

**Evaluación de la expresión de CD64 en  
neutrófilos y de procalcitonina como  
marcadores diagnóstico de sepsis**

GALLARÁ, Cintia Gisela  
GRUTADAURIA, Sergio L.  
NADER, Virginia  
DE ELIAS, Rafael  
KIENER, Oscar I.

Tutora: Balseiro, María Isabel

Laboratorio De Elías y Kiener SRL. Sanatorio Allende.  
Obispo Oro 42. Córdoba. Argentina.

Correspondencia: Gallará Cintia Gisela. Laboratorio De Elías y Kiener  
SRL. Obispo Oro 42. Córdoba. Argentina. Te: 0351 422 2425 / 425 1126.  
[cin.bioq@gmail.com](mailto:cin.bioq@gmail.com).

## RESUMEN

**OBJETIVO:** estudiar el comportamiento de los niveles de CD64 en pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI) y determinar su utilidad como indicador de sepsis. Además, analizar si la combinación de la expresión de CD64 y Procalcitonina (PCT) mejora la identificación de estos pacientes.

**MATERIALES Y METODOS:** se analizaron las concentraciones de PCT y CD64 en 103 pacientes de UCI con o sin parámetros de sepsis, tal como lo define el *American College of Chest Physicians* y la *Society of Critical Care Medicine*. La PCT se cuantificó por electroquimioluminiscencia en un equipo Modular E170 (Roche Diagnostics), valor de referencia  $<0,50\text{ng/mL}$  y la determinación de los niveles de CD64 se realizó en un citómetro CyFlowML (Partec). Para el análisis estadístico se utilizó el programa InStat y MedCalc, aplicando la prueba de Chi Cuadrado y análisis de curvas ROC para precisión diagnóstica, considerando estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS:** Tanto la PCT como el CD64 fueron capaces de distinguir entre pacientes con y sin sepsis. El área bajo la curva para la PCT fue de 0,798 (0,703-0,873) y para CD64 en neutrófilos fue de 0,742 (0,642-0,826) cuya sensibilidad fue de 63,08% y 64,62%, con especificidad de 87,10% y 80,65% respectivamente, ambas con un  $p < 0,001$ . Además se vio que ambas variables tienen una asociación estadísticamente significativa entre sí,  $p = 0,014$ , con un riesgo relativo (RR) de 1,765 (IC 95%: 1,129-2,759).

**CONCLUSION:** La expresión de CD64 en neutrófilos tuvo una performance similar a la PCT para identificar a pacientes con sepsis en UCI y su combinación mejoró la precisión diagnóstica.

**Palabras claves:** Expresión de CD64, Neutrófilos, Procalcitonina, Sepsis.

## INTRODUCCION

Los procesos infecciosos y más aún la sepsis siguen siendo un reto en pacientes hospitalizados, y junto con el shock séptico son las principales causas de mortalidad hospitalaria(1). La sepsis es una disfunción orgánica causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección, con una mortalidad mayor al 10%(2). Inicialmente la respuesta a la infección es neurohumoral, siendo tanto proinflamatoria como antiinflamatoria de manera generalizada. Este proceso comienza con la secreción de citoquinas que estimulan la activación de los monocitos, macrófagos y neutrófilos, los cuales interactúan con las células endoteliales y células presentadoras de antígenos a través de numerosos receptores de reconocimiento de patógenos(3), entre ellos el CD64. La sepsis es frecuente en pacientes ancianos, inmunodeprimidos y críticamente enfermos, especialmente los que requieren cuidados intensivos. En las primeras etapas, las manifestaciones clínicas de sepsis no son específicas, sin embargo, la detección temprana es clave para establecer la terapia antibiótica apropiada y así reducir la mortalidad relacionada. Esto no es sencillo, ya que no existen métodos rápidos y confiables para distinguir entre pacientes que están infectados realmente de los que no. Además el cultivo microbiológico negativo no siempre es excluyente de infección y se requieren largos períodos de incubación(4).

Actualmente, varias pruebas basadas en la determinación de parámetros sanguíneos son investigadas para su uso en el diagnóstico de sepsis, principalmente en fase temprana. La evidencia publicada apoya el uso de proteína C reactiva (PCR) y la determinación del nivel de procalcitonina (PCT), mientras que interleuquina 6 y la intensidad de la expresión del receptor de alta afinidad para la porción Fc de la Inmunoglobulina G (FcγRI o CD64) en neutrófilos están en estudio(5-8).

