

## NOTA TÉCNICA

### Comparación de citocinas plasmáticas en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad con y sin diagnóstico previo de EPOC por una técnica *multiplex*☆

Jesús F. Bermejo-Martín<sup>a,b,\*</sup>, Julia Barbado<sup>c</sup>, Rocío González-Gallego<sup>c</sup>,  
M. Cristina García-Loygorri<sup>b</sup>, Rubén Iglesias<sup>a</sup>, Rosa M. Mate<sup>c</sup>, Nuria Bueno<sup>c</sup>,  
Pilar Carreras<sup>c</sup>, Antonio Jimeno<sup>c</sup>, Raúl Ortiz de Lejarazu<sup>b</sup> y Eduardo Arranz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología de las Mucosas. IBGM. Universidad de Valladolid. Valladolid. España

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología e Inmunología. Hospital Clínico Universitario. Valladolid. España

<sup>c</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Clínico Universitario. Valladolid. España

Recibido el 20 de marzo 2008; aceptado el 1 de junio de 2008

#### PALABRAS CLAVE

Citocinas;  
Neumonía;  
EPOC;  
Respuesta empeorada

#### Resumen

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se asocia con una mayor mortalidad en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). En este trabajo se comparan los valores plasmáticos de 9 citocinas en 10 pacientes ingresados en nuestro hospital por NAC diagnosticados previamente de EPOC y 10 pacientes también ingresados por NAC pero sin EPOC. Para ello se utilizó el equipo Th1/Th2 para detección múltiple de citocinas de Biorad sobre una plataforma *Luminex*. Al ingreso, los pacientes con EPOC mostraron unos valores significativamente menores de interleucina-2, GM-CSF e IFN- $\gamma$  que los pacientes sin EPOC. Estos mediadores contribuyen en gran manera a la inmunidad adaptativa y a la activación de linfocitos T, por lo que su menor concentración en plasma sugiere la existencia de una respuesta inmune empeorada en los pacientes con EPOC que presentan una NAC. Esta respuesta empeorada podría contribuir a explicar el aumento de mortalidad en estos pacientes. Nuestros resultados muestran también la utilidad de las técnicas *multiplex* para la detección simultánea de varios mediadores en la misma muestra en estudios de investigación clínica.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

☆ Este trabajo ha sido posible gracias al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, el cual financia el contrato de Jesús F. Bermejo-Martín (EMER07/050).

\*Autor de correspondencia.

E-mail: jbermejo@hucv.sacyl.es (J.F. Bermejo-Martín).

**KEYWORDS**

Cytokines;  
Pneumonia;  
COPD;  
Impaired response

**Comparison of plasma cytokines using a multiplex technique in patients with community acquired pneumonia with or without COPD****Abstract**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with increased mortality in patients with community acquired pneumonia (CAP). In this work we have compared the plasma levels of 9 cytokines in 10 patients admitted to our hospital with CAP and a previous diagnosis of COPD against the levels of 10 patients with CAP and no COPD. For this we used the Biorad TM Th1/Th2 kit for multiple detection of cytokines on a Luminex platform. At admission, patients with COPD showed significantly lower levels of IL-2, GM-CSF and IFN- $\gamma$  than patients with no COPD. These mediators are key contributors to adaptive immunity and to T cell activation. As a result, their concentration in plasma suggests an impaired immune response in those patients with COPD suffering from CAP. This impaired response could help to explain the increased mortality observed in these patients. Our results also show the usefulness of multiplex methods for simultaneous detection of several mediators in the same sample in clinical research studies.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

Recientemente se ha descrito la asociación entre enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el incremento de la mortalidad en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC)<sup>1</sup>. Asimismo, hay evidencias cada vez mayores que han identificado respuestas inmunológicas empeoradas y un incremento en la susceptibilidad a las infecciones del tracto respiratorio inferior en pacientes con EPOC. Por ejemplo, los macrófagos alveolares de pacientes con EPOC presentan respuestas defectivas a antígenos de *Haemophilus influenzae*<sup>2</sup>. Los pacientes con EPOC muestran también una quimiotaxis empeorada de neutrófilos así como respuestas deficientes de inmunidad celular sistémica<sup>3,4</sup>. El objetivo de nuestro estudio fue comparar los valores plasmáticos de 9 citocinas en 10 pacientes con NAC y diagnóstico previo de EPOC frente a los valores de estas citocinas en 10 pacientes con NAC sin EPOC.

