

Niveles de Expresión del Receptor de Alta Afinidad para IgG (CD64) en Neutrófilos de Pacientes que Cursan Infección Aguda por Citomegalovirus

Grutadauria Sergio L.

Nader Virginia

Jares Lucía

de Elias Rafael

Kiener Oscar I.

Laboratorio de Elías y Kiener SRL. Sanatorio Allende.

Obispo Oro 42. Córdoba. Argentina.

Correspondencia: Sergio Grutadauria. Laboratorio de Elías y Kiener SRL. Obispo Oro 42. Córdoba. Argentina. Te: 0351 422 2425 / 425 1126. Sergio7@gmail.com

RESUMEN

La expresión del antígeno CD64 (receptor de alta afinidad para la porción Fc de la IgG) aumenta en la superficie de neutrófilos durante los estados sépticos. Su utilidad diagnóstica no se ha generalizado ya que ha habido a marcadas discrepancias entre los estudios publicados. La procalcitonina es hoy aceptada como el mejor marcador de sepsis bacteriana. Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los niveles de CD64 en las infecciones virales, seleccionamos una población de pacientes con infección por citomegalovirus a los que les se determinó además procalcitonina, proteína C reactiva, leucocitos y linfocitos totales. El CD64 se cuantificó por citometría de flujo, la proteína C reactiva por inmunoturbidimetría, la procalcitonina y los anticuerpos para citomegalovirus (IgG e IgM) por electroquimioluminiscencia; el citológico se realizó en un contador hematológico.

En los 23 pacientes estudiados (2-57 años, 6 mujeres / 17 hombres) los niveles de expresión de CD64 estuvieron aumentados (6000 ± 3151 moléculas/célula), mientras que la procalcitonina estuvo dentro de los valores de referencia. La proteína C reactiva estuvo incrementada en 18/23 pacientes y en 13 casos hubo leucocitosis moderada. Todos los pacientes cursaron con linfocitosis.

El incremento de los niveles de CD64 en pacientes con infecciones virales, particularmente citomegalovirus, sin un aumento concomitante de procalcitonina, podría explicar, al menos en parte, las discrepancias encontradas por otros autores al analizar el comportamiento de estos biomarcadores en las sepsis bacterianas.

Palabras Clave: Expresión de CD64, neutrófilos, citomegalovirus, sepsis.

INTRODUCCION

Se denomina antígeno CD64 al receptor de alta afinidad para la porción Fc de la IgG (FcγRI); se encuentra presente en la superficie de monocitos, eosinófilos y neutrófilos y está involucrado en los procesos de fagocitosis. Las citoquinas proinflamatorias inducen un rápido incremento de la expresión de CD64 en neutrófilos. Este hallazgo ha llevado a proponerlo como un biomarcador temprano de sepsis bacteriana similar a la procalcitonina, (que también aumenta en la sepsis bacterianas). Ambas determinaciones tienen como ventaja una mayor especificidad diagnóstica que el recuento de leucocitos o la proteína C reactiva (1-4).

La especificidad y sensibilidad de la expresión de CD64 en neutrófilos aplicada al diagnóstico de sepsis bacteriana son muy variables en la literatura, debido a disparidades en los protocolos utilizados, en la forma de expresión de los resultados y en los criterios de inclusión de los pacientes. Esta disparidad se ha visto reflejada en que no se ha llegado a un consenso para su utilización (1,2,5).

Es bien sabido que el citomegalovirus (CMV) replica productivamente en leucocitos de sangre periférica, (6,7) y que induce la expresión de proteínas, tanto propias como virales, en las células infectadas. Una de ellas es el FcγRI (8-11).

La cuantificación de la expresión de CD64 ha sido siempre orientada al diagnóstico de sepsis bacterianas y no se ha profundizado su estudio en otro tipo de infecciones. Adicionalmente no se han investigado los casos en los que el aumento de expresión de CD64 no se correlaciona con otros marcadores de sepsis como la procalcitonina o el hemocultivo, ni con un cuadro clínico compatible (2).

El objetivo del presente estudio fue cuantificar los niveles de expresión de CD64 en neutrófilos de pacientes que cursaban primoinfección por CMV y evaluar el comportamiento de otros marcadores de inflamación.

MATERIALES Y METODOS

Diseñamos un estudio analítico, prospectivo, transversal.

Pacientes: Se incluyeron en el estudio 23 pacientes ambulatorios (2-57 años, 6 mujeres / 17 hombres) que acudieron al Laboratorio Central del Sanatorio Allende (Córdoba, Argentina), con sospecha clínica de infección por CMV y que fueron IgM positiva para CMV, entre Mayo de 2014 y Junio de 2015.

