADM e información clínica al ingresar a la sala de Urgencias mejoró significativamente la estratificación del riesgo y predijo la necesidad de ingreso en la UCI.

En relación a las infecciones de origen respiratorio, los niveles de MR-proADM han demostrado un gran poder discriminatorio para predecir complicaciones, ingreso en UCI, mortalidad a corto, medio y largo plazo y mejoría de la estratificación en combinación con los sistemas de puntuación clínicos, independiente de la etiología de la NAC (bacteriana, atípica/viral o mixta).<sup>189</sup>

La utilidad de los niveles de MR-proADM en pacientes sépticos, independientemente del organismo, también se ha demostrado pero no se ha estudiado específicamente en infecciones por influenza como fuente de sepsis. Este es el primer estudio que evalúa la capacidad de predicción de la gravedad de la enfermedad, el resultado desfavorable, el riesgo de ingreso en la UCI, la necesidad de ventilación mecánica y la mortalidad. Además, hemos demostrado la superioridad pronóstica de los niveles de MR-proADM sobre otros marcadores como PCR, PCT y lactato y sobre los sistemas de puntuación de gravedad SOFA y Apache II.

En un estudio en 326 pacientes sépticos en el que 20 pacientes fueron infecciones virales, Andaluz-Ojeda informó niveles más bajos de MR-proADM en este subgrupo, con un nivel

medio de 1.2 nmol / L (rango intercuartil 3.4), respecto al grupo de sepsis bacteriana. La puntuación SOFA del subgrupo de sepsis virales fue más baja, (SOFA promedio de 6.5 puntos, en comparación con 9 puntos en pacientes de otro origen). Esos autores examinaron la capacidad de MR-proADM para predecir la mortalidad en pacientes sépticos con diferentes grados de insuficiencia orgánica, en comparación con la procalcitonina, la proteína C reactiva y el lactato. Destacó esta superioridad sobre todo en el rango de puntuación SOFA menor de 6 puntos donde solo los niveles de MR-proADM fueron útiles para la predicción de mortalidad a los 28 días; por lo tanto, es un buen candidato para la identificación temprana del riesgo de mortalidad en pacientes sépticos con puntuaciones en escalas de gravedad moderada de la enfermedad, como podría ser los pacientes con neumonía grave por influenza.<sup>190</sup>

En el trabajo de Cifuentes et al. se evalúa la utilidad de la MR-proADM frente a otros biomarcadores como NT-ProBNP, PCR y PCT en la predicción de mal pronóstico en pacientes admitidos en Urgencias con síndrome gripal. Si bien la MR-proADM presenta mayor capacidad predictiva en el grupo total, no así en el subgrupo de pacientes con gripe H1N1 confirmada. Los autores señalan sin embargo que el grupo fue reducido y con un escaso número de sucesos, lo que limitaría la potencia estadística del subanálisis.<sup>191</sup>

En nuestra serie, los niveles de PCT al ingreso fueron estadísticamente diferentes en los pacientes ingresados y no ingresados en la UCI tanto en el grupo total de gripes como en el grupo de cepa N1H1. Entre los subgrupos de gripe los niveles de PCT en las gripes B fue significativamente mayor que en los otros subgrupo de gripe A. Creemos que debe ser debido a la alta incidencia de coinfección y sobreinfección de este grupo que alcanzó el 71,4 %, con un 43 % de Gram+. En un porcentaje del 39,34% de todas las gripes hubo coinfección al ingreso o reinfección aislándose bacterias, hongos y flora poli-microbiana durante el seguimiento (especialmente en los no sobrevivientes) y fueron factores independientes de mal pronóstico. Entre los grupo de supervivencia también se observó diferencias en el subgrupo de las gripe B: 2,5 vs. 12,2, no siendo significativo, probablemente por el bajo número de pacientes de este subgrupo.

Podemos concluir por tanto que la medición de PCT puede ayudar a discriminar entre infecciones graves del tracto respiratorio de origen bacteriano y H1N1. En pacientes ingresados en la UCI con gripe, la PCT es un marcador sensible con un buen valor predictivo negativo para la detección de infección bacteriana y es superior a la PCR. Los valores bajos de PCT, particularmente cuando se combinan con niveles bajos de PCR, sugieren la ausencia de infección bacteriana, ya sea sola o en combinación con la influenza.

Respecto a la IL-6 observamos mayores valores en las neumonías bacterianas ingresadas en UCI que en las neumonías por gripe. Sin embargo, esta es mayor en la H1N1 respecto a otras serotipos. En animales, se ha observado una mayor elevación de IL-6 en infecciones por H1N1 que por otro tipo de cepas.<sup>192</sup> Además se ha reportado tanto en modelos animales como en humanos su correlación con la severidad de la infección por influenza.<sup>193</sup> La identificación de este tipo de biomarcadores pueden tener implicaciones a nivel terapéutico. Por ejemplo, en el caso de ARDS se han observado diferentes fenotipos: hiperinflamatorio e hipoinflamatorio. El fenotipo hiperinflamatorio, asociado a una mayor mortalidad, se caracteriza por niveles elevados en plasma de biomarcadores como IL-6, IL-8, sTNFR-1.<sup>241</sup> Parece que estos pacientes responden de forma diferente a la fluidoterapia, parámetros ventilatorios o a tratamientos como la simvastatina<sup>242-245</sup>

En el análisis de la curva ROC para los diferentes biomarcadores se mostraron sensibles para predecir la severidad tanto en el grupo total de gripes como en los distintos subgrupos de gripe. En nuestra serie, los valores superiores a 1,1 nmol / l de MR pro-ADM en el ingreso hospitalario definieron pacientes que desarrollan insuficiencia respiratoria grave con una sensibilidad del 55%, una especificidad del 90% en el grupo total y en los pacientes con H1N1. Una alta proporción de estos pacientes (85,3 %) requerirá ventilación mecánica. En el trabajo de Cifuentes, el análisis de las curvas ROC para la PCT y PCR no fueron estadísticamente significativas. La MR pro-ADM mostró una AUC de 0,73 para valores >1 nmol/ l, con una sensibilidad y especificidad del 70 y 64% respectivamente. Sin embargo, en los pacientes con infección por H1N1 demostrada esta no fue significativa. Los valores superiores a 1,2 nmol / l son útiles para definir un pronóstico desfavorable en pacientes ingresados en la UCI. Este punto de corte detecta la mortalidad con una sensibilidad del 95% y un valor predictivo negativo 98,6%. Destaca el mayor valor en las gripes B, así como su valor en la predicción de

mortalidad en el análisis de la curva ROC, con una AUC de 0,812. De nuevo es probable que se deba al alto porcentaje de coinfección hallada en estos pacientes.

Los resultados del análisis multivariable (Cox proportional hazards models) mostró que los niveles de PCT y MR pro-ADM fueron factores estadísticamente significativos como predictores de mortalidad en UCI y solo los niveles de de MR proADM en la mortalidad hospitalaria. En análisis realizados y publicados en pacientes sépticos de etiología bacteriana los niveles de MR proADM se han mostrado predictores de la mortalidad. Nuestro grupo en una reciente publicación<sup>194</sup> en el análisis multivariable a las 48 horas de ingreso los niveles de MR-proADM fueron un predictores significativos de mortalidad tanto en la UCI como a los 90 días.

Nuestros resultados pueden tener implicaciones para la práctica clínica y la investigación. Los niveles de MR-proADM pueden proporcionar una nueva vía directa y rápida para mejorar la precisión del pronóstico. Esto es particularmente importante en los pacientes que presentan solo insuficiencia orgánica respiratoria y en los que es difícil predecir la evolución clínica: en la actualidad, algunos incluso pueden ser dados de alta en casa, solo para regresar al hospital para la admisión en UCI y para recibir asistencia respiratoria urgente. La alerta temprana de la probabilidad de insuficiencia respiratoria grave en pacientes con gripe, sobre todo los pacientes con H1N1, puede ayudar a orientar las decisiones sobre la estrategia de tratamiento más adecuada y puede reducir la mortalidad en la UCI. MR-proADM estratifica adecuadamente a los pacientes de alto riesgo, y es probable que sea útil para nuevos tratamientos en pacientes con H1N1.

## 6.2. HIERRO Y PROTEÍNAS RELACIONADAS

Los valores del metabolismo del hierro en nuestros pacientes ingresados en UCI presentan una tendencia de valores del metabolismo del hierro similar a las existentes en la literatura. Darveau realiza una revisión donde expone los valores medios de los pacientes críticos en la literatura: ferritina  $> 300 \mu\text{g} / \text{l}$ , hierro sérico  $<9 \mu\text{mol} / \text{l}$  (o  $<60\text{mg/dL}$ ), saturación de transferrina entre 10% y 20%, y los niveles de transferrina  $<3 \text{mg} / \text{dl}$ , que contribuye a la tan frecuente anemia encontrada en estos pacientes.<sup>195</sup> En nuestra muestra de pacientes ingresados en la UCI la mediana de hierro sérico ferritina y transferrina fue de 48 mg/dL, 365 ng/mL y 190 mg/dL respectivamente.

Nuestra serie muestra unos valores de ferritina más acusados en los pacientes sépticos con neumonía bacteriana, mostrando una diferencia significativa con respecto al subgrupo de las neumonías por gripe: 549,4 ng/ml vs. 274,7 ng/ml ( $p= 0,029$ ). El hierro fue significativamente más bajas en las neumonías bacterianas ingresadas en UCI que en las neumonías por gripe (24 mg/dl vs. 66 mg/dl,  $p<0,01$ ). De la misma forma la transferrina también es significativamente más baja en las bacterianas respecto a las gripes: 147 mg/ dl vs. 196 mg/ dl,  $p<0,01$ ). Las infecciones bacterianas son la causa más frecuente de sepsis, atribuyéndose con poca frecuencia a infecciones virales. Los productos bacterianos, fundamentalmente componentes de la pared celular, activan el sistema inmune al fabricar y liberar mediadores inflamatorios responsables de la respuesta inflamatoria. La endotoxina, o más precisamente el lipopolisacárido bacteriano (LPS), es reconocido como el mediador microbiano más potente involucrado en la patogénesis de la sepsis y el choque séptico. Lo más probable es que esta diferencia radique en una menor afectación sistémica de los pacientes con sepsis por virus respiratorio, a costa de un fallo respiratorio profundo. Sin embargo, si comparamos la mediana de los valores entre los pacientes ingresado en UCI por neumonía bacteriana y gripe H1N1 encontramos que no existe diferencias significativas, siendo valores muy similares: hierro 24 mg/dl vs. 54,5 mg/ dl,  $p>0,05$ ; ferritina 549 ng/ ml vs. 304,750  $p>0,05$ ; transferrina 147 mg/dl vs. 207  $p>0,05$ . Esto se debe a que la sepsis por el virus de la influenza A puede presentar una clínica similar a la sepsis bacteriana, con gran impacto sistémico, dado que la

respuesta inmune a la gripe comparte muchas vías con la respuesta a la bacteriana.<sup>196</sup> Además en tanto que la infección por gripe favorece la infección bacteriana secundaria, se aumenta 6 veces la probabilidad de sufrir una sepsis bacteriana.<sup>197</sup>

Comparando los valores entre el grupo total de gripes ingresadas en UCI y el grupo control no ingresado en UCI, existe sólo una diferencia significativa en el valor de la ferritina: 247 ng/ ml vs. 95,4  $p < 0,05$ . Sin embargo el hierro y transferrina aunque siguen la tendencia observada en los pacientes ingresados en UCI, no es significativo: 43,5 mg/dl vs. 79 mg/ dl,  $p > 0,05$ ; transferrina 196 mg/dl vs. 263  $p > 0,05$ . Si analizamos por subgrupos, llama la atención la gran diferencia de los valores de ferritina en los pacientes H1N1 respecto a H3N2 y B: 558 mg/dl vs. 74,9 mg/dl y 64,3 mg/dl respectivamente. Esto denota la importancia en la fisiopatología de la sepsis por H1N1 de la ferritina y su papel inmunomodulatorio.

