

UAH

**Activación linfocitaria e
inmunosenescencia en la
bacteriemia estafilocócica:
aplicación del inmunofenotipado
a un problema de Salud Pública**

*Lymphocyte activation and
immunosenescence in
staphylococcal bacteremia:
application of
immunophenotyping to a public
health problem*

**Máster Universitario en Microbiología aplicada a la Salud Pública e
Investigación en Enfermedades Infecciosas**

Presentado por:

D^a Belén García Jiménez

Dirigido por:

Dr. Mario Fernández Ruiz

Alcalá de Henares, a 19 de Junio de 2023

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción y objetivos	2
3. Materiales y métodos	5
3.1. Muestras clínicas	5
3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	5
3.3. Tinción con anticuerpos	6
3.3.1. Descongelación de las muestras	6
3.3.2. Bloqueo de receptores Fc y uniones inespecíficas de monocitos	6
3.3.3. Marcaje con anticuerpos de superficie conjugados con fluoróforos	6
3.3.4. Lavado y fijación de las muestras	8
3.4. Análisis de las muestras	8
3.5. Análisis estadístico	9
4. Resultados	10
4.1. Titulación de anticuerpos	10
4.2. Estrategia de identificación de poblaciones celulares (gating)	11
4.3. Justificación de las poblaciones de estudio	13
4.4. Caracterización preliminar de perfiles clínicos	14
5. Discusión	17
6. Conclusiones	19
7. Bibliografía	20
8. Agradecimientos	22
9. Anexos	23

1. Resumen

La bacteriemia por *Staphylococcus aureus* constituye un grave problema de salud pública que lleva asociado una elevada morbi-mortalidad. La variabilidad interindividual en la interacción huésped-patógeno puede determinar la evolución del paciente. Pretendemos por ello caracterizar los mecanismos implicados en la respuesta inmunitaria adaptativa en el contexto de la bacteriemia estafilocócica con el fin de identificar potenciales biomarcadores predictores. Para ello, se recogieron muestras en diversos puntos (48 horas, 72-96 horas y 7 días) en 18 pacientes con diagnóstico de bacteriemia por *S. aureus* en el Hospital Universitario “12 de Octubre” con el objetivo de inmunofenotipar las principales subpoblaciones linfocitarias presentes en sangre periférica de forma evolutiva (linfocitos T CD4+, CD8+, linfocitos NK, linfocitos T NK-like, entre otras) con marcadores de superficie celular de memoria, activación e inmunosenescencia. Para ello se puso a punto un panel de 23 colores mediante citometría de flujo espectral. También reclutamos un grupo control de 11 sujetos sanos. Hemos obtenido resultados preliminares que podrían sugerir la utilidad del inmunofenotipado como herramienta para entender la interacción huésped-patógeno a lo largo de la bacteriemia y poder diseñar nuevas terapias dirigidas, mejorando así el tratamiento y el pronóstico de esta entidad.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, bacteriemia, citometría de flujo espectral, fluoróforo, unmixing, gating, inmunofenotipado.

Abstract:

Staphylococcus aureus bacteremia represents a serious public health problem associated with high morbidity and mortality rates. Interindividual variability in host-pathogen interaction may impact on patient outcome. Therefore, we have characterized the mechanisms involved in the adaptive immune response in the context of *S. aureus* bacteremia, in order to ultimately identify predictive biomarkers. For this purpose, sequential samples (48 hours, 72-96 hours, and 7 days) were collected from 18 patients diagnosed with *S. aureus* bacteremia at the Hospital Universitario “12 de Octubre” with the aim of immunophenotyping the main peripheral blood lymphocyte subpopulations (CD4+, CD8+ T-cells, NK cells, NK-like cells, among others) with cell surface markers of activation, memory and immunosenescence. We have previously optimized a 23-color panel through spectral flow cytometry. A control group of 11 healthy subjects was also recruited. Our preliminary results suggest the potential utility of deep immunophenotyping as a tool to understand the host-pathogen interaction during the course of staphylococcal bacteremia and to design new host-targeted therapies, thereby improving the treatment and prognosis.

Key words: *Staphylococcus aureus*, bacteremia, spectral flow cytometry, fluorophore, unmixing, gating, immunophenotyping.

2. Introducción y objetivos

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que se encuentra colonizando de manera asintomática las fosas nasales de aproximadamente el 30% de la población mundial. Puede causar un amplio rango de infecciones, entre las que destaca la bacteriemia¹. La bacteriemia por *S. aureus* es una infección del torrente sanguíneo que se asocia a elevadas tasas de mortalidad, necesidad de ingreso hospitalario prolongado y consumo de recursos sanitarios². Continúa siendo una de las principales causas de bacteriemia adquirida en entornos sanitarios³. Una proporción notable de pacientes con bacteriemia por *S. aureus* desarrollan fenómenos sépticos secundarios a la diseminación hematológica de la bacteria en forma de endocarditis, espondilodiscitis o artritis, complicaciones que conllevan una elevada morbilidad⁴. La emergencia progresiva de cepas de *S. aureus* resistentes a numerosos antibióticos, como meticilina y vancomicina, complica las opciones de tratamiento y representa una grave amenaza de salud pública a nivel mundial^{5,6}. La mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la interacción huésped-patógeno en el contexto de la bacteriemia estafilocócica permitiría diseñar nuevos abordajes terapéuticos dirigidos hacia el sistema inmune del paciente (*host-targeted therapies*) que podrían, eventualmente, coadyuvar al tratamiento antibiótico y mejorar el pronóstico⁷.

La citometría de flujo es una tecnología que permite el estudio de células individuales a partir de muestras biológicas limitadas por medio de análisis multiparamétricos, en los que se miden la dispersión (*forward scatter [FCS]* y *side scatter [SSC]*) y la fluorescencia celular. De este modo permite caracterizar las poblaciones celulares y establecer propiedades celulares únicas^{8,9}. Esta herramienta revela la expresión de una alta variedad de marcadores celulares (tanto de superficie como intracelulares), otorgando de esta manera un mayor conocimiento de los mecanismos funcionales del sistema inmunitario humano en el contexto de la infección¹⁰.

El principal reto de la citometría de flujo multiparamétrica es la compensación o borrado del solapamiento espectral entre fluoróforos. Este problema se ha conseguido resolver gracias a la citometría de flujo espectral, que mide todos los espectros de emisión fluorescente de cada uno de los fluoróforos en una muestra multicolor utilizando excitación multi-láser, creando así una firma o huella espectral única¹¹. A diferencia de esta, en la citometría de flujo convencional cada fluoróforo es medido por un único detector y solo se recoge la emisión de fluorescencia de una parte del espectro (**Figura 1**). Más adelante en el análisis se lleva a cabo el *unmixing*, que consiste en la separación de cada espectro para proporcionar una señal pura de cada fluoróforo^{8,9}; es esta propiedad de la citometría de flujo espectral la que resulta en una mayor

resolución de la señal, además de optimizar el proceso de compensación llevado a cabo por los citómetros de flujo convencionales^{12,13}.

Como se ve, la citometría de flujo espectral permite utilizar en un mismo panel, pares de fluoróforos con espectros de emisión solapantes, dado que es capaz de diferenciar dichos fluoróforos gracias a su firma espectral. Esta ventaja permite aumentar el número de marcadores que pueden analizarse¹⁴. Al mismo tiempo, la citometría de flujo espectral también reconoce y extrae la autofluorescencia, circunstancia que reduce el ruido de fondo y proporciona mayor resolución y sensibilidad al ensayo¹⁵.