**Métodos****Pacientes**

El estudio se realizó entre el 1 de febrero y el 1 de abril de 2007 en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Se incluyeron en él los primeros 10 pacientes ingresados por NAC con diagnóstico previo de EPOC (grupo 1) y los primeros 10 pacientes ingresados con NAC pero sin diagnóstico de EPOC (grupo 2). El diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad se estableció cuando el paciente cumplía los siguientes criterios: aparición de un nuevo infiltrado en la radiografía de tórax más al menos 1 de los siguientes síntomas de infección del tracto respiratorio inferior: fiebre  $> 37,8^{\circ}\text{C}$ , tos, esputo, disnea, dolor pleurítico, leucocitosis y confusión mental<sup>5</sup>. Los pacientes con EPOC habían sido previamente diagnosticados de esta enfermedad en el Servicio de Medicina Interna de nuestro hospital de acuerdo a la "iniciativa global para los

criterios diagnósticos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica"<sup>6</sup>. El estudio se realizó bajo los criterios éticos de la Declaración de Helsinki. En todos los casos se solicitó al paciente un consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio. Además, se obtuvo la aprobación del comité de ética para la investigación clínica de nuestro hospital antes del comienzo del estudio.

**Diagnóstico microbiológico**

Se realizó la tinción de Gram a las muestras de esputo y de secreciones traqueales utilizando los medios habituales de cultivo (agar sangre, agar chocolate o agar McConkey). La identificación bacteriana se realizó por métodos estándar<sup>7</sup>.

**Medición de citocinas**

Al ingreso, se recogió una muestra de sangre en tubos EDTA-vacutainer. Los plasmas se obtuvieron tras centrifugación apropiada y fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que tuvo lugar la detección de las citocinas. Se midieron 9 citocinas en los plasmas utilizando un ensayo *multiplex* (Biorad, Hercules, CA, USA) sobre una plataforma *Luminex* (Austin, TX, USA). Los ensayos Bio-Plex para citocinas están basados en un formato de inmunoanálisis en sándwich. El anticuerpo específico de cada citocina es unido de forma covalente a esferas de poliestireno codificadas por color. Las bolitas con el anticuerpo unido se mezclan en una placa de 96 pocillos fenestrada en el fondo con la muestra que contiene una cantidad desconocida de citocina y, alternativamente, con una solución estándar que contiene una cantidad conocida de citocina. Después de realizar una serie de lavados mediante el uso de una bomba de vacío con el fin de desechar la proteína no unida, se procede a la adición de un anticuerpo biotinilado específico de un epítipo diferente de la citocina. La mezcla de reacción se detecta mediante la adición de estreptavidina-ficoeritrina, la cual se une a los anticuerpos biotinilados. El contenido de cada pocillo se adquiere en una plataforma *Luminex* usando el *software* de

Bio-Rad, el cual identifica y cuantifica cada reacción específica basada en el color de la bolita y la fluorescencia emitida. Las concentraciones desconocidas de citocinas se calculan por el *software* Bio-Plex Manager™, utilizando una curva estándar derivada de los estándares recombinantes que se sirven con el equipo. Los límites de detección (pg/ml) de la técnica para las 9 citocinas fueron los siguientes: interleucina (IL)-2 (1,5); IL-4 (0,32); IL-5 (3,48); IL-10 (3,28); IL12p70 (2,77); IL-13 (0,55); GM-CSF (0,55); interferón (IFN)- $\gamma$  (13,02); factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$  (3,8). A los valores por debajo del límite de detección se les asignó el límite de detección.