En el análisis por grupos de supervivencia también observamos que la mediana de los valores de ferritina en los pacientes fallecidos por neumonía por gripe es significativamente mayor que en los supervivientes: 670 mg/dl vs. 143 mg/dl,  $p < 0,05$ . Si analizamos por subgrupos, esta se mantiene significativa y más profunda en los pacientes H1N1 (1922 mg/dl vs. 245 mg/dl,  $p < 0,05$ ), no así en los virus B y H3N2. Son varios los autores que han estudiado el factor pronóstico de la ferritina. Uno de los primeros estudios que describió la alteración en el metabolismo del hierro y su relación con el pronóstico en pacientes críticos fue Bobbio-Pallavicini<sup>198</sup> que realiza un estudio prospectivo en 51 pacientes críticos postquirúrgicos, donde se le realiza al ingreso y semanalmente una determinación del metabolismo del hierro: sideremia, ferritina, transferrina, Índice de saturación de la transferrina (IST), Capacidad total de fijación del hierro (CTFH), hemoglobina y lactoferrina. Se determina también la GPT y LDH para evaluar una posible citolisis de glóbulos rojos, músculo o daño hepático. El 80% de los pacientes fueron diagnosticados de sepsis en el postoperatorio. El grupo séptico presentó una reducción significativa de la transferrina y de la hemoglobina y un aumento significativo de la ferritina, con un mínimo efecto sobre el hierro sérico y los niveles de GPT y LDH. En los pacientes supervivientes se observaron un aumento progresivo y significativo del hierro sérico, transferrina, hemoglobina, e interesante también la LDH y GPT, y una disminución en la

ferritina; mientras que en los no supervivientes se agravan los niveles iniciales. Por otro lado se encontró una significativa correlación positiva entre los niveles iniciales (ferritina) y en el score se gravedad SAPS.

García et al.<sup>199</sup> realiza un estudio prospectivo observacional en pacientes pediátricos que ingresan en UCI con el diagnóstico de sepsis severa o shock séptico. Se divide los pacientes en tres grupos, aquellos con un ferritina menor a 200 ng/ml, entre 200 y 500 ng/ml y más de 500 ng/dL. Se seleccionan dichos puntos de corte por considerar 200 ng/mL como el límite alto de la normalidad y 500 ng/dL por ser el nivel medio patogénico de ferritina en pacientes críticos adultos en las series publicadas. Se realiza también el cálculo del índice de ferritina, un índice por rango de edad dado que los valores de normalidad varían según la edad pediátrica. La ferritina por encima de 500 ng / ml tenía una sensibilidad del 64% y 80% especificidad para predecir la mortalidad, y se asoció con un RR 3.2 (1.3–7.9) de mortalidad ( $p = 0.01$ ). Llama la atención la distribución de mortalidad por grupos siendo del 24% en aquellos con ferritina <200 ng/ml, 9% entre 200 y 500 ng/ml y del 58% en aquellos con una ferritina >500 ng/ml. Probablemente en el primer grupo, una ferritina por debajo de 200 incluyan pacientes en los que el efecto protector de la hiperferritinemia no se observa y se asocia a una mayor severidad y a un peor pronóstico. En el caso de nuestra serie su relación con la severidad y mortalidad queda clara, tanto en el análisis de la curva ROC con una AUC de 0,848 con una sensibilidad del 80% y especificidad del 83,5% para predecir la mortalidad, así como el análisis de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier donde valores >830 ng/ ml mostraron un aumento significativo de la mortalidad. En el análisis multivariante los niveles de ferritina al ingreso también se mostraron predictores de mortalidad.

Por tanto, el hallazgo de una hiperferritinemia en el paciente crítico no es inusual. Como hemos avanzado en la introducción, la inflamación y la infección inducen el bloqueo de la liberación de hierro, lo que resulta en una disminución del hierro sérico, un factor de virulencia para muchos microorganismos. Los niveles elevados de ferritina sérica se han considerado una proteína reactante de fase aguda, como respuesta refleja del organismo para privar a los microorganismos del hierro sérico. Sin embargo, hay una creciente evidencia de que la ferritina

tiene un papel activo en la modulación de la inmunidad e inflamación. Entraña una respuesta fisiológica y beneficiosa para el paciente, pero que en determinadas ocasiones puede reflejar un respuesta inflamatoria excesiva que contribuye a la severidad de la sepsis y por tanto en su fisiopatología.



### 6.3. INMUNIDAD E INFLAMACIÓN

Las neumonías ingresadas en la UCI muestran unos parámetros inmunitarios diferentes según el tipo de microorganismo, así los pacientes con neumonía de origen bacteriana presentan una mayor leucocitosis a expensas de PMN y monocitos. Los microorganismos como las bacterias inician una respuesta inflamatoria que comienza al ser encontradas por CPA que inducen una liberación de citocinas y un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, permitiendo que los líquidos y proteínas pasen al interior de los tejidos. También producen quimionas que dirigen la migración de los neutrófilos, siendo las primeras células que penetran, seguidos de los macrófagos.<sup>200</sup> Por tanto, la leucocitosis observada en las neumonías bacterianas se debe, en la mayoría de los casos, a porcentajes elevados de células de la serie granulocítica. Por otro lado, los fagocitos son la principal respuesta inmune protectora frente a bacterias (sobre todo intracelulares), ya que su reclutamiento y activación a través de ligando de CD40 e IFN $\gamma$  es parte fundamental de la respuesta celular innata durante los primeros momentos de la infección. Los productos de estos microorganismos son reconocidos por los TLR y las proteínas citoplasmáticas de la familia de receptores similares a NOD (NLR), lo que da lugar a la activación de las células fagocíticas.<sup>201</sup>

Un resultado interesante es el aumento de los valores de células NK CD56+ en el grupo de las neumonías bacterianas, tanto relativo (14,4 vs. 9,9;  $p=0,019$ ) como absoluto (125,5 vs. 72,23,  $p=0,04$ ). La respuesta innata frente a las bacterias intracelulares está mediada no solo por fagocitos, también por células citotóxicas: las células NK. Las bacterias activan los linfocitos NK estimulando la expresión de ligandos activadores de las NK en las células infectadas, y la síntesis en macrófagos y células dendríticas de IL12 y IL15, inductoras de las NK. EL IFN $\gamma$  derivados de las NK incrementa la capacidad de los macrófagos de eliminar microorganismos, de forma similar al producido por los linfocitos T. Así se puede controlar la infección en días o meses y dar tiempo de que se desarrolle la inmunidad mediada por linfocitos T. Por tanto, las NK proporcionan una defensa inicial frente a estos microorganismos, antes de que se desarrolle la inmunidad adaptativa. Pero la inmunidad innata es incapaz de erradicar estas infecciones sin la contribución de la inmunidad adaptativa. El

hecho de que las NK esté disminuido en el grupo de gripes ingresadas en UCI puede indicarnos un fallo en la respuesta innata inmediata de estos pacientes para controlar la infección por el virus.<sup>202</sup>

En el caso de que las bacterias escapen de los fagosomas, o los antígenos bacterianos se transporten desde el fagosoma al citosol de la célula huésped, la célula es eliminada por los linfocitos TCD8+ citotóxicos. En nuestros resultados, dentro de las poblaciones linfocitarias, el ratio de linfocitos TCD4/CD8 está más disminuido en infecciones bacterianas, aunque no alcanza la significación estadística. Ello puede deberse a un aumento de células citolíticas TCD8+, que eliminarían las células infectadas. En los pacientes con neumonía grave por gripe se observó también un aumento en los linfocitos T doble negativos (CD4-/CD8-) comparado con las neumonías graves de etiología bacteriana (1,6 vs 0,4;  $p < 0,01$ ).<sup>203,204</sup> En las subpoblaciones linfocitarias, además, se encontró un aumento del porcentaje de los linfocitos B CD19+ en el grupo de las gripes (10,6 vs.16,8;  $p < 0,01$ ). Estas células son claves en la respuesta adaptativa, al sintetizar los anticuerpos específicos frente al microorganismo invasor. En las determinaciones de inmunoglobulinas se observa un aumento significativo de los niveles de IgG e IgM en las neumonías por gripe respecto a las neumonías de etiología bacteriana. Este aumento se reproduce en el grupo de neumonía de etiología por otros virus distintos a los de la gripe. La respuesta por anticuerpos frente a virus es de alta afinidad, siendo eficaces solo durante el estadio extracelular de la vida de estos microorganismos. Los anticuerpos desarrollarán su actividad mediante activación del complemento (promoviendo la fagocitosis y lisis directa del virus con envoltura lipídica), neutralización del microorganismo y opsonización y fagocitosis de los mismos. La IgM, al ser pentamérica es clave en la neutralización de virus. Los anticuerpos secretados, especialmente los de isotipo IgA, son importantes para neutralizar virus dentro de las vías respiratorias, no siendo significativos en nuestra muestra. Aquí nos encontramos el problema de no saber si el aumento en la producción de anticuerpos es específica frente a nuestro microorganismo o es una proliferación policlonal de células B, secundaria a la respuesta adaptativa.<sup>205,206</sup>

En nuestro estudio demostramos que hay una diferencia en la respuesta inmunitaria entre los pacientes que desarrollan una enfermedad grave y requiere ingreso a la UCI, y aquellos que sufren una enfermedad menos grave.

Los pacientes ingresados en la UCI con neumonía por influenza presentaron una mayor cifra de leucocitos y neutrófilos, aunque no estadísticamente significativa. Sin embargo si es menor en los pacientes ingresados en la UCI las cifras de linfocitos (741 vs. 1.342;  $p < 0,01$ ) y de monocitos (484 vs. 580;  $p = 0,013$ ). La linfopenia ha demostrado ser un factor asociado a mal pronóstico.<sup>207</sup> Los mecanismos que contribuyen a la linfopenia incluyen reducción producción de linfocitos, aumento de la apoptosis o necrosis, y / o el atrapamiento de linfocitos en el lugar de la infección. Los factores predisponentes no han sido completamente aclarados y no se sabe si la linfopenia contribuye a la gravedad o es una consecuencia. La linfopenia se ha asociado con la gravedad de la infección, y su intensidad varía en función de la virulencia de la cepa, siendo más profunda en infecciones por H1N1 y H5N1 que en otras como la H3N2. También se puede observar una linfopenia transitoria en casos de influenza leve, reflejando pérdida de células T de la sangre a medida que migran hacia los nódulos linfáticos. La depleción de linfocitos puede corresponder tanto a TCD4+ y TCD8+, pero parece ser más profunda en la subpoblación TCD4+, invirtiendo la relación CD4/CD8.