El CD64 se encuentra en la superficie de monocitos, eosinófilos y neutrófilos, y está involucrado en los procesos de fagocitosis, y se ha visto que su expresión es incipiente o mínima en neutrófilos en estado de reposo, y aumenta tras su activación por acción de citoquinas pro-inflamatorias, como Interferón  $\gamma$  y factor estimulante de colonias de granulocitos, producidas en respuesta a una infección o a la exposición a una endotoxina(9-11). Dentro de las 4-6 horas puede incrementar su valor hasta 10 veces, permitiendo así una buena discriminación entre los neutrófilos en reposo y los activados(12,13). Este hallazgo permitió proponerlo como un biomarcador temprano de sepsis bacteriana similar a la PCT, que también aumenta en estas situaciones. Ambas determinaciones tienen como ventaja una mayor especificidad diagnóstica que

el recuento de leucocitos o la proteína C reactiva(14-17), que si bien aumentan en sepsis bacteriana también lo hacen en inflamación, convirtiéndolos en marcadores altamente sensibles y específicos para la infección sistémica y sepsis(18,19). Tanto la especificidad como la sensibilidad reportadas de la expresión de CD64 en neutrófilos aplicada al diagnóstico de sepsis bacteriana, son muy variables, esto se debería a la disparidad en los protocolos utilizados, en la forma de expresión de los resultados y en los criterios de inclusión de los pacientes, no obteniéndose aún un consenso para su utilización(15,16,20).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el valor predictivo para sepsis bacteriana de los niveles de expresión de CD64 en neutrófilos y PCT en pacientes internados en UCI y determinar si la combinación de ambos aumenta el mismo.

## MATERIALES Y METODOS

Diseñamos un estudio analítico, prospectivo, transversal.

**Pacientes:** Se incluyeron en el estudio 103 pacientes adultos internados en la UCI del Sanatorio Allende (Córdoba, Argentina) con sospecha clínica de infección o sepsis, entre Mayo y Junio de 2017. Se definió sepsis como la presencia de dos o más criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS): temperatura corporal  $>38^{\circ}\text{C}$  o  $<36^{\circ}\text{C}$ , frecuencia cardíaca  $>90$  latidos/min., frecuencia respiratoria  $>20$  inspiraciones/min o  $\text{PaCO}_2 <32\text{mm Hg}$  y Recuento de leucocitos  $>12,0 \times 10^9/\text{L}$  o  $<4,0 \times 10^9/\text{L}$  o formas inmaduras  $>10\%$ , siguiendo los criterios del *American College of Chest Physicians* y de la *Society of Critical Care Medicine*.

### **Marcadores de Inflamación:**

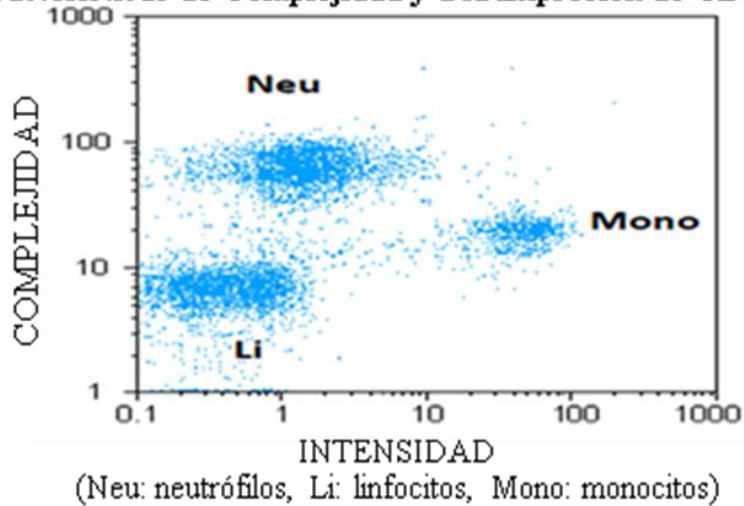
- La PCT se determinó en suero por electroquimioluminiscncia en un equipo Modular E170 siendo su valor de referencia  $<0,50\text{ng/mL}$ .
- El recuento de leucocitos y el valor absoluto de neutrófilos en sangre entera anticoagulada con EDTA se cuantificaron en un CellDyn 3500 (Abbott) (valores de referencia  $<9,0 \times 10^9/\text{L}$  y  $<3,6 \times 10^9/\text{L}$ , respectivamente).
- Los niveles de expresión de CD64 en neutrófilos se midieron entre las 4 y 6 horas posteriores a la extracción utilizando sangre anticoagulada con EDTA. Se incubaron  $25\mu\text{l}$  de sangre con  $25\mu\text{l}$  de PBS y  $3\mu\text{l}$  de anticuerpo monoclonal anti CD64 marcado con ficoeritrina (PE) (Beckman-Coulter) durante 20 minutos. Posteriormente, para lisar los eritrocitos, se agregaron 2 mL de lisante conteniendo cloruro de amonio (Cicarelli) y se incubó nuevamente por 20 minutos. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente y en oscuridad. Se utilizó un citómetro CyFlowML (Partec). La selección de la población de neutrófilos se hizo en base a las características de complejidad y a la intensidad de expresión de CD64. (Figura I). Para el análisis de las poblaciones se utilizó el software nativo del citómetro (FloMax), con el cual se calculó el valor de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MIF) de la población de neutrófilos y se la comparó con la curva de calibración.