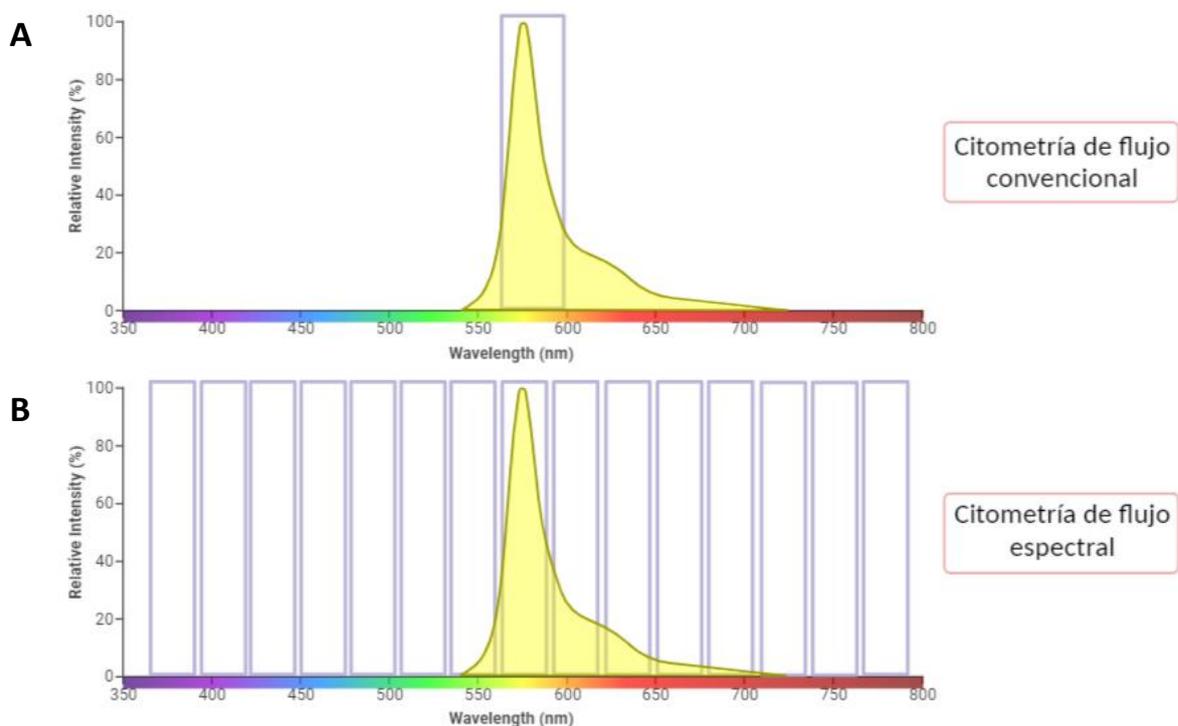


Figura 1. Comparación de la principal diferencia entre la citometría convencional (Figura 1A) y la citometría de flujo espectral (Figura 1B). Imagen de elaboración propia con BioRender.

Esta tecnología se puede aplicar a una amplia variedad de ámbitos y estudios, tales como la caracterización de la respuesta inmunitaria tanto en procesos infecciosos como autoinmunes, la búsqueda de biomarcadores dirigidos, la monitorización de pacientes inmunodeprimidos, etc. En el campo de la inmunología su principal aplicación es el inmunofenotipado, en el que se analizan simultáneamente poblaciones celulares mixtas mediante un análisis multiparamétrico. El inmunofenotipado consiste en teñir las células con anticuerpos conjugados a fluoróforos, teniendo como diana antígenos de la superficie celular¹⁶. Las células inmunes tienen marcadores de superficie específicos para cada tipo celular, de manera que son estos marcadores los que se utilizan para definir poblaciones determinadas⁸.

Son muy escasos los estudios previos en los que se ha caracterizado el inmunofenotipo en sangre periférica en pacientes con bacteriemia estafilocócica con el fin de identificar marcadores de mala evolución. Para el presente Trabajo de Fin de Máster (TFM), se ha empleado un panel de 23 colores donde se inmunofenotipan los principales subconjuntos celulares presentes en la sangre periférica de pacientes con bacteriemia por *S. aureus*. Se han identificado linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores (Tregs), linfocitos T gamma-delta ($\gamma\delta$), linfocitos *natural killer* (NK) y *natural killer-like* (NKT-like), y monocitos. Como se detalla más adelante, a la hora de definir estas subpoblaciones celulares se han empleado marcadores de diferenciación de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8), de monocitos (CD14) y de células NK (CD56), entre otros. Además de definir poblaciones, también se han analizado marcadores de activación (*human leukocyte antigen* [HLA]-DR, CD38), senescencia (CD57, *programmed cell death* [PD]-1), así como receptores para determinadas quimioquinas (CXCR5).

Objetivos

Los objetivos del presente TFM son:

1. Poner a punto un panel de 23 colores de citometría de flujo espectral con el que inmunofenotipar las principales subpoblaciones celulares de sangre periférica en pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, generando así datos preliminares de un proyecto en marcha.
2. Proporcionar una descripción preliminar de la evolución de las principales subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en diversos puntos de la evolución de la bacteriemia estafilocócica y de su comparación con un grupo control de individuos sanos.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras clínicas

Para la realización de este TFM se han incluido un total de 18 pacientes con bacteriemia por *S. aureus* y 11 controles sanos. Las muestras clínicas de los pacientes hospitalizados, previamente diagnosticados mediante al menos un hemocultivo positivo para *S. aureus* en el Hospital Universitario “12 de Octubre” (HU12O), fueron obtenidas entre Enero y Abril de 2022 en tubos de 9 mL con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) en diferentes puntos a lo largo de la evolución de la bacteriemia (48 horas, 72-96 horas y 7 días). El estudio se realizó de acuerdo con los estándares éticos descritos en las Declaraciones de Helsinki y Estambul. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado (**Anexo 1**) y el Comité Ético de Investigación Clínica del HU12O aprobó el protocolo (código CEIm: 20/658).

En 11 de los 18 pacientes con bacteriemia se recogieron muestras en los tres puntos, en tanto que de los 7 restantes únicamente se dispone de las muestras extraídas a las 48 y a las 72-96 horas debido al fallecimiento o alta del paciente. Las muestras de los controles se tomaron en un único punto.

3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Todo el procedimiento se llevó a cabo en la cabina de flujo. A un tubo de 15 mL se le añadieron 6 mL de Ficol y a continuación se dejó deslizar toda la sangre lentamente por la pared del tubo, de forma que no se mezclara con el Ficol (dado que éste es tóxico para las células). Se realizó una centrifugación durante 30 minutos a 2000 rpm a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación se generó un gradiente de densidad que permitió aislar “la nube” de células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells* [PBMC]) (**Figura 2**).

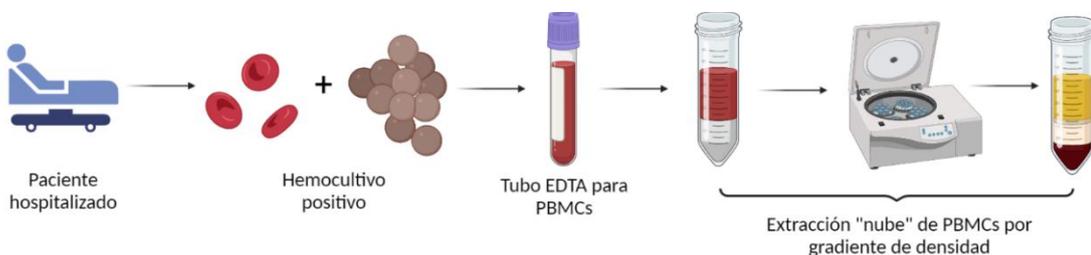


Figura 2. Representación esquemática desde la hospitalización del paciente y recogida de la muestra hasta la realización del gradiente de densidad para el aislamiento de PBMC. Imagen de elaboración propia con BioRender.