Se ha sugerido que el agotamiento selectivo y deterioro de la diferenciación del subconjunto de células TCD4+ está asociado con una infección H1N1 más grave.<sup>208</sup> Parece que hay una relación inversa entre la replicación del virus y conteo de TCD4+, por lo que en casos de alta replicación encontramos bajo conteo, por activación-apoptosis o marginalización, además como ocurre en infecciones por VIH, la capacidad expansión tras la activación de TCD8+ es mayor que TCD4+. Se hipotetiza que la depleción de TCD8+ es compensada por su activación y proliferación durante la infección. Esto indica que el mecanismo de la linfopenia subyacente puede afectar a ambos subconjuntos de células T pero a las pérdidas en el subconjunto TCD8+ puede compensarse por su activación y proliferación.<sup>209</sup>

En nuestra serie, el estudio de las subpoblaciones linfocitarias muestra una disminución de los linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+, y un porcentaje mayor de B CD19+ en los pacientes ingresados en UCI, tanto en el grupo total como en el subgrupo H1N1. La relación CD4/CD8 es mayor y por tanto el porcentaje de células TCD8+ es menor en los casos graves con ingreso en UCI que en los no ingresados en UCI. Esto contrasta con los datos hallados en la literatura, donde una menor relación CD4/CD8 se relaciona con la severidad.<sup>210</sup> Sin embargo consideramos que este dato no es incongruente, ya que como explicamos previamente, la eliminación de los virus que reside dentro de las células está mediado por linfocitos C citotóxicos, que eliminan a las células infectadas. La predisposición a sufrir tales infecciones aumenta en pacientes o animales que carecen de linfocitos T (inmunodeficiencia celular T). Los linfocitos TCD8+ proliferan de forma masiva durante la infección vírica. Que el cociente CD4/CD8 se mantenga elevado en las gripes de ingreso en UCI puede mostrarnos una falta de respuesta TCD8+ en estos pacientes, con la consiguiente deficiencia en la eliminación de células infectadas. Por tanto, estos hallazgos, unidos a un mayor porcentaje de B CD19+ y mayores concentraciones de IgA e IgM en los pacientes más graves, pueden sugerir que aunque haya un buen aclaramiento de virus extracelulares, éstos siguen presentes en el paciente, junto con una deficiente respuesta inmune celular adaptativa para eliminar células infectadas.

Un hallazgo que concuerda con otros trabajos es el menor número de células NK CD56+ en pacientes ingresados en la UCI por neumonía tanto en el grupo total de gripes (72 vs. 138;  $p < 0,01$ ) como en el subgrupo H1N1 (56,4 vs. 113,1;  $p < 0,01$ ). Las células NK juegan un papel vital en el control inicial de la replicación del virus de la gripe y su agotamiento conduce a aumento de la morbilidad y la mortalidad en modelos animales.<sup>211</sup> Por otro lado, las NK también pueden ser infectadas directamente por el virus de la influenza y posteriormente eliminadas por apoptosis, contribuyendo a su depleción.

La expresión de HLA-DR en monocitos (CD14+) parece jugar un papel importante en la respuesta inmune dispar en los pacientes graves, mostrando una disminución de su expresión al ingreso en los pacientes ingresados en UCI (2198 MFI vs. 7118,  $p < 0,01$ ). La expresión disminuida de HLA-DR en monocitos circulantes es marcador de inmunosupresión en

pacientes críticos, predictor de efectos adversos y de sepsis.<sup>212-214</sup> Varios estudios han revelado que la baja expresión de HLA-DR en monocitos están relacionados con un estado de inmunosupresión, con una capacidad reducida de presentación de antígeno. En la gripe esto tiene gran relevancia ya que la respuesta de las células T a las moléculas HA están restringidas por moléculas HLA-DR, por lo que puede condicionar una respuesta inmune ineficaz y estar asociado a un mal pronóstico. Si bien la linfopenia es un hallazgo descrito en muchos estudios, pocos han estudiado la expresión de HLA-DR en monocitos. Diao et al. realiza un estudio sobre el estado inmunitario en pacientes con infección confirmada por H7N9. Encontraron que la linfopenia era un fenómeno compartido por los casos leves y graves, pero que en los casos graves existía una marcada reducción de la expresión de HLA-DR en monocitos, correlacionándose negativamente con la severidad de la infección.<sup>215</sup>

En nuestro estudio, el subgrupo de neumonías por la cepa N1H1 no muestra diferencia en las cifras de leucocitos ni granulocitos entre los grupos de gravedad. Sin embargo, si hay diferencias significativas en las cifras de linfocitos y monocitos de la misma forma que en el grupo total de gripes, siendo muy significativa la diferencia de expresión de HLA-DR (en células CD14+) que fue de 1408 MFI en los pacientes ingresados en la UCI y de 7854,5 MFI en el CG ( $p < 0,01$ ). En los pacientes afectados por la cepa H3N2, con un porcentaje importante de comorbilidad y/o infección se observa un aumento de las cifras de leucocitos, granulocitos y linfocitos. Respecto a la expresión de HLA-DR (en células CD14+) fue mayor en los pacientes ingresados en la UCI (2615 vs. 5351;  $p=0,04$ ). Los pacientes infectados con cepa B también muestra aumento de la cifra de leucocitos y granulocitos y en las subpoblaciones de los B CD19+ de forma significativa con aumento no significativo de la IgM.

Con respecto a los grupos de supervivencia tanto en el grupo total como en el subgrupo H1N1 se mantiene la tendencia observada entre el grupo grave ingresado en UCI y el grupo control: valores significativamente menores de linfocitos y monocitos, células NK CD56+, y de la expresión HDL-DR en monocitos en el grupo de no supervivientes. Por otro lado los fallecidos mostraron un mayor porcentaje de B CD19+ y mayores niveles de IgA e IgM. Estos

resultados, al igual que en el caso anterior, nos confirmarían una mala respuesta celular y una presencia mantenida de virus en estadio extracelular .

Hemos comparado además el comportamiento de los parámetros de inmunidad y otros biomarcadores, en diferentes grupos según edad, IMC, estado de inmunodepresión y coinfección al ingreso con el objetivo de constatar tendencias diferentes en los distintos valores. Los pacientes mayores de 65 años tienen mayor riesgo de complicaciones graves por la gripe. Son varios los factores que pueden aumentar la susceptibilidad como una disminución de la respuesta a vacunas, desnutrición, comorbilidades, alteración de piel y mucosas entre otros. A nivel inmunitario existe además un fenómeno denominado inmunosenescencia, que si bien afecta a la inmunidad innata y adquirida, es fundamentalmente esta última la que más se ve afectada. Es importante recordar que a menudo las infecciones son oligosintomáticas, con fiebre escasa, lo que puede ser reflejo de la incapacidad de producir una respuesta inflamatoria citoquino mediada apropiada.<sup>216</sup> En nuestra serie, los paciente mayores de 65 años muestran una mayor leucocitosis a expensas de PMN, sin aumento de PCT ni PCR, y una marcada disminución de la ferritina respecto a los menores de 65 años, lo que refuerza la idea de una respuesta citoquino-mediada deficiente. Sin embargo, no existen diferencias significativas en los linfocitos. La alteración en las poblaciones linfocitarias son clave en la inmunosenescencia, pero al ser una alteración habitual en los pacientes graves por gripe no podemos saber si en este grupo es por la infección *per se*, o agravada por la inmunosenescencia.

La inmunodepresión es un factor de riesgo para la severidad en la influenza, motivo por el cual es una indicación anual para la vacunación. En nuestra serie, su mortalidad no es mayor comparado con el grupo total. Además comparando los parámetros inmunitarios y otros biomarcadores no se encuentran diferencias significativas. La obesidad parece que puede producir una respuesta ineficaz por secreción inapropiada de moléculas inmunomoduladoras como adiponectina y leptinas, sin embargo en los parámetros estudiados no se han hallado diferencias significativas. Finalmente, si comparamos aquellos pacientes con coinfección al ingreso, observamos un mayor aumento de marcadores de infección bacteriana: leucocitosis a

expensas de PMN, mayor valor de PCR y PCT. Un dato importante que desconocemos, sobre todo en el grupo de inmunodeprimidos y mayores de 65 años, es su tasa de vacunación.

## 6.4. INMUNOFENOTIPOS PREDICTORES DE SEVERIDAD EN LA GRIPE A H1N1

Como hemos descrito en el apartado de Material y Métodos, Giamarellos-Bourboulis et al, proponen que los pacientes con sepsis pueden clasificarse en tres patrones: síndrome de activación del macrófago, caracterizado por una hiperferritinemia, inmunoparálisis caracterizada por una baja expresión de HLA-DR en monocitos en ausencia de una ferritina elevada y un estado intermedio sin una severa disfunción inmune. Teniendo en cuenta en nuestra serie la gran repercusión en el pronóstico y mortalidad tanto de la ferritina como de la HLA-DR hemos encontrado muy acertado este modelo para observar el comportamiento de otros componentes de la inmunidad e inflamación que nos permita caracterizar la inmunodisfunción en los distintos grupos de pacientes.

Los puntos de corte obtenidos son: Ferritina 350 ng/ml y HLA-DR 4500 MFI. Estos corresponden a los valores de la mediana de los pacientes ingresados en UCI con una MR-proADM de 1,2 nmol/L. Este valor corresponde al punto de corte para la mortalidad. Esto resulta muy interesante porque nos permite relacionar la inmunodisfunción con el grado de fallo orgánico reflejado por el nivel de MR-pro ADM. Además coinciden con los puntos de corte de ambos para la predicción de severidad en el análisis de la curva ROC.

El grupo 1, denominado normal, no muestra alteraciones acusadas en las subpoblaciones linfocitarias importantes, siendo la gran mayoría (93%) pacientes no ingresados en la UCI con un 100% de supervivencia.

El grupo 2 o hiperinflamado, es el que a priori identificaríamos como en el extremo proinflamatorio, y por ende con peor pronóstico. Sin embargo, observamos una tasa de ingreso en UCI aunque mayor que en el grupo 1, muy inferior a los grupos 3 y 4 y de nuevo sin producirse ninguna defunción. Las alteraciones inmunitarias observadas son linfopenia, tanto de BCD19, TCD4 y TCD8 aunque más pronunciada en la subpoblación CD8, y disminución marcada de NK. Se observa una hiperferritinemia con una mediana de 907 ng/ml. Destaca también una mayor concentración de inmunoglobulinas. Estos hallazgos nos podrían indicar



que pese al desequilibrio inicial, quizá por una mayor carga viral, que condiciona el ingreso hospitalario, existe una vuelta a la homeostasis inmunitaria.