**Curva de calibración:** utilizamos el reactivo QuantiBRITE PE (BecktonDickinson) que está compuesto por micropartículas con 4 niveles definidos de moléculas de PE que al ser analizadas en el citómetro evidencian 4 picos de fluorescencia (Figura II). Usando

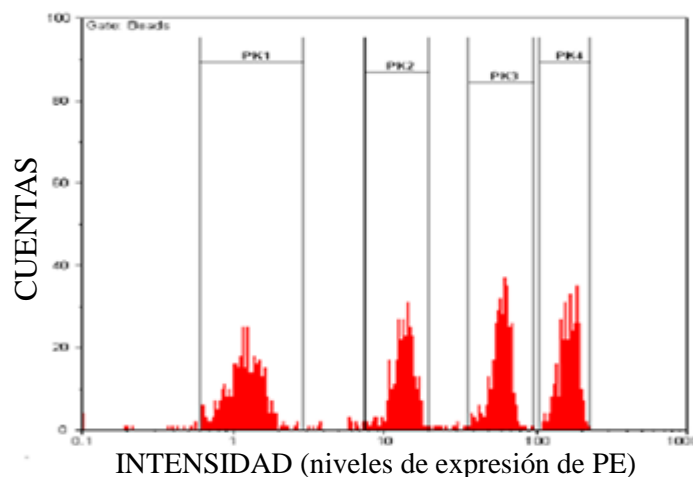
el valor de MIF de cada pico se puede construir una curva de calibración que permite establecer la cantidad de moléculas de anticuerpo unidas por célula (mol/cel) en las muestras de los pacientes. Los cálculos se efectuaron según las instrucciones del fabricante.

**Estadística:** Para los cálculos estadísticos se utilizaron los programas Instat y MedCalc versión demo. Se aplicó el test de Chi Cuadrado para las comparaciones entre variables. Además se analizó la precisión diagnóstica mediante curvas ROC. Se consideraron significativas aquellas diferencias con  $p < 0,05$ .

**Figura I: Ubicación de la población de neutrófilos en base a las características de Complejidad y a la Expresión de CD64/PE.**



**Figura II: Construcción de la curva de calibración para el dosaje de CD64 con el kit QuantiBrite PE (BektonDickinson).**

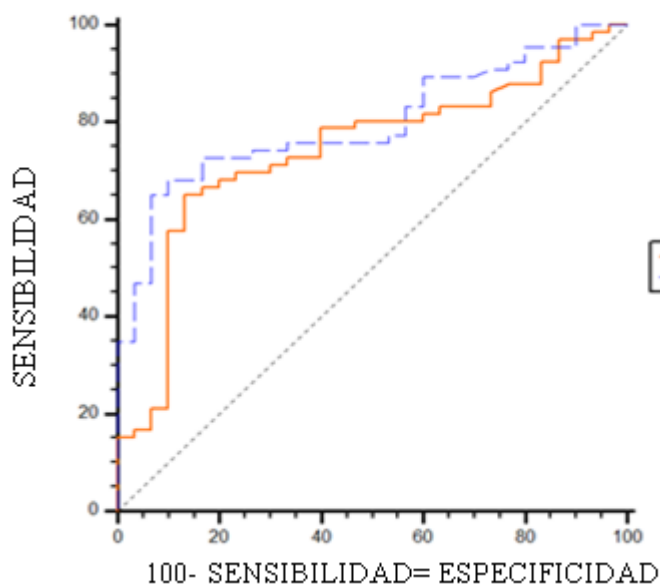


## RESULTADOS

De los 103 pacientes estudiados, 8 fueron excluidos por no poder evaluar los niveles de expresión de CD64 debido a leucopenia severa. De los 96 restantes, 65 presentaron criterios de sepsis (pacientes sépticos) y 31 no, siendo este el grupo control (pacientes no sépticos). La mortalidad global fue del 30% y solamente 3 pacientes del grupo control fallecieron por infección intrahospitalaria con *Klebsiella*. El 75% de los pacientes con sepsis (n=50) presentaron criterios para shock séptico y en el 41% de los pacientes sépticos el hemocultivo fue positivo.