Las PBMC se transfirieron a continuación a otro tubo y se enrasó a 15 mL con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline* [PBS]). Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a

1500 rpm a 4°C, se decantó el PBS y el pellet se resuspendió en 10 mL de PBS. Se tomaron 10 µL de células a las que se añadieron 10 µL de azul tripán, un colorante de viabilidad celular. Posteriormente, se cuantificaron las células en el contador automático Countess 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se volvió a centrifugar el tubo a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, decantamos el PBS y se añadieron por cada 10 millones de células, 900 µL de suero bovino fetal (SBF) y 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a un criotubo que fue congelado a -80°C como paso previo a la criopreservación en nitrógeno líquido.

3.3. Tinción con anticuerpos

3.3.1. Descongelación de las muestras

La tinción se inició con la descongelación de las muestras mediante un baño a 37°C, para realizar una descongelación rápida y evitar que se dañaran las células. De inmediato se incorporó el total de la muestra a un tubo de 15 mL al que previamente se habían añadido 9 mL de medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) reconstituido (10% SBF, 1% penicilina, 1% glutamina), previamente atemperado durante 30 minutos. A continuación, se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (20°C). Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS para posteriormente tomar una alícuota de 10 µL y junto con los 10 µL de azul tripán llevar a cabo la cuantificación de las células. Con este nuevo contaje se pretende conocer la tasa de mortalidad celular. Se realizó una nueva centrifugación y una vez decantado el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 100 µL de PBS. Dicho volumen se lleva a un tubo de 1,5 mL donde se realizará la tinción con los anticuerpos.

3.3.2. Bloqueo de receptores Fc y uniones inespecíficas de monocitos

Previamente a la tinción, la suspensión de PBMC se incubó con 5 µL de Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution y 5 µL de True-Stain Monocyte Blocker™ (ambos de BioLegend, San Diego, CA) durante 10 min a temperatura ambiente. Los receptores de la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas (FcR) están presentes en una alta variedad de células y podría dar lugar a resultados de inmunofluorescencia falsos. Por otro lado, el uso de la solución de bloqueo no basada en anticuerpos True-Stain Monocyte Blocker evita las uniones inespecíficas entre monocitos y fluoróforos. En ambos casos, el objetivo del bloqueo fue evitar uniones no específicas.

3.3.3. Marcaje con anticuerpos de superficie conjugados con fluoróforos

Los anticuerpos que se utilizaron para el inmunofenotipado se muestran en la **Tabla 1**. Todo este paso se realizó en hielo y oscuridad para no alterar la actividad de los fluoróforos.

Primero se llevaron a cabo tinciones individuales para determinar la concentración adecuada de cada uno de los fluoróforos. Una vez conocidas las concentraciones a utilizar, se iniciaron las tinciones multicolor.

Tabla 1. Marcadores de estudio conjugados a distintos fluoróforos, clones del anticuerpo y dianas.

MARCADOR	FLUORÓFORO	CLON	DIANA / OBJETIVO
CÉLULAS MUERTAS	LIVE/DEAD BLUE	-	Viabilidad celular
CD45	PerCP	HI30	Leucocitos
CD3	BV 510	SK7	Linfocitos T y células NKT- <i>like</i>
CD4	cFluor YG584	SK3	Linfocitos T CD4+ y NKT- <i>like</i>
CD8	BUV805	SK1	Linfocitos T CD8+, NK y NKT- <i>like</i>
CD25	PE-Alexa Fluor700	CD25-3G10	Linfocitos T reguladores
TCR $\gamma\delta$	PerCP-eFluor 710	B1.1	Células T $\gamma\delta$
CD56	BUV737	NCAM16.2	Activación NK, Células T $\gamma\delta$
CCR7 (CD197)	BV421	2-L1-A	Diferenciación células T
CD45RA	BUV395	5H9	Diferenciación células T y células dendríticas (DCs)
CD127	APC-R700	HIL-7R-M21	Receptor de citoquinas, diferenciación células T reguladoras
HLA-DR	APC/Fire810	L243	Activación células T y monocitos, discriminación linaje NK, marcador linaje DCs
CD38	PE-Fire810	S17015F	Activación/diferenciación monocitos, DCs, linfocitos T y B
CD2	PerCP/Cyanine5.5	TS1/8	Diferenciación NK
CXCR5 (CD185)	BV750	RF8B2	Receptor de quimioquinas, diferenciación de células T
CXCR3 (CD183)	PE-Cyanine7	CEW33D	Receptor de quimioquinas, diferenciación de DC, células T y B
CD57	FITC	TBO1	Senescencia NK y CD8
PD-1 (CD279)	BV 785	EH12.2H7	Receptor de inhibición de células T
CD14	SparkBlue550	63D3	Diferenciación monocitos
CD16	BUV496	3G8	Diferenciación monocitos, NK y células dendríticas
CCR6 (CD196)	BV711	G034E3	Receptor de quimioquina, diferenciación de células T y B
NKG2A (CD159A)	APC	REA110	Diferenciación y activación celular NK, NKT- <i>like</i> y linfocitos T $\gamma\delta$
NKG2C (CD159C)	PE	REA205	Diferenciación celular NK

El protocolo de tinción comenzó por añadir 1 μ L del indicador de viabilidad celular SYTOX™ Blue seguido de una incubación de 30 minutos. Finalizada la incubación, se realizó una nueva incubación individual con los anticuerpos CCR7 y TCR por recomendación de la casa comercial, con el objetivo de no alterar la conformación del fluoróforo. A continuación, se preparó la mezcla multicolor de los 20 anticuerpos restantes para posteriormente añadir un

total de 50 μL de la mezcla a cada suspensión de PBMC y realizar la última incubación de 20 minutos.

3.3.4. Lavado y fijación de las muestras

Comenzamos el lavado con 500 μL de tampón de lavado *Cell Staining Buffer* (BioLegend), mediante una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm. El pellet se resuspendió en 250 μL de FluoroFix™ Buffer (BioLegend) y se dejó fijando las PBMC durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, se volvió a lavar y centrifugar para finalmente resuspender las células en 500 μL de *Cell Staining Buffer* y pasarlas a un tubo de ensayo de fondo redondo, donde se mantuvieron a 4°C hasta que se llevara a cabo su análisis.

3.4. Análisis de las muestras

Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo Cytex® Aurora (Cytex® Biosciences Inc.) de 5 láseres (ultravioleta 355 nm, violeta 405 nm, azul 488 nm, amarillo-verde 532 nm y rojo 640 nm), 3 canales de dispersión y 64 canales de fluorescencia en todo el espectro de emisión.

Como paso previo se realizó el control de calidad con el *software* SpectroFlo® para comprobar que los láseres funcionaran correctamente. Este *software* además de realizar el control de calidad permite el análisis de los datos. Para el control de calidad utilizamos las SpectroFlo® QC Beads, unas partículas que contienen una mezcla de fluoróforos con una franja de excitación de 355 a 650 nm. A continuación, se analizaron las muestras (**Figura 3**).