El grupo 3 o denominado inmunodeprimido, se caracteriza por una linfopenia, sobre todo de TCD4 y TCD8 con una inversión de la relación CD4/CD8 y una expresión de HLA-DR muy disminuida en monocitos. Destaca la alta tasa de ingreso en UCI (81,8%), así como un 18,8% de mortalidad. El valor de la MR-proADM duplica a los del grupo 1 y 2. Destaca en ausencia de hiperferritinemia, mayores concentraciones de IL-6 y PCR que en el resto de subgrupos. Se trata por tanto de pacientes con marcada inmunodisfunción en un entorno inflamatorio caracterizada por una secreción inadecuada de ferritina, bajos niveles de linfocitos y baja expresión HLA-DR en monocitos. Estos datos concuerdan con los hallados el estudio de Garcia et al, apoyando que la hiperferritinemia puede formar parte de una respuesta inmune competente, y que tanto su exceso como déficit se relacionen con el mal pronóstico en estos pacientes.

El grupo 4 o mixto, observamos fenómenos compartidos entre los grupos 2 y 3, con una gran repercusión pronóstica: 92,3% de ingreso en UCI y 38,5% de mortalidad. El valor de la mediana de MR-proADM es el más alto respecto al resto: 1,3 nmol/L. Es probable que el mecanismo fisiopatológico de la inmunodisfunción en este grupo se asemeje al síndrome hemofagocítico asociado a virus, acompañado de una respuesta antiinflamatoria concomitante y proporcional que condiciona, en nuestro grupo una disminución marcada de HLA-DR en monocitos. Se ha observado en niños con infecciones graves por influenza una alta correlación entre la IL-6 y 10, pudiendo la IL6 inducir la producción de IL-10, y suponer la evolución de la enfermedad, aunque se desconocen los mecanismos subyacentes.<sup>217</sup>

Por otro lado, la IL-10 parece que media, al menos parcialmente, la baja expresión de HLA-DR mediante la re-endocitosis en monocitos y posterior secuestro intracelular de moléculas MHCII.<sup>218</sup>

En el síndrome hemofagocítico primario, alteraciones genéticas granzimas y perforinas de NK y linfocitos T hace que el estímulo inmuno-activador para la eliminación células infectadas se

perpetúe. La regulación negativa fisiológica, denominada muerte celular inducida por activación, es fundamental para el control de la respuesta inmune. La incapacidad de eliminar el estímulo antigénico resulta en una respuesta inmune persistente y amplificada, con una alta liberación de citoquinas por las células inmunes activadas que dan como resultado altos niveles de activación de macrófagos con hemofagocitosis resultante, daño tisular e insuficiencia orgánica. En el síndrome hemofagocítico secundario, se han descrito diferentes patrones de activación de linfocitos por el cual persiste el estímulo inmuno activador.<sup>220</sup> En el caso de la influenza se postula que un aclaramiento prolongado de la infección por el virus de la influenza puede conducir en pacientes susceptibles al desarrollo de una hemofagocitosis pulmonar inicial seguida de una manifestación sistémica secundaria.

Cabe destacar que en aquellos grupos con HLA-DR bajo, G3 y 4, el grado de fallo orgánico marcado por la MR-proADM se encuentra más elevado (G3: 10,9 nmol/l, G4: 1,3 nmol/l), lo que nos hace pensar en su relación con la fisiopatología del fallo orgánico en estos pacientes, tal como muestra su correlación negativa y estadísticamente significativa.

La linfopenia observada de forma general en los distintos inmunofenotipos puede ser debido a la migración celular desde la circulación al tracto respiratorio, por supresión de la hematopoyesis, o por muerte celular por necrosis o apoptosis. La apoptosis puede ser inducida por el huésped para eliminar los linfocitos infectados o mantener la homeostasis del sistema inmune, pero también puede formar parte de la interacción virus-linfocito mediante la estimulación inducida por citocinas, inducción viral del ligando Fas u otras interacciones célula-virus.<sup>222</sup>

De esta forma, la linfopenia puede ser reflejo de una respuesta inmune competente (grupos 1 y 2), o dependiendo del mecanismo, estadio celular del virus y de la especificidad de la población de linfocitos involucrada, representar un defecto en la respuesta inmune (grupo 3 y 4).

## 6.5. COMPARACIÓN DEL ESTADO DE DISFUNCIÓN INMUNE DE LOS PACIENTES CON NEUMONÍA POR GRIPE N1H1 Y SARS-COV-2

La respuesta inmune de los pacientes tanto con gripeA N1H1 como por SARS-CoV-2 juega un papel primordial tanto en la patogénesis de la enfermedad como como en la evolución clínica.<sup>224</sup>

Encontramos hallazgos similares de parámetros inmunes entre el grupo de pacientes con influenza A H1N1pdm ingresada en la UCI y los pacientes con SARS por Covid-19 ingresados así mismo en la UCI: descenso de los linfocitos CD4+ y CD8+; descenso de las células NK CD56+ y de la expresión de HLA DR CD14 de los monocitos.

También algunas diferencias: menor recuento de células linfocitos CD3+ CD4+ y CD8 +; niveles significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) de + CD19% (15,7% vs 9.8%) y de los niveles de IgM (160 vs 72 mgs / dl).

La activación de las células mieloides es fundamental para la defensa inmune frente a los patógenos infecciosos.<sup>225</sup> Estas células son la piedra angular de la inmunidad innata y contribuyen de forma esencial en la respuesta adaptativa.<sup>226</sup>

Los PMN aumentan en los pacientes más graves y pueden significar mala evolución clínica.<sup>227,228</sup> Los Monocitos, al igual que basófilos y eosinófilos, se han comunicado cifras y porcentajes inferior a la normalidad, sobre todo en los pacientes con mala evolución.<sup>229</sup> Las cifras de linfocitos son bajas en ambos grupos. En estudios realizados previamente las cifras de linfocitos es un indicador de gravedad de los pacientes con SARS-COV2 a expensas de la reducción tanto de los CD4+ como de los CD8+.<sup>230</sup> Aunque puede ser un biomarcador de gravedad también se han encontrado en pacientes menos graves. La linfopenia relativa de los casos menos graves son menos pronunciadas que en los más graves.<sup>231,232</sup> No solo se describen disminución de las cifras de linfocitos sino también disfunción y agotamiento de estos y de sus subpoblaciones con importante grado de apoptosis.<sup>233</sup>

Los niveles de citoquinas están aumentadas, sobre todo las inflamatorias (IL1, IL2, IL6, IL7, IL8 e IL10) así como factores estimulantes de colonias de granulocitos, macrófagos y monocitos. Sobre todo las IL6 e IL10 son las más representativas de la descrita como tormenta de citoquinas descontrolada en los pacientes graves con SARS Cov-2.<sup>234</sup>

Tanto en los pacientes con Covid-19 como en los pacientes con influenza A H1N1pdm existe una disfunción inmune que empeora con la gravedad de la enfermedad, con una marcada disfunción de los linfocitos T CD4+ y CD8+, NK CD56+ y monocitos manifestados por la baja expresión de HLA-DR CD14+. Al mismo tiempo, existe un importante estado proinflamatorio expresado por los altos niveles de IL6, PCR y ferritina.

## 6.6. LIMITACIONES

Este estudio tiene varias limitaciones, siendo la principal, el pequeño tamaño de la muestra . Sin embargo, el poder estadístico fue suficiente para probar la hipótesis inicial, es decir, la utilidad de los valores iniciales de MR proADM para predecir el ingreso y la mortalidad en cuidados intensivos. En cualquier caso, se debe evaluar un grupo de validación en el futuro. Por otro lado, las variables han sido determinadas sólo al ingreso, por lo que se requieren más estudios con la determinación evolutiva de los parámetros para conocer su comportamiento. Finalmente no se han registrado los pacientes vacunados por gripe y/ o otros microorganismos, factores que han podido reducir la severidad de la patología, y que pudieran actuar como un factor confusor en los resultados obtenidos.

La validez externa de los datos del estudio, realizado en cinco hospitales, debe ser testada. Si son validados, la determinación de MR-proADM puede ser un candidato para su incorporación en los protocolos en Urgencias para decidir el ingreso precoz en UCI.

Nuestros resultados pueden tener implicaciones para la práctica clínica y la investigación. Los niveles de MR-proADM pueden proporcionar una nueva vía rápida y directa para mejorar la precisión del pronóstico de los pacientes con neumonía por gripe. Esto es particularmente importante en pacientes que presentan únicamente insuficiencia orgánica respiratoria y en los que es difícil predecir la evolución clínica. Por otro lado, dado que la respuesta inmunitaria es crucial en la evolución de estos pacientes, determinar su estado inmune también permitirá no sólo estratificar la gravedad de los pacientes sino diseñar la estrategia de tratamiento más adecuada y así reducir la mortalidad en la UCI.

## 7. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha estudiado en tres aspectos la utilidad de los biomarcadores pronósticos en los pacientes con neumonía por influenza: a) la detección precoz de la gravedad del fallo orgánico pulmonar, b) la intensidad de la respuesta sistémica inflamatoria inducida por el germen de la influenza y c) la integridad de la función inmune del huésped.

### **Concluimos que:**

1. Los niveles iniciales plasmáticos de MR-proADM, PCR y PCT son efectivos para determinar el resultado desfavorable, el riesgo de ingreso en la UCI y la mortalidad en pacientes con neumonía por el virus de la influenza, siendo la MR-proADM la que presenta un mayor poder de predicción tanto de gravedad como de mortalidad
2. La alteración precoz de la inmunidad condiciona el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con neumonía por influenza. Tanto para la gravedad como para la mortalidad se observa un patrón de disfunción inmune con descenso de los linfocitos T +CD4 y T +CD8 y NK, descenso del número de monocitos y disminución de su expresión de HLA-DR. A la vez, se observa que el aumento de los linfocitos B +CD19 y el aumento de los niveles de IgM se relacionan con un mal pronóstico.
3. Los niveles de Ferritina al ingreso en la UCI nos ayudan a determinar la evolución desfavorable de los pacientes sépticos con neumonía debido a virus de la gripe A N1H1.
4. En los pacientes con gripe A H1N1 se muestra la dualidad hiperinflamación/disfunción inmune como el binomio que condiciona el daño pulmonar y predice el mal pronóstico: un estado de disfunción inmune expresado por la disminución de los linfocitos T, NK, y disminución y disfunción de los monocitos y sobre todo si se añade la hiperinflamación condiciona un aumento importante de la mortalidad.

5. En pacientes con SARS-CoV-2, existe una alteración patente en la inmunidad que empeora con la gravedad de la enfermedad, similar a lo que sucede en la neumonía grave por Influenza A N1H1. Los pacientes Covid-19 diferían de la influenza A N1H1 hospitalizada en un estado proinflamatorio más alto expresado por los altos niveles de IL6 y ferritina. Ambos componentes influyen en la gravedad y la pobre evolución de los pacientes.

## 8. PERSPECTIVAS DE FUTURO

La creación de un panel de biomarcadores que permita el diagnóstico y pronóstico precoz de la gravedad de los pacientes con sepsis y la optimización del tratamiento para reducir su morbi-mortalidad continúan siendo un objetivo importante en la investigación en la sepsis.

La Medicina Personalizada de Precisión (MPP) incluye estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento que permiten una mayor adaptación del tratamiento a las características individuales de cada paciente. La respuesta inmune en el paciente séptico se ha demostrado clave en el desarrollo de la enfermedad. El conocimiento profundo de estas alteraciones y de su variabilidad interpersonal abre un campo en el marco de la MPP que podría ayudar a mejorar la morbi-mortalidad. De esta forma, cada persona tiene un genotipo y una interacción específica ambiental que hará única su respuesta ante el agente infeccioso. Abordajes terapéuticos, como una re-programación de la respuesta inmune para reestablecer la homeostasis de los pacientes sépticos resulta un abordaje prometedor para la reducción de la morbi-mortalidad de estos pacientes.