Tanto la PCT como el CD64 fueron capaces de distinguir entre pacientes sépticos y no sépticos. El AUC para la PCT fue de 0,798 (IC 95%: 0,703-0,873) y para los niveles de expresión de CD64 en neutrófilos fue 0,742 (IC 95%: 0,642-0,826) (Figura III). En cuanto al análisis de la curva ROC, el punto de corte con la mejor sensibilidad y especificidad para el antígeno CD64 fue de 1150 mol/cel. La sensibilidad y especificidad de la PCT y CD64 se muestran en la Tabla 1. Además, ambas variables tenían una asociación estadísticamente significativa entre sí, con una  $p = 0,014$ , con un riesgo relativo (RR) de 1,765 (IC 95%: 1,129-2,759) (Tabla 1).

**Figura III: Curva ROC de PCT y CD64 en neutrófilos en la identificación de sepsis.**



El Valor Predictivo Positivo (VPP) de la PCT para diagnóstico de sepsis fue de 91 % y el Valor Predictivo Negativo (VPN) de 53 %; mientras que para la determinación de moléculas de CD64 en neutrófilos fueron 88 % y 52 %, respectivamente. El análisis simultáneo de PCT y CD64 con respecto a sepsis proporcionó un VPP del 93 % y un VPN del 72 % con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 92%.

**Tabla 1: Sensibilidades y especificidades de PCT y CD64**

<b>VARIABLE</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b><i>p</i></b>
<b>PCT (ng/ml)</b>	63,08%	87,10%	<i>p &lt; 0,001</i>
<b>CD64 (mol/cel)</b>	64,62%	80,65%	<i>p &lt; 0,001</i>
<b>PCT + CD64</b>	75,00%	92,00%	<i>p &lt; 0,001</i>
<b>PCT (ng/ml) vs CD64 (mol/cel)</b>	60,42%	66,67%	<i>p = 0,014</i>

S: sensibilidad; E: especificidad; PCT: procalcitonina; CD64: determinación del número de moléculas de CD64 expresadas en neutrófilos.



## DISCUSION

Este estudio prospectivo observacional mostró que la combinación de la determinación de la expresión de CD64 en neutrófilos y la PCT aumentan la precisión diagnóstica para sepsis. Tanto la PCT como la expresión de CD64 distinguieron a los pacientes sépticos de los no sépticos con AUC similares, 0,798 y 0,742, respectivamente. Ambas curvas muestran que no existen diferencias significativas, es decir que la exactitud diagnóstica es similar para ambas pruebas. Por lo cual a la hora de seleccionar una de ellas se debería tener en cuenta el mejor rendimiento costo-beneficio, teniendo en cuenta costo de la prueba, el tiempo de entrega del resultado, facilidad de interpretación del mismo.

En el estudio de Li S. y col., encontró que en infecciones bacterianas la sensibilidad y especificidad de CD64 en neutrófilos fueron del 76% y 85% respectivamente, analizando una población heterogénea en cuanto a edad, dado que incluía desde neonatos a adultos, mientras que en nuestro estudio dichos valores de sensibilidad y especificidad fueron un poco menores pero solo se incluyeron adultos (20).

Muchos estudios, obtuvieron resultados contradictorios con respecto a la precisión diagnóstica de CD64 en comparación con PCT y han criticado la baja sensibilidad de CD64 en neutrófilos para el diagnóstico de sepsis (21,22), pero debido a su alta especificidad, al combinarse con otro marcador más sensible podría mejorar su rendimiento (22,23). Sin embargo en nuestro estudio, la sensibilidad diagnóstica de CD64 en neutrófilos fue similar a la de la PCT y la combinación de ambas pruebas aumentó tanto sensibilidad como especificidad. En cuanto al análisis simultáneo de ambas determinaciones, PCT y CD64, observamos que aquellos pacientes con PCT y CD64 con valores superiores a los puntos de corte la probabilidad de sepsis fue del 93%, por lo tanto, solamente 7 % de los pacientes recibirán un tratamiento antibiótico innecesario.