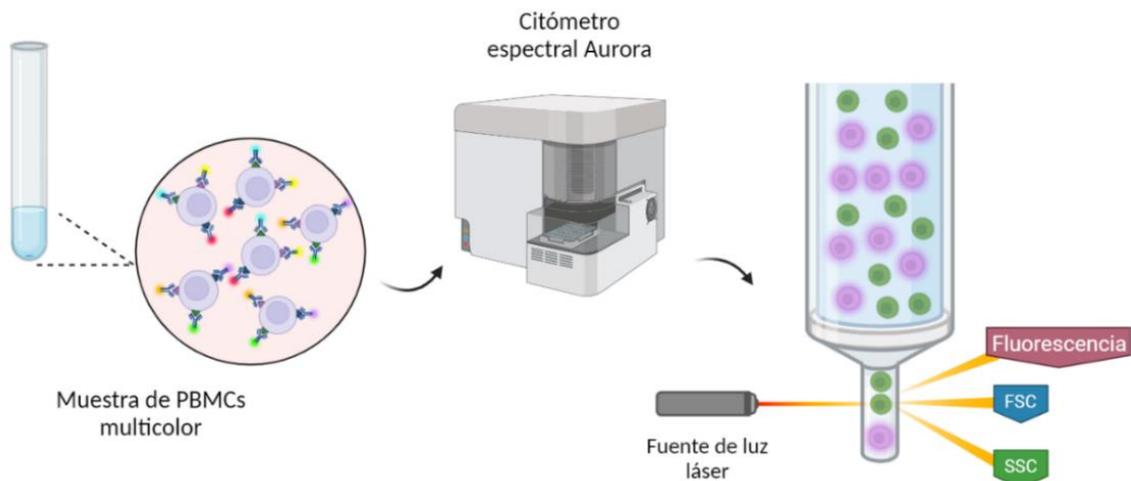


Figura 3. Representación del análisis de las muestras por el citómetro espectral Cytex® Aurora. Imagen de elaboración propia con BioRender.

Para el *unmixing* de las células se utilizaron los controles de referencia que se obtuvieron durante las titulaciones, seleccionando la opción de extracción de autofluorescencia para

mejorar la claridad de los datos. Para reducir el margen de error previamente se había comparado el espectro de los controles de referencia con el espectro esperado. Los archivos FCS desmezclados (*unmixed*) fueron aplicados para el posterior análisis poblacional usando para ello el *software* FlowJo™ (BD Biosciences) donde se llevó a cabo el *gating* en el que se agruparon y diferenciaron las poblaciones celulares de interés.

3.5. Análisis estadístico

Empleamos el *software* SPSS Statistics versión 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY). Comprobamos la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov para una muestra. Las variables cuantitativas se ofrecieron mediante su media (\pm desviación estándar [DE]) o mediana y rango intercuartílico (RIC), según procediera. A continuación, se realizaron comparaciones para muestras repetidas entre los distintos puntos de evaluación (48 horas, 72-96 horas y 7 días) mediante la prueba de Wilcoxon, con el objetivo de detectar diferencias estadísticas en la evolución intra-paciente de la respuesta inmune a lo largo de la bacteriemia. Igualmente se compararon las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes con bacteriemia estafilocócica a las 48 horas y los controles sanos mediante las pruebas de la T de Student o de la U de Mann-Whitney (en aquellas poblaciones que no siguieran la normalidad). Seleccionamos esta medida precoz (48 horas) ya que cabe pensar que es la situación en la que son esperables mayores diferencias con los controles.

4. Resultados

4.1. Titulación de anticuerpos

La concentración apropiada de cada anticuerpo que proporciona una mejor tinción (y que por tanto aumenta la resolución de los marcadores fenotípicos en la tinción de muestras multicolor) se determinó previamente por medio de su titulación y tinción individual, en la que se utilizaron PBMC de controles sanos. Con la titulación obtenemos mejores resultados, ya que al optimizar la concentración del anticuerpo evitamos uniones inespecíficas y conseguimos señales más potentes de las poblaciones positivas.

Dicha titulación consistió en realizar las siguientes diluciones: sin diluir, $1/2$, $1/4$, $1/8$ y sin teñir (células *unstained*). Los resultados de estas titulaciones pueden verse en la **Figura 4**. En el caso de CD25, la dilución que proporcionó mejores resultados fue la titulación más alta, es decir, sin diluir (5 μ L), mientras que en los casos de CD45 y CXCR5 (CD185) fue la dilución $1/4$ (1,25 μ L). El resto de los anticuerpos necesitó una dilución $1/2$ (2,5 μ L).

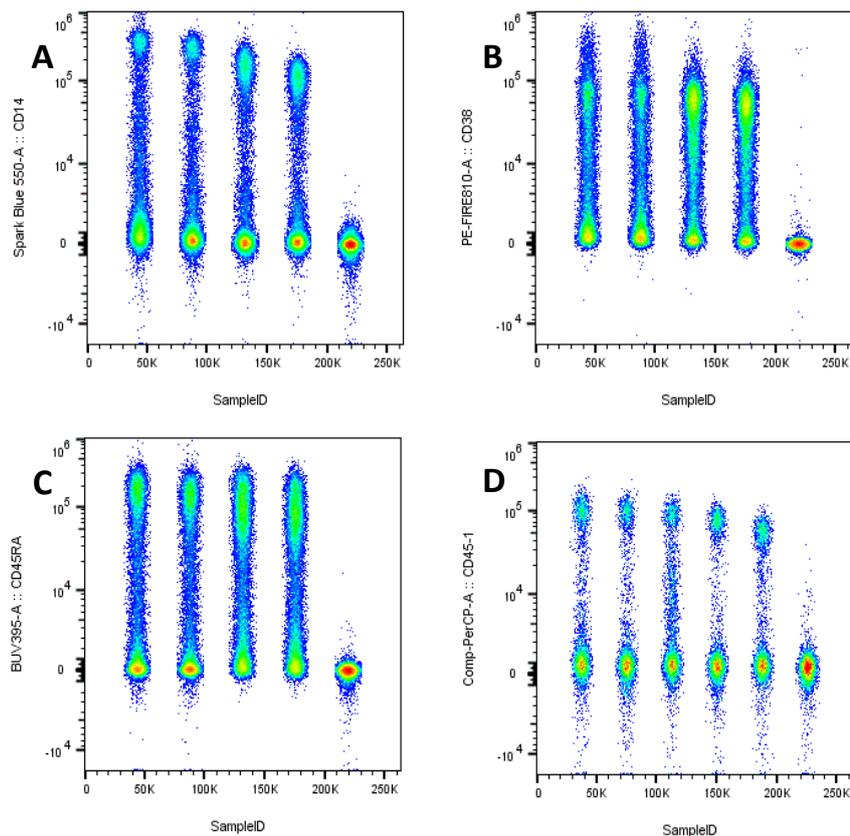


Figura 4. Titulación de los anticuerpos CD14 (Figura 4A), CD38 (Figura 4B), CD45RA (Figura 4C), CD45 (Figura 4D) en el orden sin diluir, $1/2$, $1/4$, $1/8$ y sin teñir. El gradiente de concentración permite ver la separación e intensidad de fluorescencia. Las células *unstained* (no teñidas) indican la autofluorescencia celular que posteriormente se extraerá para unos resultados más precisos.

4.2. Estrategia de identificación de poblaciones celulares (*gating*)

La estrategia de *gating* comenzó por excluir las células agrupadas y las células muertas. A partir de las células vivas e individualizadas se caracterizaron las siguientes poblaciones: leucocitos (empleando CD45 como marcador de superficie); linfocitos T mayoritarios (CD3, CD4 y CD8); linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR- $\gamma\delta$); células NK (CD16 y CD56); y monocitos (CD14 y CD16). La estrategia de *gating* utilizada en la identificación de las principales poblaciones celulares se muestra en la **Figura 5**, tal y como se detalla a continuación. En el **Anexo 2**, por su parte, se detallan los resultados del *gating* de los pacientes #13 y #16 respectivamente, en los tres puntos de la bacteriemia (48 horas, 72-96 horas y 7 días).

Los **monocitos** los diferenciamos, en función del marcaje que presentaran, en clásicos (CD14+ CD16-), intermedios (CD14+ CD16+) y no clásicos (CD14- CD16+).