El trabajo presentado presenta potenciales vías de investigación, y cambios en la práctica clínica habitual. El uso rutinario de la MR-proADM puede mejorar la estratificación en Urgencias de los pacientes con infección por influenza. La valoración precoz de lesión pulmonar con mal pronóstico mediante los niveles altos de MR- proADM puede representar un importante beneficio al ingresar de forma precoz a estos pacientes en la UCI o por lo menos no dar el alta y posteriormente producirse un nuevo ingreso en situación límite precisando intubación urgente incluso en la sala de Urgencias.

La inclusión del metabolismo del hierro supone un intento de dilucidar mecanismos en la fisiopatología del proceso inflamatorio de este virus de la gripe A N1H1 que junto con Covid-2 presentan un proceso híper inflamatorio excesivo y cuya magnitud se relaciona con la mala evolución. El conocimiento de estas y otras vías metabólicas, hormonales e inflamatorias dar



sentido en un futuro a tratamientos biológicos personalizados eficaces en estos pacientes.

Conocer el estado inmunitario, un estudio básico al alcance de los clínicos, nos puede orientar sobre el tipo de inmunodisfunción brindándonos la oportunidad de diseñar estrategias terapéuticas personalizadas para recuperar la homeostasis inmunitaria. Por ejemplo, la susceptibilidad a la sobreinfección asociada al estado de inmunosupresión al inicio o durante la evolución de la enfermedad séptica originada por los virus empeorará notablemente el pronóstico, con aumento de la mortalidad. En este caso se debe extremar las medidas de higiene, protección, aislamiento y monitorizar estrechamente la presencia de infecciones por bacterias, hongos u otros virus mediante biomarcadores, serología y cultivos, y suprimir las técnicas invasivas prescindibles.

Los pacientes sépticos en general y especialmente las infecciones por gripe A N1H1y por COVID-19 han presentado importantes desafíos para los laboratorios clínicos, desde el diagnóstico inicial hasta el seguimiento y el tratamiento del paciente. Muchos especialistas de laboratorio, técnicos y auxiliares están incansablemente al frente de la batalla contra estas enfermedades. Esto está sucediendo en los laboratorios de los hospitales españoles y en los laboratorios clínicos de todo el mundo.

Durante estas crisis, las determinaciones de laboratorio clínico son imprescindibles en la lucha global contra estas pandemias sin precedentes a través del diagnóstico rápido de infección viral, monitorización serológico de las poblaciones afectadas y bioquímico de pacientes hospitalizados más grave, siendo un impulsor clave de la prestación de atención médica al

proporcionar datos objetivos a los médicos y otros trabajadores de la salud para guiar la toma de decisiones clínicas adecuadas, proporcionando a los profesionales de la salud los datos basados en la evidencia necesarios para brindar una atención segura, eficaz y de alta calidad a los pacientes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Gripe (estacional) [Internet]. Who.int. 2019 [cited 21 May 2019]. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
2. Mamelund S. Geography May Explain Adult Mortality from the 1918–20 Influenza Pandemic. *Epidemics*. 2011;3(1):46-60
3. Chandra S, Christensen J. Re: “Reassessing the global mortality burden of the 1918 influenza pandemic”. *American Journal of Epidemiology*. 2019
4. Pandemia del H1N1 2009 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cited 11 May 2019]. Available from: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html>.
5. Rello J, Pop-Vicas A. Clinical review: Primary influenza viral pneumonia. *Critical Care*. 2009;13(6):235.
6. Pérez-Carrasco M, Lagunes L, Antón A, Gattarello S, Laborda C, Pumarola T et al. Influenza infection in the intensive care unit: Four years after the 2009 pandemic. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016;34(3):177-183.
7. Palese P, Schulman J. Mapping of the influenza virus genome: identification of the hemagglutinin and the neuraminidase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(6):2142-2146
8. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61(3).
9. Gripe (estacional) [Internet]. Who.int. 2019 [cited 21 May 2019]. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
10. McGeoch D, Fellner P, Newton C. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(9):3045-3049.
11. Zhang K, Shang G, Padavannil A, Wang J, Sakthivel R, Chen X et al. Structural–functional interactions of NS1-BP protein with the splicing and mRNA export machineries for viral and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(52):E12218-E12227.

12. Noah D, Twu K, Krug R. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 2003;307(2):386-395.
13. Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole B, Kaminski D, Park M, Yuen T et al. Influenza Virus Evades Innate and Adaptive Immunity via the NS1 Protein. *Journal of Virology*. 2006;80(13):6295-6304.
14. Rossman J, Jing X, Leser G, Balannik V, Pinto L, Lamb R. Influenza Virus M2 Ion Channel Protein Is Necessary for Filamentous Virion Formation. *Journal of Virology*. 2010;84(10):5078-5088.
15. Chen B, Leser G, Jackson D, Lamb R. The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding. *Journal of Virology*. 2008;82(20):10059-10070.
16. Chen W, Calvo P, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*. 2001;7(12):1306-1312.
17. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61(3).
18. Laver W, Valentine R. Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology*. 1969;38(1):105-119.
19. Wang X, Sun Q, Ye Z, Hua Y, Shao N, Du Y et al. Computational approach for predicting the conserved B-cell epitopes of hemagglutinin H7 subtype influenza virus. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016;12(4):2439-2446.
20. Skehel J. An overview of influenza haemagglutinin and neuraminidase. *Biologicals*. 2009;37(3):177-178.
21. Ito T. Interspecies Transmission and Receptor Recognition of Influenza A Viruses. *Microbiology and Immunology*. 2000;44(6):423-430.
22. Watzlawik J. Prion Protein Helix1 Promotes Aggregation but Is Not Converted into beta-Sheet. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(40):30242-30250.
23. Perez D, Donis R. Functional Analysis of PA Binding by Influenza A Virus PB1:

- Effects on Polymerase Activity and Viral Infectivity. *Journal of Virology*. 2001;75(17):8127-8136.
24. Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*. 2002;83(4):723-734.
  25. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochimica Polonica*. 2014;61(3).
  26. O'Neill R, Palese P. NPI-1, the human homolog of SRP-1, Interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*. 1995;206(1):116-125.
  27. Katze M, Krug R. Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1984;4(10):2198-2206.
  28. O'Neill R. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal*. 1998;17(1):288-296.
  29. Weis W, Brown J, Cusack S, Paulson J, Skehel J, Wiley D. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*. 1988;333(6172):426-431.
  30. Ma W, García-Sastre A, Schwemmler M. Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. *PLOS Pathogens*. 2015;11(6):e1004819
  31. Juozapaitis M, Aguiar Moreira É, Mena I, Giese S, Riegger D, Pohlmann A et al. An infectious bat-derived chimeric influenza virus harbouring the entry machinery of an influenza A virus. *Nature Communications*. 2014;5(1).
  32. [Internet]. Seimc.org. 2019 [cited 23 May 2019]. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia29.pdf>
  33. WHO | World now at the start of 2009 influenza pandemic [Internet]. Who.int. 2019 [cited 23 May 2019]. Available from: [https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/](https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/)

34. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler E, Sun H et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(20):1945-1952.
35. Valenzuela Mendez B, Rodriguez Gutierrez J, Ortiz Leyba C, Valenzuela Sanchez F. Fisiopatología de la Sepsis. En: Valenzuela Sanchez F, editor. *Sepsis grave y disfunción orgánica*. 1st ed. Jerez de la Frontera: RESYS; 2010. P 37-49.
36. Wurfel M. Genetic Insights into Sepsis: What have we Learned and How will it Help?. *Current Pharmaceutical Design*. 2008;14(19):1900-1911.
37. Sanders C, Doherty P, Thomas P. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell and Tissue Research*. 2010;343(1):13-21.
38. Hiscott J, Lin R, Nakhaei P, Paz S. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends in Molecular Medicine*. 2006;12(2):53-56.
39. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820.
40. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers A, Zillinger T, Goldeck M et al. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*. 2014;514(7522):372-375.
41. Schneider W, Chevillotte M, Rice C. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*. 2014;32(1):513-545.
42. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V et al. Lambda Interferon Renders Epithelial Cells of the Respiratory and Gastrointestinal Tracts Resistant to Viral Infections. *Journal of Virology*. 2010;84(11):5670-5677.
43. Maines T, Szretter K, Perrone L, Belser J, Bright R, Zeng H et al. Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunological Reviews*. 2008;225(1):68-84.
44. Ichinohe T, Pang I, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature Immunology*. 2010;11(5):404-410.
45. Chen X, Liu S, Goraya M, Maarouf M, Huang S, Chen J. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.

46. Arnon T, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *European Journal of Immunology*. 2001;31(9):2680-2689.
47. Bar-On Y, Seidel E, Tsukerman P, Mandelboim M, Mandelboim O. Influenza Virus Uses Its Neuraminidase Protein to Evade the Recognition of Two Activating NK Cell Receptors. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;210(3):410-418.
48. Crowe N, Uldrich A, Kyparissoudis K, Hammond K, Hayakawa Y, Sidobre S et al. Glycolipid Antigen Drives Rapid Expansion and Sustained Cytokine Production by NK T Cells. *The Journal of Immunology*. 2003;171(8):4020-4027.
49. Waithman J, Mintern J. Dendritic cells and influenza A virus infection. *Virulence*. 2012;3(7):603-608.
50. Shiratsuchi A, Kaido M, Takizawa T, Nakanishi Y. Phosphatidylserine-Mediated Phagocytosis of Influenza A Virus-Infected Cells by Mouse Peritoneal Macrophages. *Journal of Virology*. 2000;74(19):9240-9244.
51. Heer A, Harris N, Kopf M, Marsland B. CD4+ and CD8+ T Cells Exhibit Differential Requirements for CCR7-Mediated Antigen Transport during Influenza Infection. *The Journal of Immunology*. 2008;181(10):6984-6994.
52. Chen B, Leser G, Jackson D, Lamb R. The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding. *Journal of Virology*. 2008;82(20):10059-10070.
53. Bedoui S, Gebhardt T, Gasteiger G, Kastenmüller W. Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. *Nature Immunology*. 2016;17(5):490-494.
54. Nüssing S, Sant S, Koutsakos M, Subbarao K, Nguyen T, Kedzierska K. Innate and adaptive T cells in influenza disease. *Frontiers of Medicine*. 2018;12(1):34-47.
55. Kreijtz J, Fouchier R, Rimmelzwaan G. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Research*. 2011;162(1-2):19-30.
56. Zhu J, Yamane H, Paul W. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*. 2010;28(1):445-489.
57. Soghoian D, Streeck H. Cytolytic CD4+T cells in viral immunity. *Expert Review of Vaccines*. 2010;9(12):1453-1463.