Una limitación de nuestro estudio es el bajo número de nuestras por lo cual podría sobreestimar el rendimiento diagnóstico de la expresión de CD64. Por otra parte no clasificamos a nuestros pacientes según el tipo de germen aislado (Gram negativos - Gram positivos) en aquellos con hemocultivos positivos (41%), ni consideramos las patologías de base (por ejemplo oncológica).

En conclusión, la expresión de CD64 en neutrófilos tuvo un rendimiento similar al de la PCT para identificar pacientes con sepsis en UCI, con lo cual, las mediciones de la expresión de CD64 podrían ser una herramienta prometedora para el diagnóstico precoz de sepsis. Además, se demostró que la combinación de ambas determinaciones en simultáneo mejora la precisión diagnóstica y permitiría la instauración de tratamientos adecuados precozmente con el fin de reducir la mortalidad.

## BIBLIOGRAFIA

1. Al-Mousa, H. H. *et al.* Device-associated infection rates, bacterial resistance, length of stay, and mortality in Kuwait: International Nosocomial Infection Consortium findings. *Am. J. Infect. Control* (2016) **44**, 444–449.
2. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* (2016) **315**, 801.
3. Nguyen, H. B. *et al.* Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Ann. Emerg. Med.* (2006) **48**.
4. Cardelli, P. *et al.* Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* (2008) **21**, 43–49.
5. O'Grady, N. P. *et al.* Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients: 2008 update from the American College of Critical Care Medicine and the Infectious Diseases Society of America. *Crit. Care Med.* (2008) **36**, 1330–1349.
6. Wan, S. *et al.* Neutrophil CD64 serves as a sensitive and reliable biomarker for the diagnosis of bacterial infection in hematological disorders. *J. Infect.*(2015) **70**, 543–545.
7. Hoffmann, J. J. M. L. Neutrophil CD64: A diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin. Chem. Lab. Med.* (2009) **47**, 903–916.
8. Pavic, M. Procalcitonin in systemic and localized bacterial infection. *Biochem. medica* (2010) **20**, 236–241.
9. Repp, R. *et al.* Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* (1991) **78**, 885–9.
10. Van der Meer, W., Pickkers, P., Scott, C. S., van der Hoeven, J. G. & Gunnewiek, J. K. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J. Endotoxin Res.* (2007) **13**, 94–100.
11. Cho, S. Y. & Choi, J. H. Biomarkers of Sepsis. *Infect. Chemother.* (2014) **46**, 1–12.
12. Davis, B. H. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert Rev. Mol. Diagn.* (2005) **5**, 193–207.
13. Song, S. H., Kim, H. K., Park, M. H. & Cho, H. I. Neutrophil CD64 expression is associated with severity and prognosis of disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* (2008) **121**, 499–507.
14. Davis, B. H., Olsen, S. H., Ahmad, E. & Bigelow, N. C. Neutrophil CD64 Is an Improved Indicator of Infection or Sepsis in Emergency Department Patients. *CrossRef List. Deleted DOIs* (2000) **1**, 654–661.
15. Hoffmann, J. J. M. L. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochemia medica* (2011) **21**, 282–90.
16. Wang, X. *et al.* Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Crit. Care* (2015) **19**, 245.
17. Bhandari, V., Wang, C., Rinder, C. & Rinder, H. Hematologic Profile of Sepsis in

- Neonates: Neutrophil CD64 as a Diagnostic Marker. *Pediatrics* (2008) **121**, 129–134.
18. Cid, J., Aguinaco, R., Sanchez, R., García-Pardo, G. & Llorente, A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* (2010) **60**, 313–319.
  19. Icardi, M. *et al.* CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. *J. Clin. Microbiol.*(2009) **47**, 3914–3919.
  20. Li, S. *et al.* Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: A meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* (2013) **17**, e902–e913.
  21. Gámez-Díaz, L. Y. *et al.* Diagnostic accuracy of HMGB-1, s-TREM-1, and CD64 as markers of sepsis in patients recently admitted to the emergency department. *Acad. Emerg. Med.* (2011) **18**, 807–815.
  22. Gros, A. & Marque, S. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients. (2012) 445–452. doi:10.1007/s00134-012-2483-6
  23. Gibot, S. *et al.* Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2012) **186**, 65–71.