Los **linfocitos** los enfrentamos a los marcadores CD3 y TCR $\gamma\delta$ con los que diferenciamos las células NK, NKT-*like* y los linfocitos mayoritarios:

- Las células con marcaje CD3+ TCR $\gamma\delta$ + correspondía a las células T $\gamma\delta$. Esta población se diferenció en función de los marcadores CCR7 y CD45RA con los que obtuvimos las siguientes subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$: *naïve* (CCR7+ CD45RA+), de memoria central (CCR7+ CD45RA-), de memoria efectores (CCR7- CD45RA-) y efectores terminales (CCR7- CD45RA+).
- Las células con marcaje CD3- TCR $\gamma\delta$ - se enfrentaron a los marcadores CD56 y HLA-DR. Se seleccionaron las células CD3- HLA-DR- las cuales se enfrentaron con CD56 y CD16 con las que obtuvimos las siguientes subpoblaciones de linfocitos NK: precoces o *early* (CD56+ CD16-), maduras (CD56+ CD16+) y terminales (CD56- CD16+). Los linfocitos NK maduros se subdividieron a su vez en NKG2a (CD159a+) y NKG2c (CD159c+).

La población inicial de linfocitos CD3- TCR $\gamma\delta$ - también podría ser útil para estudiar otras poblaciones, como los linfocitos B, células dendríticas y células linfoides innatas (*innate lymphoid cells* [ILCs]), pero debido a la complejidad que conllevaría dicho panel se decidió estudiar principalmente la actividad y senescencia de los linfocitos T.

Las células con marcaje CD3+ TCR $\gamma\delta$ - se enfrentaron con los marcadores CD56 y CD8, de donde diferenciamos dos poblaciones:

- Las células CD56+ CD3+ identifican a las células NKT-*like*, las cuales se dividieron en subpoblaciones de NKT-*like* con los marcadores CD8 y CD2.
- Las células CD56- CD3+ fueron posteriormente subclasificadas en CD4+ y CD8+.

Inmunofenotipado de linfocitos CD4+

En función de las poblaciones de linfocitos T CD4+ que se quisieran estudiar, se las enfrentó a distintos marcadores. Por un lado, quisimos identificar a las T reguladoras, para lo que utilizamos los marcadores CD127 y CD25, las cuales se identificaron mediante el fenotipo CD25+ CD127-.

A continuación, se enfrentaron a los marcadores CCR7 y CD45RA con lo que obtuvimos las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ efectoras terminales (CCR7- CD45RA+), *naïve* (CCR7+ CD45RA+), de memoria efectora (CCR7- CD45RA-) y de memoria central (CCR7+ CD45RA-). Las últimas dos subpoblaciones juntas forman la población de células CD4+ memoria. Estas células memoria se enfrentaron a los marcadores CXCR5 y PD-1, con lo que diferenciamos los linfocitos T *follicular helper* (Tfh) positivos y negativos, para a continuación identificar subpoblaciones de Tfh positivos y negativos con los marcadores CCR6 y CXCR3. Estas subpoblaciones fueron Tfh17 (CCR6+ CXCR3-), Tfh1 (CCR6- CXCR3+), Tfh1/17 (CCR6+ CXCR3+) y Tfh negativas (CCR6- CXCR3-).

Por otro lado, con el fin de estudiar la activación de los linfocitos T CD4+, estas células fueron enfrentadas a CD38 y HLA-DR, de manera que se identificó a las activadas mediante el fenotipo doble positivo. A su vez quisimos estudiar la senescencia utilizando los marcadores CD57 y PD-1.

Inmunofenotipado de linfocitos CD8+

Las poblaciones analizadas dentro de los linfocitos T CD8+ coincidieron con los ya detallados para los CD4+. De nuevo se estudiaron los marcadores de activación CD38 y HLA-DR por un lado y marcadores de senescencia CD57 y PD-1 por otro. A su vez, identificamos las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ con los marcadores CCR7 y CD45RA, de manera que obtuvimos las subpoblaciones efectoras terminales (CCR7- CD45RA+), *naïve* (CCR7+ CD45RA+), de memoria efectoras (CCR7- CD45RA-) y de memoria central (CCR7+ CD45RA-).

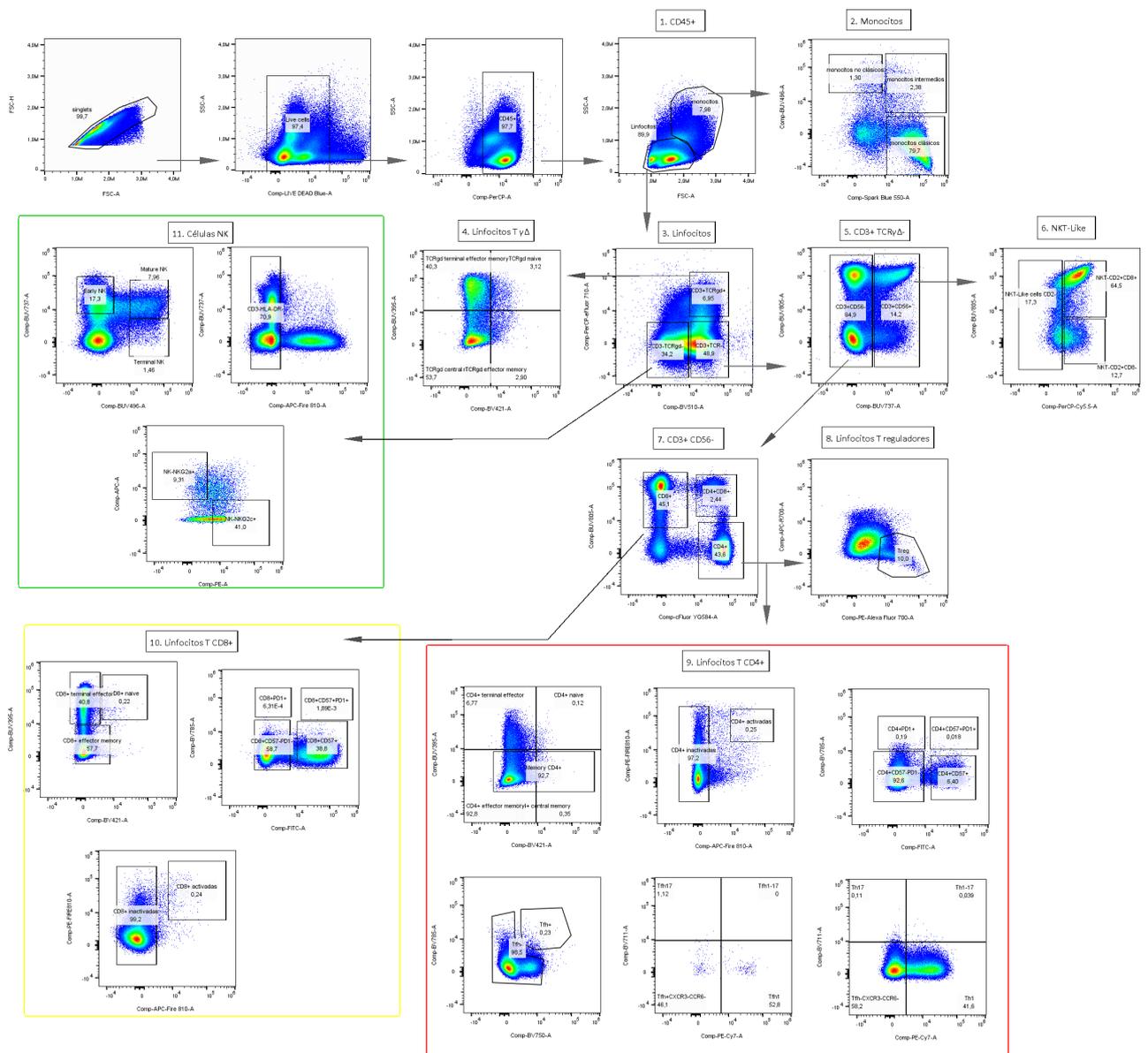


Figura 5. Representación esquemática de la estrategia de *gating* en la que se delimitaron, de forma manual, las subpoblaciones celulares principales presentes en sangre periférica en función de los marcadores y fluoróforos seleccionados. Las flechas indican la relación entre gráficas. Todos los datos presentados en este esquema proceden de PBMC del control #12.