58. Rudensky A. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews*. 2011;241(1):260-268.
59. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y et al. Protection Against Influenza Virus Infection in Polymeric Ig Receptor Knockout Mice Immunized Intranasally with Adjuvant-Combined Vaccines. *The Journal of Immunology*. 2002;168(6):2930-2938.
60. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nature Reviews Immunology*. 2019;19(6):383-397.
61. Van Kerkhove M, Hirve S, Koukounari A, Mounts A. Estimating age-specific cumulative incidence for the 2009 influenza pandemic: a meta-analysis of A(H1N1)pdm09 serological studies from 19 countries. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2013;7(5):872-886.
62. Gisbergen K, Klarenbeek P, Kragten N, Unger P, Nieuwenhuis M, Wensveen F et al. The Costimulatory Molecule CD27 Maintains Clonally Diverse CD8+ T Cell Responses of Low Antigen Affinity to Protect against Viral Variants. *Immunity*. 2011;35(1):97-108.
63. Grant E, Quiñones-Parra S, Clemens E, Kedzierska K. Human influenza viruses and CD8 + T cell responses. *Current Opinion in Virology*. 2016;16:132-142.
64. Sridhar S. Heterosubtypic T-Cell Immunity to Influenza in Humans: Challenges for Universal T-Cell Influenza Vaccines. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
65. Wagar L, Rosella L, Crowcroft N, Lowcock B, Drohomyrecky P, Foisy J et al. Humoral and Cell-Mediated Immunity to Pandemic H1N1 Influenza in a Canadian Cohort One Year Post-Pandemic: Implications for Vaccination. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e28063.
66. Rello J. Theranostics in severe influenza. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2017;5(2):91-92.
67. Lin G, McGinley J, Drysdale S, Pollard A. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
68. Kalil A, Thomas P. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical Care*. 2019;23(1).

69. Li S, Fu B, Meshram C. Innate Immune and Inflammatory Responses to Respiratory Viruses. *Mediators of Inflammation*. 2019;2019:1-2.
70. Liu Q, Zhou Y, Yang Z. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 2015;13(1):3-10.
71. Killip M, Fodor E, Randall R. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Research*. 2015;209:11-22.
72. Tracey KJ, Beutler B, Lowery SF. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470.
73. McConnell K, Coopersmith C. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside. *La Presse Médicale*. 2016;45(4):e93-e98.
74. Cavaillon J, Adib-conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine Cascade in Sepsis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2003;35(9):535-544.
75. Kuriakose T, Man S, Subbarao Malireddi R, Karki R, Kesavardhana S, Place D et al. ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways. *Science Immunology*. 2016;1(2):aag2045-aag2045.
76. Luft T, Jefford M, Luetjens P, Hochrein H, Masterman K, Maliszewski C et al. IL-1 $\beta$  Enhances CD40 Ligand-Mediated Cytokine Secretion by Human Dendritic Cells (DC): A Mechanism for T Cell-Independent DC Activation. *The Journal of Immunology*. 2002;168(2):713-722.
77. Guo X, Thomas P. New fronts emerge in the influenza cytokine storm. *Seminars in Immunopathology*. 2017;39(5):541-550.
78. Kawada J, Kitagawa Y, Iwata N, Ito Y. Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab. *Modern Rheumatology*. 2013;23(5):972-976.
79. Ma W, Yao X, Peng Q, Chen D. The protective and pathogenic roles of IL-17 in viral infections: friend or foe?. *Open Biology*. 2019;9(7):190109.
80. A. Bao J, Cui D, Wang X, Zou Q, Zhao D, Zheng S et al. Decreased Frequencies of Th17 and Tc17 Cells in Patients Infected with Avian Influenza A (H7N9) Virus. *Journal of Immunology Research*. 2019;2019:1-11.



81. Wang X, Chan C, Yang M, Deng J, Poon V, Leung V et al. A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011;8(6):462-468.;
82. Wang X, Ma K, Chen M, Ko K, Zheng B, Lu L. IL-17A Promotes Pulmonary B-1a Cell Differentiation via Induction of Blimp-1 Expression during Influenza Virus Infection. *PLOS Pathogens*. 2016;12(1):e1005367
83. Li C, Yang P, Sun Y, Li T, Wang C, Wang Z et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. *Cell Research*. 2011;22(3):528-538.
84. Li J, Zhang Y, Lou J, Zhu J, He M, Deng X et al. Neutralisation of Peritoneal IL-17A Markedly Improves the Prognosis of Severe Septic Mice by Decreasing Neutrophil Infiltration and Proinflammatory Cytokines. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e46506.
85. Tam V. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. *Seminars in Immunology*. 2013;25(3):240-248.
86. Hermans P, Hazelzet J. Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene Polymorphism and Sepsis. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;41(Supplement\_7):S453-S458.
87. Kangelaris K, Prakash A, Liu K, Aouizerat B, Woodruff P, Erle D et al. Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;308(11):L1102-L1113.
88. Huang X, Venet F, Wang Y, Lepape A, Yuan Z, Chen Y et al. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(15):6303-6308.
89. Belikoff B, Hatfield S, Georgiev P, Ohta A, Lukashev D, Buras J et al. A2B Adenosine Receptor Blockade Enhances Macrophage-Mediated Bacterial Phagocytosis and Improves Polymicrobial Sepsis Survival in Mice. *The Journal of Immunology*. 2011;186(4):2444-2453.

90. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Medicine*. 2010;36(11):1859-1866.
91. Bermejo-Martin J, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Critical Care*. 2009;13(6):R201.
92. Pruitt JH, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock* 1995;3:235.
93. Barriere SL, Lowry SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 1995;23:376.
94. Li J et al. Alterations of T helper lymphocyte subpopulations in sepsis, severe sepsis, and septic shock: a prospective observational study. *Inflammation* 2015;38:995–1002.
95. Ferguson NR, Galley HF, Webster NR. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1999;25:106–9.
96. Delano M, Ward P. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunological Reviews*. 2016;274(1):330-353.
97. Rynda-Apple A, Robinson KM, Alcorn J (2015) Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease. *Infect Immun* 83:3764–3770.
98. Klein E, Monteforte B, Gupta A, Jiang W, May L, Hsieh Y et al. The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2016;10(5):394-403.
99. Joseph C, Togawa Y, Shindo N. Bacterial and viral infections associated with influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2013;7:105-113.
100. Sencio V, Barthelemy A, Tavares L, Machado M, Soulard D, Cuiat C et al. Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Reports*. 2020;30(9):2934-2947.e6.

101. Barrera A, García T, Tapia K, Medina R. Factores virales e inmunológicos del hospedero que afectan la gravedad de la infección por virus de influenza. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. 2016; 187:13-19.
102. Vieira A, Michels M, Florentino D, Nascimento D, Rezin G, Leffa D et al. Obesity Promotes Oxidative Stress and Exacerbates Sepsis-induced Brain Damage. *Current Neurovascular Research*. 2015;12(2):147-154
103. Wang S, Liu X, Chen Q, Liu C, Huang C, Fang X. The role of increased body mass index in outcomes of sepsis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Anesthesiology*. 2017;17(1).
104. Valenzuela Mendez B, Valenzuela Sanchez F, Rello J. Pregnancy and influenza respiratory infection. Implications of immunological alterations, clinical repercussion and current basis of management and prevention. *Ann Virol Res* 2016;2(3):1019.
105. Hui, D.S., Lee, N., Chan, P.K., 2013. Adjunctive therapies and immunomodulatory agents in the management of severe influenza. *Antivir. Res.* 98, 410–416.
106. Guo, X.J., Thomas, P.G., 2017. New fronts emerge in the influenza cytokine storm. *Semin. Immunopathol.* 39, 541–550.
107. Rodrigo C, Leonardi-Bee J, Nguyen-Van-Tam J, Lim W. Corticosteroids as adjunctive therapy in the treatment of influenza. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;.
108. Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, Teng Z et al. Intensive Cytokine induction in Pandemic H1N1 Influenza Virus Infection Accompanied by Robust Production of IL-10 and IL-6. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28680.
109. Muñoz M, Villar I, García-Erce J. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(37):4617.
110. Beard J. Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(2):568S-580S.
111. Sucak G, Yegin Z, Özkurt Z, Akı Ş, Yağcı M. Iron Overload: Predictor of Adverse Outcome in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2010;42(5):1841-1848.
112. Gangaidzo I, Moyo V, Mvundura E, Aggrey G, Murphree N, Khumalo H et al. Association of Pulmonary Tuberculosis with Increased Dietary Iron. *The Journal of*

- Infectious Diseases. 2001;184(7):936-939.
113. Grady R, Akbar A, Giardina P, Hilgartner M, Sousa M. Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassaemia major: the relative contributions of transfusion and splenectomy. *British Journal of Haematology*. 1985;59(4):713-724.
  114. Upshaw J, Callihan T. Absolute CD4 and CD8 Counts and CD4-to-CD8 Ratios in Eight Patients with Indolent B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Southern Medical Journal*. 2004;97(3):236-239.
  115. Walsh T, Lee R, Maciver C, Garrioch M, MacKirby F, Binning A et al. Anemia during and at discharge from intensive care: the impact of restrictive blood transfusion practice. *Intensive Care Medicine*. 2005;32(1):100-109.
  116. Drysdale J, Arosio P, Invernizzi R, Cazzola M, Volz A, Corsi B et al. Mitochondrial Ferritin: A New Player in Iron Metabolism. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2002;29(3):376-383.
  117. Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*. 2017;69(6):414-422.
  118. Orino K, Watanabe K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *The Veterinary Journal*. 2008;178(2):191-201.
  119. Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(4):457-463.
  120. Kwak E, Larochelle D, Beaumont C, Torti S, Torti F. Role for NF- $\kappa$ B in the Regulation of Ferritin H by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(25):15285-15293.
  121. Miller L, Miller S, Torti S, Tsuji Y, Torti F. Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(11):4946-4950.
  122. Lissoni P, Ardizzoia A, Barni S, Tancini G, Muttini M. Immunotherapy with subcutaneous low dose interleukin-2 plus melatonin as salvage therapy of heavily chemotherapy-pretreated ovarian cancer. *Oncology Reports*. 1996;.
  123. Recalcati S, Invernizzi P, Arosio P, Cairo G. New functions for an iron storage protein: The role of ferritin in immunity and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*.

2008;30(1-2):84-89.