Serología: las determinaciones en suero de IgM e IgG para CMV se realizaron por electroquimioluminiscencia (EQL) en un equipo Elecsys 2010 (Roche Diagnostics). Aquellos pacientes que resultaron positivos para IgM CMV fueron re-ensayados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando improntas comerciales (MBL Bion).

Marcadores de Inflamación: se determinaron con el objetivo de excluir el componente inflamatorio causado por una infección bacteriana como causante del aumento de la expresión de CD64. Los niveles de proteína C reactiva se analizaron en un equipo Modular P800 (Roche Diagnostics; valor de referencia: <0,5mg%). Para procalcitonina se utilizó un reactivo de EQL en un equipo Modular E170 (Roche Diagnostics; valor de referencia: <0,50ng/ml). Los recuentos de leucocitos y fórmulas leucocitarias se procesaron en un CellDyn 3500 (Abbott) (valores de referencia <9,0 x10⁹/L y <3,6 x10⁹/L, respectivamente).

Determinación de niveles de CD64: El procesamiento de las muestras se realizó entre 4 y 6 horas posteriores a la extracción de sangre anticoagulada con EDTA. A 25µl de sangre se agregó 25µl de PBS y se incubó con 3µl de anticuerpo monoclonal anti CD64 marcado con ficoeritrina (Beckman-Coulter) durante 20 minutos. Posteriormente para lisar los eritrocitos se agregaron 2ml de lisante conteniendo cloruro de amonio y se incubó nuevamente por 20 minutos. Todos los procedimientos se hicieron a temperatura ambiente (en oscuridad). Se utilizó un citómetro CyFlowML (Partec). La ubicación de la población de neutrófilos se hizo en base a las características de side scatter y marcación con CD64. (Figura I). Para el análisis de las poblaciones se utilizó el software nativo del citómetro (FloMax).

Para el cálculo de los resultados se tomó el valor de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MIF) de la población de neutrófilos y se la comparó con una curva de calibración. Se estableció como valor de referencia 755 moléculas/células, obtenido por Kato y colaboradores (12).

Curva de calibración: se realizó con el reactivo QuantiBRITE PE (Beckton Dickinson). El mismo está compuesto por micropartículas con 4 niveles definidos de moléculas de ficoeritrina. Cuando las micropartículas son analizadas en el citómetro, aparecen 4 picos de

fluorescencia (Figura II). Usando el valor de MIF de cada pico se puede construir una curva de calibración que permite establecer la cantidad de moléculas de anticuerpo unidas por célula en las muestras de los pacientes. Los cálculos se efectuaron según las instrucciones del fabricante.

Estadística: Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa MedCalc versión demo. Se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la distribución normal de los datos. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar, para las series con distribución normal, y como mediana seguida del rango intercuartílico 25-75 para la proteína C reactiva. Para establecer el nivel de significación de la comparación de las mediciones frente a los valores de referencia se utilizó el test t de Student (variables paramétricas) y el test de Wilcoxon (variable no paramétrica). Se consideraron significativas aquellas diferencias con $p < 0,05$.

Figura I: Ubicación de las población de neutrófilos en base a las características de Side Scatter y a la marcación con CD64/PE.

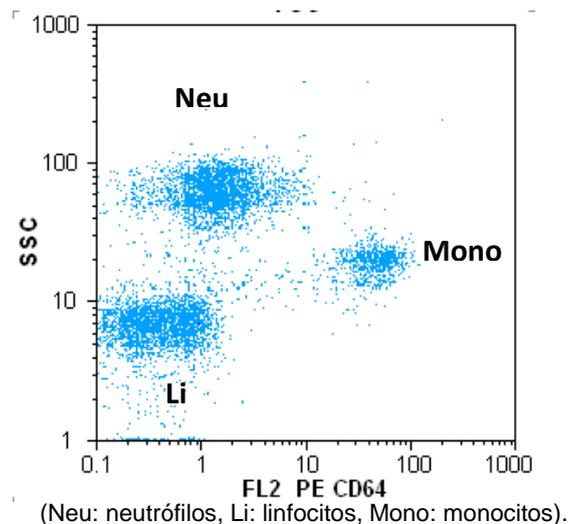
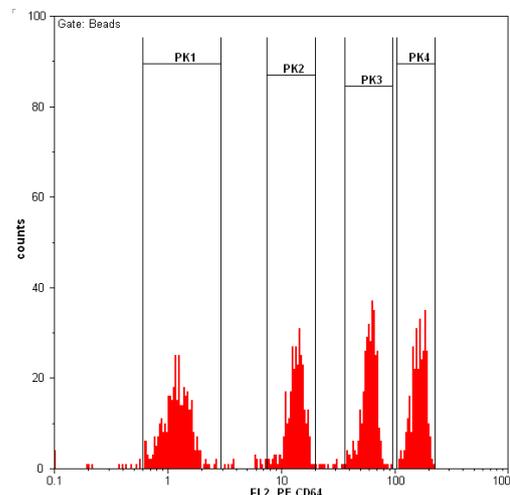


Figura 2: Construcción de la curva de calibración para el dosaje de CD64 con el kit QuantiBrite PE (Bekton Dickinson).