4.3. Justificación de las poblaciones de estudio

Los linfocitos T son fundamentales en la inmunidad protectora contra patógenos, por lo que nos hemos centrado principalmente en caracterizar el inmunofenotipo de esta población. Los linfocitos Treg constituyen un subconjunto de linfocitos T CD4+ que modulan a la baja la respuesta inmune por medio de diferentes vías. Así el análisis combinado de células T con fenotipo efector y de las Treg facilita el conocimiento de la homeostasis inmunitaria y de la interacción entre funciones efectoras y mecanismos inmunoreguladores.

Por otro lado, los linfocitos T $\gamma\delta$ establecen un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa dado que su respuesta precede a ésta última, lo que las convierte en un componente inmunitario único. Esta población puede llevar a cabo múltiples funciones efectoras y se diferencian de las T convencionales en la expresión de TCR $\gamma\delta$. A su vez, los linfocitos T CD8+ citotóxicos son células efectoras importantes a la hora de eliminar células infectadas, reconociendo péptidos presentados por el sistema mayor de histocompatibilidad de clase I. Cabe recordar que el fenotipo de los linfocitos T evoluciona desde que se desarrollan hasta que maduran y se diferencian en los diferentes estadios de *naïve*, efectoras o de memoria.

4.4. Caracterización preliminar de perfiles clínicos

Para el estudio preliminar en las muestras clínicas nos hemos centrado en unas subpoblaciones linfocitarias concretas: linfocitos T CD3+ CD56- (dentro de los que diferenciamos linfocitos cooperadores CD4+ y citotóxicos CD8+). De cada una de estas subpoblaciones analizamos las células efectoras terminales CD45RA+ CCR7-, los marcadores de activación CD38 y HLA-DR, y los marcadores de senescencia PD-1 y CD57, con la finalidad de examinar los cambios en la expresión de estos marcadores y observar los distintos estadios de diferenciación celular a lo largo de la evolución de la bacteriemia.

Se debe tener en cuenta que los resultados que se exponen a continuación pertenecen a un estudio exploratorio de en proyecto aún en fase de reclutamiento (con un total de 89 pacientes incluidos a Junio de 2023). Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov comprobamos que todas las poblaciones celulares correspondientes a los pacientes se ajustan a una distribución normal excepto la población de linfocitos T CD8+ PD-1+ medida a las 48 horas (**Tabla 2**). Todas las muestras de los controles, por su parte, siguieron una distribución normal. Las comparaciones entre las subpoblaciones de los casos medidas a las 48 horas desde el inicio de la bacteriemia y de los controles se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Subpoblaciones celulares en sangre periférica (en porcentajes) en los 18 pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* medidas en diferentes puntos. Los valores destacados en negrita presentan un valor de $P < 0,05$.

Punto de evaluación	Media (%)	DE (%)	Media (%)	DE (%)	Media (%)	DE (%)	P			
	48 horas		72-96 horas		7 días		48 versus 72-96 horas	48 horas versus 7 días	72-96 horas versus 7 días	
Linfocitos CD3+CD56-										
Totales	32,8	± 13,9	35,5	± 15,3	32,5	± 16,7	0,5	0,594	0,657	
Linfocitos CD4+										
Totales	22,6	± 11,6	25,1	± 13,5	21,3	± 12	0,372	0,656	0,859	
Activadas	0,2	± 0,1	0,1	± 0,1	0,1	± 0,1	0,085	0,756	0,286	
Efectores terminales	6,2	± 4,7	7,9	± 7	6,7	± 8,5	0,157	0,859	0,213	
CD57+	1,8	± 2,3	1,8	± 1,9	1,5	± 1,1	0,523	0,722	0,534	
PD1+	0,3	± 0,3	0,2	± 0,3	0,2	± 0,4	0,018	0,213	0,328	
Linfocitos CD8+										
Totales	8,7	± 4,0	8,7	± 3,4	9,3	± 4,8	0,913	0,286	0,477	
Activadas	0,5	± 0,5	0,2	± 0,2	0,2	± 0,1	0,011	0,041	0,929	
Efectores terminales	4,5	± 2,4	4,8	± 2,9	5,3	± 3,6	0,306	0,328	0,534	
CD57+	3,5	± 1,8	3,7	± 1,9	3,7	± 2	0,586	0,534	0,424	
PD1+	0,1 ^a	± 0,03 ^a	0,001	± 0	0,001	± 0	0,043	0,18	1	

DE: desviación estándar.

^a: Dado que este valor no sigue una distribución normal, se ofrecen la mediana y el rango intercuartílico (RIC): 0,001 (RIC: 0,001 - 0,0143).

Tabla 3. Valores de *P* correspondientes a la comparación de medias entre la primera medida de los casos (48 horas) y controles. Los valores destacados en negrita presentan un valor de *P* <0,05.

Valor de P en la comparación de casos <i>versus</i> controles		
CD3+CD56-		
Totales	0,401	
	Linfocitos CD4+	Linfocitos CD8+
Totales	0,694	0,363
Activadas	0,002	0,003
Efectores terminales	0,544	0,155
CD57+	0,16	0,922
PD1+	0,002	0,06 ^a

^aAl no seguir una distribución normal se realizó la prueba de la U de Mann-Whitney para la comparación de medias.

En la comparación entre 48 horas y 72-96 horas, en las poblaciones de linfocitos T CD4+ PD-1+, linfocitos T CD8+ activados y linfocitos T CD8+ PD-1+ se observaron diferencias significativas. El porcentaje de linfocitos T CD4+ PD-1+ a las 48 horas fue mayor que a las 72-96 horas (*P* valor = 0,018). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados fue mayor igualmente a las 48 horas (*P* valor = 0,011). Por último, el porcentaje de linfocitos T CD8+ PD-1+ también es mayor a las 48 horas respecto a los puntos posteriores (*P* valor = 0,043). Entre las poblaciones medidas de las 48 horas y a los 7 días se observaron diferencias en las CD8+ activadas (*P* valor = 0,041). En la comparación de las poblaciones a las 72-96 horas y los 7 días no se observaron diferencias significativas.

Para concluir, se observaron diferencias entre los pacientes con bacteriemia y los controles sanos en las poblaciones de linfocitos T CD4+ activados (*P* valor = 0,002), linfocitos CD4+ PD-1 (*P* valor = 0,002) y linfocitos CD8+ activados (*P* valor = 0,003), con porcentajes más altos en los casos.

5. Discusión

El objetivo que se ha perseguido en este TFM ha sido la aplicación del inmunofenotipado a un problema de salud pública como es la bacteriemia por *S. aureus*.

El panel de 23 colores puesto a punto permite una caracterización detallada, mediante citometría de flujo espectral, del inmunofenotipo de las principales subpoblaciones celulares de la sangre periférica humana como son los linfocitos T CD4+ y CD8+, los monocitos y las células NK. Este tipo de panel puede ser muy útil en estudios en los que las muestras sean limitadas, como es este caso, en el que se obtuvieron muestras únicas en diferentes puntos a lo largo de la bacteriemia del paciente (a las 48 horas, 72-96 horas y 7 días), permitiendo así realizar una caracterización exhaustiva a partir de una única muestra y estudiar cambios a medida que evolucionaba la infección.

Este trabajo constituye una parte de un proyecto de investigación más amplio en el que se analizan biomarcadores predictores de una mala evolución en la bacteriemia estafilocócica (proyecto PI20/01084). Estas moléculas implicadas en la respuesta inmunitaria y que ofrecen información acerca del estado inmunológico del paciente incluyen la producción de interferón- γ y tras la estimulación de células inmunes, los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, la expresión de polimorfismos genéticos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms* [SNPs]) y finalmente, la expresión fenotípica de las poblaciones celulares inmunes presentes en sangre periférica. Es este último punto en el que se ha basado este trabajo, dado que de los cuatro ensayos que componen este estudio, ya se comunicaron los resultados preliminares de los tres primeros métodos en el Trabajo de Fin de Grado (TFG) presentado en el curso anterior.