124. Broxmeyer H, Cooper S, Levi S, Arosio P. Mutated recombinant human heavy-chain ferritins and myelosuppression in vitro and in vivo: a link between ferritin ferroxidase activity and biological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(3):770-774.
125. Li R, Luo C, Mines M, Zhang J, Fan G. Chemokine CXCL12 Induces Binding of Ferritin Heavy Chain to the Chemokine Receptor CXCR4, Alters CXCR4 Signaling, and Induces Phosphorylation and Nuclear Translocation of Ferritin Heavy Chain. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(49):37616-37627.
126. Parthasarathy N, Torti, S, Torti, F. Ferritin binds to light chain of human H-kininogen and inhibits kallikrein-mediated bradykinin release. *Biochemical Journal*. 2002;365(1):279-286.
127. Jacobs A, Worwood M. Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N Engl J Med* 1975;292:951–956.
128. Wang W, Knovich M, Coffman L, Torti F, Torti S. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(8):760–769.
129. Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J Cell Biochem* 2008;103:1211–1218.
130. Kim M, Rho Y, Jin K, Ahn B, Jung S, Kim H et al. pH-Dependent Structures of Ferritin and Apoferritin in Solution: Disassembly and Reassembly. *Biomacromolecules*. 2011;12(5):1629-1640.
131. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Ferritin in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2007;6(7):457-463.
132. Ganz T, Nemeth E. Iron Sequestration and Anemia of Inflammation. *Seminars in Hematology*. 2009;46(4):387-393.
133. Hintze K, Theil E. Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006;63(5):591-600./Weinberg E, Miklossy J. Iron Withholding: A Defense Against Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008;13(4):451-463.
134. Ruddell RG, Hoang-Le D, Barwood JM, Rutherford PS, Piva TJ, Watters DJ,

- Santambrogio P, Arosio P, Ramm GA. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2009;49:887–900.
- 135.** McClain KL, Eckstein O. Clinical features and diagnosis of hemophagocytic [Internet]. Waltham, UpToDate; 2019 [Consultado el 19 de noviembre de 2019] Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/clinicalfeaturesanddiagnosisof-hemophagocytic>.
- 136.** Wang W, Knovich M, Coffman L, Torti F, Torti S. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(8):760–769.
- 137.** Harms P, Schmidt L, Smith L, Newton D, Pletneva M, Walters L et al. Autopsy Findings in Eight Patients With Fatal H1N1 Influenza. *American Journal of Clinical Pathology*. 2010;134(1):27-35.
- 138.** Lachmann G, Knaak C, Vorderwülbecke G, La Rosée P, Balzer F, Schenk T et al. Hyperferritinemia in Critically Ill Patients. *Critical Care Medicine*. 2019;:1.
- 139.** Lachmann G, Spies C, Schenk T, Brunkhorst F, Balzer F, La Rosée P. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Potentially underdiagnosed in intensive care units. *SHOCK*. 2018;50(2):149-155.
- 140.** Elsayed M, Sharif M, Stack A. Transferrin Saturation. *Advances in Clinical Chemistry*. 2016;:71-97.
- 141.** A. Manejo del déficit de hierro en distintas situaciones clínicas. Papel del hierro intravenoso [Internet]. *Sehh.es*. 2019 [cited 15 June 2019]. Available from: [https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2019/01/08/manejo\\_deficit\\_hierro.pdf](https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2019/01/08/manejo_deficit_hierro.pdf)
- 142.** Sherwood R, Bomford A. Assessment of hepatic function and investigation of jaundice. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 2014;:231-249.
- 143.** Piagnerelli M, Boudjeltia K, Nuyens V, De Backer D, Su F, Wang Z, Vincent J, Vanhaeverbeek M. Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock*. 2005;: 24(1):48-52.
- 144.** Bjarnason A, Thorleifsdottir G, Löve A, Gudnason J, Asgeirsson H, Hallgrímsson K et al. Severity of Influenza A 2009 (H1N1) Pneumonia Is Underestimated by Routine

Prediction Rules. Results from a Prospective, Population-Based Study. PLoS ONE. 2012;7(10):e46816.

145. Rather A, Kasana B. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JMS SKIMS. 2015;18(2):162-164.
146. Minne L, Abu-Hanna A, de Jonge E: Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review. Crit Care 2008; 12:R161, 2008.
147. Estella A, F. Valenzuela F, Fernández L, et al: Usefulness of quick sepsis-related organ failure assessment to predict severity in influenza A H1N1v pneumonia patients [abstract]. Intensive Care Medicine Experimental 2017, 5(Suppl 2):0769
148. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2001; 69(3): 89–95.
149. Méndez R, Aldás I, Menéndez R. Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia (Cardiac and Non-Cardiac). Journal of Clinical Medicine. 2020;9(2):549.
150. Ingram P, Inglis T, Moxon D, Speers D. Procalcitonin and C-reactive protein in severe 2009 H1N1 influenza infection. Intensive Care Medicine. 2010;36(3):528-532.
151. Vasileva D, Badawi A. C-reactive protein as a biomarker of severe H1N1 influenza. Inflammation Research. 2018;68(1):39-46.
152. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun 1993;192:553-60.
153. Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin and PAMP: discovery, structures, and cardiovascular functions. Microsc Res Tech 2002;57:3-13
154. Meeran K, O'Shea D, Upton PD, et al. Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:95-100.
155. Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, et al. Identification of an adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. Peptides 2004;25:1369-72.
156. Nishio K, Akai Y, Murao Y, et al. Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. Crit Care Med

1997;25:953-7.

157. Herrero Puente P, Fernández García D, Gil Román JJ, et al. Estudio piloto de la utilidad de la región medial de la proadrenomedulina (RM-proADM) en la valoración de la disnea de origen respiratorio en urgencias. *Emergencias* 2012;24:357-65.
158. Fábrega E, Casafont F, Crespo J, et al. Plasma adrenomedullin levels in patients with hepatic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1901-4.
159. Guevara M, Ginès P, Jiménez W, et al. Increased adrenomedullin levels in cirrhosis: relationship with hemodynamic abnormalities and vasoconstrictor systems. *Gastroenterology* 1998;114:336-43.
160. Kojima H, Tsujimoto T, Uemura M, et al. Significance of increased plasma adrenomedullin concentration in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1998;28:840-6.
161. Pousset F, Masson F, Chavirovskaia O, et al. Plasma adrenomedullin, a new independent predictor of prognosis in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2000;21:1009-14.
162. Turker Y, Aslantas Y, Turker Y, et al. A novel indicator for assessment of mitral regurgitation severity: Pro-adrenomedullin. *Int J Cardiol* 2013;168:2998-3000.
163. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 2005;51:1823-9.
164. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Plasma pro-adrenomedullin but not plasma pro-endothelin predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest* 2008;134:263-72.
165. Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).
166. Schuetz P, Hausfater P, Amin D, Amin A, Haubitz S, Faessler L et al. Biomarkers from distinct biological pathways improve early risk stratification in medical emergency patients: the multinational, prospective, observational TRIAGE study. *Critical Care*. 2015;19(1).



167. Eckart A, Hauser S, Kutz A, Haubitz S, Hausfater P, Amin D et al. Combination of the National Early Warning Score (NEWS) and inflammatory biomarkers for early risk stratification in emergency department patients: results of a multinational, observational study. *BMJ Open*. 2019;9(1):e024636.
168. Viasus D, Del Rio-Pertuz G, Simonetti A, Garcia-Vidal C, Acosta-Reyes J, Garavito A et al. Biomarkers for predicting short-term mortality in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2016;72(3):273-282.
169. Valenzuela Sanchez F, Valenzuela Méndez B, Rodríguez Gutierrez JF, et al. Initial levels of mr-proadrenomedullin: a predictor of severity in patients with influenza a virus pneumonia. *Intensive Care Med Exp* 2015;3:A832.
170. Valero Cifuentes S, García Villalba E, Alcaraz García A, Alcaraz García MJ, Muñoz Pérez Á, Piñera Salmerón P, Bernal Morell E. Prognostic value of pro-adrenomedullin and NT-proBNP in patients referred from the emergency department with influenza syndrome. *Emergencias*. 2019 Jun;31(3):180-184.
171. Branco R, Garcia P. Ferritin and C-Reactive Protein as Markers of Systemic Inflammation in Sepsis\*. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2017;18(2):194-196.
172. de Wit J, Borghans J, Kesmir C, van Baarle D. Editorial: Role of HLA and KIR in Viral Infections. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
173. Levy M, Fink M, Marshall J, Abraham E, Angus D, Cook D et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine*. 2003;29(4):530-538.
174. Pérez-Carrasco M, Lagunes L, Antón A, et al; CRIPS investigators (2016) Influenza infection in the intensive care unit: Four years after the 2009 pandemic. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34(3):177-83
175. Satterwhite L, Mehta A, Martin GS (2010) Novel findings from the second wave of adult pH1N1 in the United States. *Crit Care Med* 38(10):2059-61
176. Fox A, Hoa L, Horby P, van Doorn H, Trung N, Ha N et al. Severe Pandemic H1N1 2009 Infection Is Associated with Transient NK and T Deficiency and Aberrant CD8 Responses. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31535.

177. Klein S, Hodgson A, Robinson D. Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;92(1):67-73.
178. Honce R, Schultz-Cherry S. Impact of Obesity on Influenza A Virus Pathogenesis, Immune Response, and Evolution. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
179. Díaz E, Rodríguez A, Martín-Loeches I, Lorente L, del Mar Martín M, Pozo J et al. Impact of Obesity in Patients Infected With 2009 Influenza A(H1N1). *Chest*. 2011;139(2):382-386.
180. Braun N, Hoess C, Kutz A, Christ-Crain M, Thomann R, Henzen C et al. Obesity paradox in patients with community-acquired pneumonia: Is inflammation the missing link?. *Nutrition*. 2017;33:304-310.
181. Álvarez-Lerma F, Marín-Corral J, Vilà C, Masclans J, Loeches I, Barbadillo S et al. Characteristics of patients with hospital-acquired influenza A (H1N1)pdm09 virus admitted to the intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*. 2017;95(2):200-206.
182. Garnacho-Montero J, León-Moya C, Gutiérrez-Pizarraya A, Arenzana-Seisdedos A, Vidaur L, Guerrero J et al. Clinical characteristics, evolution, and treatment-related risk factors for mortality among immunosuppressed patients with influenza A (H1N1) virus admitted to the intensive care unit. *Journal of Critical Care*. 2018;48:172-177.
183. Bello S, Lasierra A, Mincholé E, Fandos S, Ruiz M, Vera E et al. Prognostic power of proadrenomedullin in community-acquired pneumonia is independent of aetiology. *European Respiratory Journal*. 2011;39(5):1144-1155.
184. Klein E, Monteforte B, Gupta A, Jiang W, May L, Hsieh Y et al. The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2016;10(5):394-403. *and Other Respiratory Viruses*. 2013;7:105-113.
185. [Internet]. Isciii.es. 2020 [cited 21 October 2020]. Available from: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/Informes%20de%20situación/201314/Gravedad%20de%20la%20epidemia%20de%20GRIPE.%20Temporadas%202013-2014\\_CNE\\_15enero2014.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/Informes%20de%20situación/201314/Gravedad%20de%20la%20epidemia%20de%20GRIPE.%20Temporadas%202013-2014_CNE_15enero2014.pdf)
186. Jia L, Xie J, Zhao J, Cao D, Liang Y, Hou X et al. Mechanisms of Severe Mortality-

Associated Bacterial Co-infections Following Influenza Virus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7.