RESULTADOS

Serología para CMV: Todos los pacientes fueron positivos para IgM CMV por EQL con índices de positividad superiores a dos veces el valor de corte. También fueron positivos por IFI. El ensayo de IgG CMV EQL utilizado posee un valor de corte de 1 U/ml y es lineal hasta 500 U/ml. Todos los pacientes tuvieron valores inferiores a 15 U/ml, a excepción de uno que fue negativo. Los indicios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio concuerdan con una primoinfección por CMV.

Marcadores de inflamación: La proteína C reactiva fue mayor al valor de referencia en 18 de los 23 pacientes (1,9 1,3mg%, p=0,0004). El recuento de leucocitos estuvo ligeramente aumentado en 13/23 pacientes ($9,5 \pm 2,5 \times 10^9/L$, p=0,32), todos los pacientes cursaron con linfocitosis ($5,3 \pm 1,7 \times 10^9/L$, p=0,0001), signo característico de la infección por CMV. Los niveles de procalcitonina se encontraron dentro de los valores de referencia en el 100% de las muestras estudiadas ($0,23 \pm 0,13 \text{ng/ml}$, p<0,0001), descartando de esta forma la presencia de una infección bacteriana generalizada.

Niveles de expresión de CD64: Todos los pacientes incluidos en el estudio tuvieron valores significativamente superiores al valor de referencia (rango 1269-11370,6000 \pm 3151 moléculas/célula, p<0,0001).

DISCUSION

La elevada mortalidad asociada a las septicemias bacterianas ha impulsado la búsqueda de biomarcadores tempranos que permitan identificar a los pacientes afectados y poder establecer la terapia antibiótica apropiada. Altos niveles de CD64 han sido correlacionados con sepsis bacteriana por muchos autores, pero con diferentes niveles de utilidad cuando se compara con otros biomarcadores, como la procalcitonina, el recuento de leucocitos y la proteína C reactiva (5). En contraste hay relativamente pocos reportes que hablen de qué ocurre con estos marcadores en las infecciones virales.

La **proteína C reactiva**, es un marcador de baja especificidad debido a que aumenta frente a una gran variedad de causas de inflamación. Nuestra población de pacientes infectados por CMV tuvo una elevación moderada pero significativa de proteína C reactiva, tal como ha sido reportado por otros autores (13-15). La **procalcitonina**, considerada uno de los mejores marcadores de sepsis bacteriana(16), estuvo dentro de los valores de referencia en todos los pacientes estudiados, coincidentemente con otros reportes (13,17). Muchas infecciones virales inducen una **leucocitosis** moderada, principalmente a expensas del aumento de linfocitos (17).

Los **niveles de expresión de CD64** estuvieron por encima del valor establecido para la población saludable (12,18). Datos similares han sido reportados por otros autores: en la publicación de Jalava-Karvinen y colaboradores (19) se menciona que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el aumento de niveles de CD64 para infecciones virales y bacterianas. Incluso Mokuda y colaboradores (9) obtienen mayores valores de CD64 en infecciones virales que en bacterianas no sépticas. Cabe destacar que ambos estudios se hicieron con pacientes agrupados por tipo de infección (viral o bacteriana), pero no por microorganismo causante. Hasta donde hemos podido profundizar, este es el primer reporte realizado a partir de una población de pacientes infectados solamente por CMV.

Como se mencionaba en la introducción, las publicaciones en la materia han mostrado resultados discrepantes sobre la utilidad de la cuantificación de CD64 en neutrófilos en pacientes que cursan sepsis bacteriana, cuando se compara esta determinación frente a la procalcitonina o al hemocultivo; sin embargo no se ha profundizado sobre las probables causas de esas discrepancias. Este estudio da cuenta de que infecciones virales podrían ser responsables de la falta de concordancia entre los marcadores mencionados (5,20,21).