Como se ha explicado previamente, al inmunofenotipar las principales subpoblaciones celulares presentes en sangre periférica de pacientes con bacteriemia por *S. aureus* se pretende analizar si los cambios fenotípicos se correlacionan con un peor pronóstico, además de buscar posibles factores de riesgo y, por lo tanto, utilizar esta herramienta como futura aplicación en clínica.

En nuestros resultados preliminares se ha evidenciado que los puntos de inicio de la bacteriemia presentaban una mayor expresión de marcadores de activación linfocitaria respecto a los más tardíos, concretamente los linfocitos T CD8+ activados entre las 48 horas y las 72-96 horas y entre las 48 horas y los 7 días; estas diferencias son esperables dado que al inicio de la bacteriemia, la respuesta inmunitaria es más robusta para aclarar la infección. En el caso de los linfocitos T CD4+ activados entre las 48 horas y las 72-96 horas, observamos una tendencia estadística (P valor = 0,085) y sugerimos que en el momento en el que aumente el tamaño

muestral, observaremos diferencias estadísticas. Igualmente se ha comprobado cómo las subpoblaciones que presentaban una mayor activación se correlacionan con niveles de expresión de PD-1 más altos. Este hallazgo se explicaría considerando que el correceptor de inhibición PD-1 actúa regulando la respuesta inmune, de manera que la activación inmunitaria no sea excesiva¹⁶. Por último, en la comparación entre casos y controles observamos una clara diferencia en cuanto a la expresión de marcadores de activación linfocitaria tanto de linfocitos T CD4+ como T CD8+, al igual que linfocitos CD4+ PD-1+, siendo esta expresión mayor en los casos como consecuencia de la infección activa en éstos.

Actualmente encontramos muchas publicaciones que manifiestan que la citometría de flujo espectral se utiliza en el ámbito clínico, con el fin de caracterizar la respuesta inmune de pacientes con distintas patologías, además de establecer determinadas características clínicas. Algunas de estas publicaciones estudian biomarcadores clínicos predictores de la gravedad de la patología y en última instancia destacan que dicho inmunofenotipado proporciona una mejor comprensión de la desregulación inmunitaria en estos pacientes^{17,18}. De igual modo, otra publicación en la que se estudió la desregulación de la respuesta inmune de pacientes con sepsis reveló que la clasificación clínica en función de la actividad del sistema inmunitario, antes de la administración del tratamiento, es fundamental para poder establecer la terapia adecuada para cada paciente¹⁹.

Esta herramienta de inmunofenotipado además de monitorizar el estado inmunológico del paciente y establecer la terapia adecuada con su seguimiento consecutivo, también puede ser útil a la hora de establecer un diagnóstico o la gravedad de una enfermedad²⁰ o incluso diferenciar el origen de dichas desregulaciones inmunológicas²¹.

Entre las principales limitaciones del presente TFM debemos destacar el número reducido de muestras de pacientes, por lo que los resultados presentados deben considerarse como resultados preliminares. La información clínica disponible fue igualmente limitada.

En definitiva, podemos concluir que actualmente se está utilizando la herramienta de inmunofenotipado en la clínica y que sus aplicaciones son muy variadas, por lo que la aplicación de esta tecnología a un problema de salud pública como es la bacteriemia por *S. aureus* puede ser útil a la hora de entender cómo varía la interacción huésped-patógeno a lo largo de la infección y establecer, en un futuro, una terapia personalizada. En cualquier caso, este TFM supone una parte de un proyecto de investigación en marcha en el que se han ido reclutando en tiempo real pacientes con bacteriemia por *S. aureus* en el HU120 y en el que se ha ido poniendo a punto el panel para, una vez finalizado el proyecto, llevar a cabo los análisis poblacionales de todos los pacientes finalmente incluidos.

6. Conclusiones

Los resultados de este TFM son preliminares y deben ser contextualizados dentro de un proyecto actualmente en marcha. Se trata pues, de una prueba de concepto que nos sugiere que:

1. Efectivamente podemos poner a punto un panel de 23 colores de citometría de flujo espectral y caracterizar de este modo el inmunofenotipo de las principales subpoblaciones celulares de sangre periférica en pacientes con bacteriemia por *S. aureus*.
2. Existen diferencias significativas en el estado inmunológico intra-paciente y entre los pacientes y los individuos sanos, concretamente en la regulación de la respuesta inmune a través de marcadores de activación e inmunosenescencia, lo cual abre la puerta a su aplicación como biomarcadores pronósticos en el futuro.

7. Bibliografía

1. Kong C, Neoh HM, Nathan S. Targeting Staphylococcus aureus toxins: A potential form of anti-virulence therapy. Vol. 8, Toxins. MDPI AG; 2016.
2. Bai AD, Lo CKL, Komorowski AS, Suresh M, Guo K, Garg A, et al. Staphylococcus aureus bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. Vol. 28, Clinical Microbiology and Infection. Elsevier B.V.; 2022. p. 1076–84.
3. Abraham L, Bamberger DM. SClenCe OF MeDICIne | FeATUre SerleS Staphylococcus aureus Bacteremia: contemporary management. Vol. 117.
4. Tabah A, Laupland KB. Update on Staphylococcus aureus bacteraemia. Vol. 28, Current Opinion in Critical Care. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. 495–504.
5. Hemmadi V, Biswas M. An overview of moonlighting proteins in Staphylococcus aureus infection. Vol. 203, Archives of Microbiology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 481–98.
6. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. Vol. 21, Critical care (London, England). 2017. p. 211.
7. Zumla A, Rao M, Wallis RS, Kaufmann SHE, Rustomjee R, Mwaba P, et al. Review Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects [Internet]. Vol. 16, www.thelancet.com/infection. 2016. Available from: www.thelancet.com/infection
8. McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. Curr Protoc Immunol. 2018 Feb 1;2018:5.1.1-5.1.11.
9. Robinson JP. Flow cytometry: past and future. Vol. 72, BioTechniques. Future Science Ltd; 2022. p. 159–69.
10. Liechti T, Roederer M. OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells. Cytometry Part A. 2019 Nov 1;95(11):1129–34.
11. Ferrer-Font L, Small SJ, Lewer B, Pilkington KR, Johnston LK, Park LM, et al. Panel Optimization for High-Dimensional Immunophenotyping Assays Using Full-Spectrum Flow Cytometry. Curr Protoc. 2021 Sep 1;1(9).

12. Mitra-Kaushik S, Mehta-Damani A, Stewart JJ, Green C, Litwin V, Gonneau C. The Evolution of Single-Cell Analysis and Utility in Drug Development. Vol. 23, AAPS Journal. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021.
13. Niewold P, Ashhurst TM, Smith AL, King NJC. Evaluating spectral cytometry for immune profiling in viral disease. *Cytometry Part A*. 2020 Nov 1;97(11):1165–79.
14. Sahir F, Mateo JM, Steinhoff M, Siveen KS. Development of a 43 color panel for the characterization of conventional and unconventional T-cell subsets, B cells, NK cells, monocytes, dendritic cells, and innate lymphoid cells using spectral flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2020;
15. McCausland M, Lin YD, Nevers T, Groves C, Decman V. With great power comes great responsibility: High-dimensional spectral flow cytometry to support clinical trials. *Bioanalysis*. 2021 Nov 1;13(21):1597–616.
16. Park LM, Lannigan J, Jaimes MC. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry Part A*. 2020 Oct 1;97(10):1044–51.
17. Rey-Jurado E, Espinosa Y, Astudillo C, Jimena Cortés L, Hormazabal J, Noguera LP, et al. Deep immunophenotyping reveals biomarkers of multisystemic inflammatory syndrome in children in a Latin American cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022 Nov 1;150(5):1074-1085.e11.
18. Gosset C, Foguene J, Simul M, Tomsin O, Ammar H, Layios N, et al. Machine learning identification of specific changes in myeloid cell phenotype during bloodstream infections. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
19. Wang Y, Gloss B, Tang B, Dervish S, Santner-Nanan B, Whitehead C, et al. Immunophenotyping of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Septic Shock Patients With High-Dimensional Flow Cytometry Analysis Reveals Two Subgroups With Differential Responses to Immunostimulant Drugs. *Front Immunol*. 2021 Mar 22;12.
20. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Vol. 111, *Blood*. American Society of Hematology; 2008. p. 3941–67.
21. Boldt A, Borte S, Fricke S, Kentouche K, Emmrich F, Borte M, et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(3):191–206.