187. Reina J, López C, Morales C, Busquets M. Análisis de las coinfecciones detectadas entre los virus gripales A y B y otros virus respiratorios, 2012-2013. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014;32(10):693-695.
188. Thomas J, Pociute A, Kevalas R, Malinauskas M, Jankauskaite L. Blood biomarkers differentiating viral versus bacterial pneumonia aetiology: a literature review. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020;46(1).
189. Bello S, Lasierra A, Mincholé E, Fandos S, Ruiz M, Vera E et al. Prognostic power of proadrenomedullin in community-acquired pneumonia is independent of aetiology. *European Respiratory Journal*. 2011;39(5):1144-1155.
190. Andaluz-Ojeda D, Cicuéndez R, Calvo D, Largo E, Nogales L, Muñoz M et al. Sustained value of proadrenomedullin as mortality predictor in severe sepsis. *Journal of Infection*. 2015;71(1):136-139.
191. Valero Cifuentes S, García Villalba E, Alcaraz García A, Alcaraz García MJ, Muñoz Pérez Á, Piñera Salmerón P, Bernal Morell E. Prognostic value of pro-adrenomedullin and NT-proBNP in patients referred from the emergency department with influenza syndrome. *Emergencias*. 2019 Jun;31(3):180-184.
192. Wang S, Le T, Kurihara N, Chida J, Cisse Y, Yano M et al. Influenza Virus–Cytokine–Protease Cycle in the Pathogenesis of Vascular Hyperpermeability in Severe Influenza. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(7):991-1001.
193. Zúñiga J, Torres M, Romo J, Torres D, Jiménez L, Ramírez G et al. Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City. *Autoimmunity*. 2011;44(7):562-570.
194. Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).
195. Darveau M, Denault AY, Blais N, Notebaert E. Bench-to-bedside review: iron metabolism in critically ill patients. *Critical Care*. 2004;8(5):356–362).

196. Kalil A, Thomas P. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical Care*. 2019;23(1).
197. Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.
198. Bobbio-Pallavicini F, Verde G, Spriano P, Losi R, Bosatra M, Braschi A et al. Body iron status in critically ill patients: significance of serum ferritin. *Intensive Care Medicine*. 1989;15(3):171-178.
199. Garcia P, Longhi F, Branco R, Piva J, Lacks D, Tasker R. Ferritin levels in children with severe sepsis and septic shock. *Acta Paediatrica*. 2007;96(12):1829-1831.
200. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway (7a. ed.)*. 7th ed. Distrito Federal: McGraw-Hill Interamericana; 2008.
201. Dale D, Boxer L, Liles W. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-945.
202. Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, Almansa R, Rico L, Gandía F et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Critical Care*. 2011;15(5):R243.
203. Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez A et al. Immune Cell Phenotype and Function in Sepsis. *SHOCK*. 2016;45(3):282-291.
204. Duggal N, Snelson C, Shaheen U, Pearce V, Lord J. Innate and adaptive immune dysregulation in critically ill ICU patients. *Scientific Reports*. 2018;8(1)
205. Hotchkiss R, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(12):862-874.
206. Holub M, Klučková Z, Helcl M, Přihodov J, Rokyta R, Beran O. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9(3):202-211.
207. Lalueza A, Folgueira D, Díaz-Pedroche C, Hernández-Jiménez P, Ayuso B, Castillo C et al. Severe lymphopenia in hospitalized patients with influenza virus infection as a marker of a poor outcome. *Infectious Diseases*. 2019;51(7):543-546.
208. Agrati C, Gioia C, Lalle E, Cimini E, Castilletti C, Armignacco O et al. Association of

- Profoundly Impaired Immune Competence in H1N1v-Infected Patients with a Severe or Fatal Clinical Course. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(5):681-689.
- 209.** Fox A, Hoa L, Horby P, van Doorn H, Trung N, Ha N et al. Severe Pandemic H1N1 2009 Infection Is Associated with Transient NK and T Deficiency and Aberrant CD8 Responses. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31535.
- 210.** Agrati C, Gioia C, Lalle E, Cimini E, Castilletti C, Armignacco O et al. Association of Profoundly Impaired Immune Competence in H1N1v-Infected Patients with a Severe or Fatal Clinical Course. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(5):681-689.
- 211.** Fox A, Hoa L, Horby P, van Doorn H, Trung N, Ha N et al. Severe Pandemic H1N1 2009 Infection Is Associated with Transient NK and T Deficiency and Aberrant CD8 Responses. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31535.
- 212.** Demaret J, Walencik A, Jacob M, Timsit J, Venet F, Lepape A et al. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2012;84B(1):59-62.
- 213.** Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis prognosis and prediction of sepsis. *Frontiers in Bioscience*. 2017;22(8):1344-1354.
- 214.** Lukaszewicz A, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: Interest for prognosis and secondary infection prediction \*. *Critical Care Medicine*. 2009;37(10):2746-2752.
- 215.** Diao H, Cui G, Wei Y, Chen J, Zuo J, Cao H et al. Severe H7N9 Infection Is Associated with Decreased Antigen-Presenting Capacity of CD14+ Cells. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e92823.
- 216.** [Internet]. Sagg.org.ar. 2020 [cited 22 September 2020]. Available from: <http://www.sagg.org.ar/wp/wp-content/uploads/2016/07/Inmunosenescencia.pdf>
- 217.** Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, Teng Z et al. Intensive Cytokine induction in Pandemic H1N1 Influenza Virus Infection Accompanied by Robust Production of IL-10 and IL-6. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28680.
- 218.** Fumeaux T, Pugin J. Role of Interleukin-10 in the Intracellular Sequestration of Human Leukocyte Antigen-DR in Monocytes during Septic Shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;166(11):1475-1482.

219. Al-Samkari H, Berliner N. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2018;13(1):27-49
220. Ammann S, Lehmborg K, zur Stadt U, Janka G, Rensing-Ehl A, Klemann C et al. Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis have different patterns of T-cell activation, differentiation and repertoire. *European Journal of Immunology*. 2017;47(2):364-373
221. Beutel G, Wiesner O, Eder M, Hafer C, Schneider A, Kielstein J et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome as a major contributor to death in patients with 2009 influenza A (H1N1) infection. *Critical Care*. 2011;15(2):R80.
222. Nichols J, Niles J, Roberts N. Human Lymphocyte Apoptosis after Exposure to Influenza A Virus. *Journal of Virology*. 2001;75(13):5921-5929.
223. Zuñiga E, Costa Rodríguez E, Montes C, Gruppi A. Apoptosis de linfocitos asociada a enfermedades infecciosas [Internet]. *Medicinabuenosaires.com*. 2020 [cited 18 July 2020]. Available from: <https://www.medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol62-02/2/apoptosis.htm>
224. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1).
225. Mantovani A, Netea M. Trained Innate Immunity, Epigenetics, and Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(11):1078-1080.
226. de Laval B, Maurizio J, Kandalla PK, et al. C/EBP $\beta$ -dependent epigenetic memory induces trained immunity in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2020; 26: 793.
227. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Qiu Y et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7.
228. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2020;58(7):1131-1134.
229. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(15):762-768.

- 230.** Liu Y, Sun W, Chen L, Wang Y, Zhang L, Yu L. Clinical Characteristics and Progression of 2019 Novel Coronavirus-Infected Patients Concurrent Acute Respiratory Distress Syndrome. 2020;
- 231.** Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*. 2020;160(3):261-268.
- 232.** Wan S, Yi Q, Fan S, Lv J, Zhang X, Guo L et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). 2020;
- 233.** Cancarevic I, Tathineni P, Malik B. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Cancer Patients. *Cureus*. 2020;
- 234.** Yang L, Gou J, Gao J, Huang L, Zhu Z, Lan C et al. Immune Characteristics Predict Outcome of Severe and Critical COVID-19 Patients. *SSRN Electronic Journal*. 2020;
- 235.** Almansa R, Socias L, Ramirez P, Martin-Loeches I, Vallés J, Loza A et al. Imbalanced pro- and anti-Th17 responses (IL-17/granulocyte colony-stimulating factor) predict fatal outcome in 2009 pandemic influenza. *Critical Care*. 2011;15(5):448.
- 236.** Venet F, Rimmelé T, Monneret G. Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Crit Care Clin*. 2018 Jan;34(1):97-106.
- 237.** Díaz E, Martín-Loeches I, Vallés J. Neumonía nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31(10):692-698.
- 238.** Fagon J, Chastre J, Rouby J. Is bronchoalveolar lavage with quantitative cultures a useful tool for diagnosing ventilator-associated pneumonia?. *Critical Care*. 2007;11(2):123. Miller P, Meredith J, Chang M.
- 239.** Optimal Threshold for Diagnosis of Ventilator-Associated Pneumonia Using Bronchoalveolar Lavage. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2003;55(2):263-268.
- 240.** Bodi M, Ardanuy C, Olona M, Castander D, Diaz E, Rello J. Therapy of ventilator-associated pneumonia: the Tarragona Strategy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001;7(1):32-33.
- 241.** Kim J. Epidemiology of Respiratory Viral Infection Using Multiplex RT-PCR in

- Cheonan, Korea (2006-2010). *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013;23(2):267-273.
- 242.** Gilbert J. Advancing towards precision medicine in ARDS. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2018;6(7):494-495.
- 243.** Calfee C, Delucchi K, Sinha P, Matthay M, Hackett J, Shankar-Hari M, et al. Acute respiratory distress syndrome subphenotypes and differential response to simvastatin: secondary analysis of a randomised controlled trial. *Lancet Respiratory Medicine*. 2018;6(9):691–8.
- 244.** Famous K, Delucchi K, Ware L, Kangelaris K, Liu K, Thompson B et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2017;195(3):331-338.
- 245.** Calfee C, Delucchi K, Parsons P, Thompson B, Ware L, Matthay M. Latent Class Models Identify Two Subphenotypes in Respiratory Distress Syndrome with Differential Response to Positive End-Expiratory Pressure. *Annals of the American Thoracic Society*. 2015;12(Supplement 1):S77-S77.



## 10. ANEXOS

### 10.1. Declaración STROBE

CHECK LIST para estudios Observacionales

	<b>Punto</b>	<b>Localización</b>
<b>Título y resumen</b>	1	1-4
<b>Introducción</b>		
Contexto / fundamentos	2	5-44
Objetivos	3	45
<b>Métodos</b>		
Diseño del estudio	4	46
Contexto	5	46
Participantes	6	46
Variables	7	47-49
Fuentes de datos/medidas	8	49-50
Sesgos	9	50
Tamaño muestral	10	47
Variables cuantitativas	11	48-49
Métodos estadísticos	12	51-52
<b>Resultados</b>		
Participantes	13	53

Datos descriptivos	14	53-62
Datos de las variables de resultado	15	63- 110
Resultados principales	16	63-104
Otros análisis	17	105-110
<b>Discusión</b>		
Resultados claves	18	116-129
Limitaciones	19	136
Interpretación	20	136
Generabilidad	21	136
<b>Otra información</b>		
Financiación	22	196

## **10.2. PUBLICACIÓN 1**

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(6):893-897.



### **10.3. PUBLICACIÓN 2**

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021.

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021



Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García M. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. 2021

#### **10.4. PUBLICACIÓN 3**

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).



Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).

Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Bohollo de Austria R, Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, Fernández-Ruiz L et al. Plasma levels of mid-regional pro-adrenomedullin in sepsis are associated with risk of death. *Minerva Anestesiologica*. 2019;85(4).



## **10.5. FINANCIACIÓN Y RECURSOS**

Se ha dispuesto de un KRIPTOR financiado con una beca FIS04/0836 y personal entrenado, financiado por CIBERES (CB06/06/036) y VHIR en el Laboratorio de Sepsis e Infección Respiratoria del grupo CRIPS del VHIR (jefe de Grupo: Dr. Rello). Se ha obtenido la financiación para material fungible del PCI neumonía del nodo 18 CIBERES y del presupuesto del fondo propio Grupo del VHIR, reconocido como Grupo Consolidado SGR (2017/SGR1671).