Conclusiones

En nuestra cohorte de individuos cursando primoinfección por CMV los niveles de CD64 en neutrófilos de sangre periférica estuvieron significativamente aumentados en el 100% de los pacientes, mientras que la procalcitonina se mantuvo dentro de los valores de referencia. Este hallazgo podría explicar ciertas discrepancias entre ambos marcadores y debería ser tenido en cuenta a la hora de plantear la utilidad de la medición de los niveles de CD64 para el diagnóstico temprano de sepsis bacteriana. Un mayor número de casos, así como el estudio de este parámetro en otras infecciones virales serían de utilidad para poder generalizar las conclusiones arribadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Hoffman JJML. *Biochemia Medica*. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. 2011; 21 (3): 282-290.
2. Wang X, Zhong, Li ZY, Zeng L, Zhang AQ, Pan W, Gu W, Jiang JX. Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Critical Care* 2015; 19:245-54.
3. Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic Profile of Sepsis in Neonates: Neutrophil CD64 as a Diagnostic Marker. *Pediatrics* 2008; 121:129-34.
4. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 Is an Improved Indicator of Infection or Sepsis in Emergency Department Patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:654–61.
5. Li S, Huang X, Chen Z, Zhong H, Peng Q, Deng Y, Qin X, Zhao J. Neutrophil CD64 expression as biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013; 17:e12-23.
6. Erice A, Holm MA, Gill PC, Henry S, Dirksen CL, Dunn DL, Hillam RP, Balfour HH. Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia Assay Is More Sensitive Than Shell Vial Cultures for Rapid Detection of CMV in Polymorphonuclear Blood Leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30:2822-25.
7. Gerna G, Percivalle E, Torsellini M, Revello MG. Standardization of the Human Cytomegalovirus Antigenemia assay by Means of In Vitro-Generated pp65-Positive Peripheral Blood Polymorphonuclear Leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36: 3585-89.

8. Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, Laitinen I, Kotilainen P, Rajamäki A, Nikoskelainen J, Lilius EM, Nuutila J. Simultaneous quantitative analysis of Fc gamma RI (CD64) and CR1 (CD35) on neutrophils in distinguishing between bacterial infections, viral infections, and inflammatory diseases. *Clin Immunol* 2009; 133: 314-23.
9. Mokuda D, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 2012; 22:750-57.
10. Wojtal KA, Rogler G, Scharl M, Biedermann L, Frei P, Fried M, Weber A, Eloranta JJ, Gerd A, Kullak-Ublick GA, Vavricka SR. Fc Gamma Receptor CD64 Modulates the Inhibitory Activity of Infliximab. *PLoS ONE* 2012; 7:e43361. doi:10.1371/journal.pone.0043361.
11. ZHU H, CONG JP, SHENK T. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: Induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:13985-90.
12. Katoh N, Nishino J, Nishimura K, Kawabata C, Hotta Y, Matsui T, Nakamura S, Matsushita T. Normal sequential changes in neutrophil CD64 expression after total joint arthopathy. *Journal of Orthopaedic Science.* 2013; 18:949-54.
13. Gendrel D, Raymond J, Coste J, Moulin F, Lorrot M, Guérin S, Ravilly S, Lefèvre H, Royer C, Lacombe C, Palmer P, Bohuon C. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Journal of Pediatric Infectious Diseases.* 1999;18:875-81.
14. Korppi M, Kroger L. C-reactive protein in viral and bacterial respiratory infection in children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 1993;25: 207-13.
15. JuffrieM, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, VeermanAJP, Thijs LG. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Tropical Medicine Hygiene.* 2001; 65: 70-5.
16. Faix JD. Biomarkers of Sepsis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 2013; 50:23-36.
17. Delèvaux I, André M, Colombier M, Albuisson E, Meylheuc F, Bègue R-J, Piette J-C, Aumaître O. Can procalcitonin measurement help in differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory processes?. *Annals Rheumatic Diseases* 2003;62: 337-40.

18. Matsui T, Ohsumi K, Ozawa N, Shimada K, Sumitomo S, Shimane K, Kawakami M, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. CD64 on Neutrophils Is a Sensitive and Specific Marker for Detection of Infection in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33:2416-24.
19. Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, Laitinen L, Kotilainen P, Rajamäki A, Nikoskelainen J, Lilius E, Nuutila J. Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) and CR1 (CD35) on neutrophils in distinguishing between bacterial infections, viral infections, and inflammatory diseases. *Clinical Immunology*. 2009; 133: 314-23.
20. Gros A, Roussel M, Sauvadet E, Gacouin A, Marqué S, Chimot L, Lavouté S, Camus C, Fest T, Le Tulzo Y. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker if bacterial infection is low in critical patients. *Intensive Care Medicine* 2012; 38:448-52.
21. Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, Stewart B, Grief B, Scharnweber G. CD64 index provides simple a predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47:3914-9.