8. Agradecimientos

Para comenzar me gustaría agradecer al grupo de Patologías Infecciosas del Instituto de Investigación Hospital "12 de Octubre" (i+12) el que me haya acogido en su laboratorio durante la realización tanto del TFG como del TFM; agradecerles también la libertad que me han otorgado en el laboratorio, su disposición a la hora de ayudarme en la realización de ambos trabajos, y la enseñanza de tantas técnicas de laboratorio tanto por parte de técnicos como tutores. También quiero agradecer a mis compañeros y amigos del máster que hayan hecho de este curso un año tan especial y divertido, tanto en el aula como fuera de ella, además de haber conseguido que las clases fueran mucho más llevaderas y las tardes en el Babybull tan entretenidas. No puedo terminar este TFM sin agradecerles a mi familia y amigos más cercanos, que han estado apoyándome desde el principio de mi carrera profesional. Por último, pero no menos importante, quiero agradecerles a todos los profesores que me han ido mostrando esta profesión tan bonita y que poco a poco me ha convertido en la bióloga y microbióloga que soy hoy.

9. Anexos

Anexo 1. Hoja de información al paciente y consentimiento informado.

Impacto clínico de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped en la evolución de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*
Versión 1.2. (15 de Enero de 2021)

HOJA DE INFORMACION PARA EL PACIENTE

Título del estudio: Impacto clínico de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped en la evolución de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*

Investigador principal: Mario Fernández Ruiz

Servicio: Unidad de Enfermedades Infecciosas
Centro: Hospital Universitario "12 de Octubre", Madrid
Teléfono de contacto: 91 3908000 (ext. 4632)

Estimado paciente:

Esta Hoja de Información puede incluir términos técnicos. Por favor, pregunte al médico o al personal investigador del estudio que le hace entrega de la misma si tiene alguna duda o no entiende con claridad alguno de los términos o información de este documento.

• INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de este Hospital.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno antes de otorgar o denegar su consentimiento.

El presente proyecto de investigación tiene por objeto establecer el impacto del sistema inmunológico (las "defensas" del organismo) en la evolución de la bacteriemia (es decir, la infección del torrente sanguíneo) por *Staphylococcus aureus*. La bacteriemia por este microorganismo constituye un grave problema de salud. El sistema inmune está constituido por una compleja red de moléculas y células especializadas en proteger al organismo frente a la infección por microorganismos patógenos. De forma resumida, este sistema está dotado de dos grandes componentes (o brazos), la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Varios estudios previos han demostrado que tanto una como otra desempeñan un papel en la respuesta frente a la bacteriemia por *S. aureus*.

Estamos intentando evaluar una nueva estrategia que esperamos nos permita conocer con la máxima precisión posible cuál es el estado del sistema inmunológico de los pacientes que, como usted, presentan una bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Para ello analizaremos hasta qué puntos sus defensas (innatas y adaptativas) son capaces de controlar la invasión por parte de esta bacteria. De este modo podríamos ajustar de una manera más precisa el tipo y la duración del tratamiento antibiótico, minimizando al máximo a su vez el riesgo de complicaciones.

• PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Si concede usted su consentimiento, procederemos a recoger determinados datos de su historia clínica. También solicitamos su permiso para que, al mismo tiempo que se le realizan las analíticas rutinarias programadas por su equipo médico, podamos extraer un volumen extra de **4 centímetros cúbicos de sangre en 3 ocasiones** a lo largo de la próxima semana. Analizaremos dichas muestras para determinar cuál es el estado de su sistema inmunitario. Estas muestras coincidirán con las que de rutina le sean solicitadas por su equipo médico, de forma que no será preciso someterle a ninguna extracción de sangre adicional. Las muestras de sangre serán destruidas una vez se realicen los procedimientos de laboratorio concernientes a la presente investigación.

• PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria, y en caso de que decidiera declinar su consentimiento usted seguiría recibiendo todos los cuidados médicos que precisara. Puede negarse a participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin perjuicio ni pérdida de los beneficios a los que de otro modo pueda tener derecho. La relación con su equipo médico habitual no va a verse en modo alguno afectada por la naturaleza de su decisión. Antes de tomar una decisión lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee para asegurarse de su correcta comprensión.

- **BENEFICIOS**

Es posible que usted no obtenga un beneficio personal directo de su participación en este estudio. Sin embargo, confiamos que los resultados que obtengamos del mismo puedan beneficiar en el futuro a otros pacientes que, como usted, desarrollen una bacteriemia por *Staphylococcus aureus*.

- **COMPENSACIÓN ECONÓMICA**

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica por su participación.

- **COSTES**

Su participación en este estudio no supondrá ningún coste adicional para usted.

- **CONFIDENCIALIDAD**

Toda la información relacionada con este estudio es estrictamente confidencial y será tratada de acuerdo a la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de Diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y a la Ley de Investigación Biomédica 14/2007. Para garantizar el anonimato de su identidad cada una de las muestras del estudio recibirá un código (nunca su nombre) y/o se anonimizarán. Se le ha pedido a su médico que guarde esta hoja de información con su consentimiento otorgado y su firma, así como la relación entre su código y su identidad en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica. Las conclusiones de este estudio podrían ser presentadas en reuniones y/o revistas científicas, pero siempre de forma global y sin que pueda identificarse individualmente a ninguno de los participantes.

- **¿QUÉ IMPLICA SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?**

Como se ha comentado, su eventual participación en el presente estudio no implicará ni gratificación ni carga económica alguna para usted. Tampoco implicará un mayor número de extracciones analíticas ni una modificación en el tipo de tratamiento o de seguimiento que sus médicos estimen más oportuno para su caso concreto.

- **INFORMACIÓN ADICIONAL**

Si usted precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el investigador principal y/o otros investigadores del estudio.

LE RECORDAMOS QUE SU DECISIÓN DE PARTICIPAR O NO PARTICIPAR NO AFECTARÁ EN MODO ALGUNO A LA CALIDAD DE LA ATENCIÓN MÉDICA QUE RECIBA.

Declaración y firma del paciente.

- He leído la información anterior y entiendo cuál es el objetivo del estudio.
- He sido informado por _____ (nombre del investigador)
- Recibiré una copia firmada y fechada por el investigador
- Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo abandonar cuando quiera.

Impacto clínico de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped en la evolución de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*
Versión 1.2. (15 de Enero de 2021)

- Otorgo mi consentimiento para que los investigadores recojan y procesen mis datos, así como las muestras de sangre necesarias para el estudio.
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas y he recibido una respuesta satisfactoria a todas ellas.

FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL y FECHA

FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE DEL INVESTIGADOR y FECHA

Anexo 2. *Gating* del paciente #13 a las 48 horas (Figura 2a), a las 72-96 horas (Figura 2b) y a los 7 días (Figura 2c). *Gating* del paciente #16 a las 48 horas (Figura 2d), a las 72-96 horas (Figura 2e) y a los 7 días (Figura 2f).