## Estadística

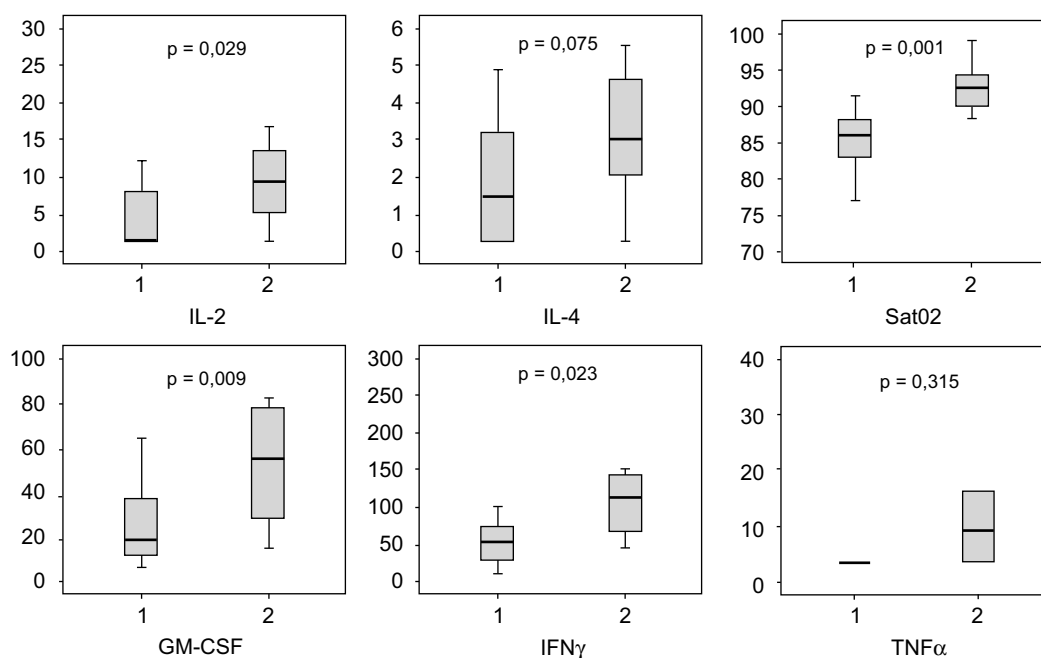
El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS 15.0 para Windows. Las diferencias en los valores de mediadores entre grupos se evaluaron utilizando el test de Mann-Whitney. Las asociaciones entre las concentraciones de citocinas y la saturación de oxígeno se estudiaron calculando el coeficiente de correlación de Spearman-Kärber. El nivel de significación se fijó en  $p = 0,05$ .

## Resultados y discusión

No se encontraron diferencias significativas en edad entre los 2 grupos (media [desviación típica]) (grupo 1: 72,3 [10,3]; grupo 2: 63,5 [16,9]). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la duración del período de hospitalización (grupo 1: 13,8 [5,6]; grupo 2: 10,7 [2,3]). Por el contrario, los pacientes del grupo 1 mostraron valores saturación de O<sub>2</sub> al ingreso significativamente menores (fig. 1). Se encontró un patógeno causal en el 50% de los pacientes del grupo 1 (1 caso de *Acinetobacter baumannii*,

1 caso de *S. pneumoniae*, 1 caso de *Staphylococcus aureus*, 1 caso de *Pseudomonas aeruginosa* y, finalmente, 1 caso de coinfección por *A. baumannii*+*P. aeruginosa*). En el caso del grupo 2, solamente se identificó un patógeno causal en 1 paciente (1 caso de *S. aureus*). Los valores de IL-5, IL-10, IL-12p70 e IL-13 estuvieron por debajo del límite de detección para cada una de estas citocinas y, por tanto, estos mediadores fueron excluidos de las comparaciones entre el grupo 1 y el grupo 2. Los valores de IL-2, GM-CSF e IFN- $\gamma$  fueron significativamente menores en los pacientes del grupo 1 (NAC con EPOC) que en los pacientes del grupo 2 (NAC sin EPOC). No se encontraron diferencias entre los 2 grupos en las concentraciones de IL-4 ni de TNF $\alpha$ . No se encontró correlación alguna entre los valores de las citocinas detectables y la saturación de O<sub>2</sub> de los pacientes, saturación medida al ingreso por pulsioximetría convencional.

Los resultados de este estudio apuntan a la existencia de respuestas deficientes a la infección en los enfermos que presentan NAC y EPOC. EL GM-CSF es un corregulador clave de la intensidad y persistencia de la señalización inflamatoria<sup>8</sup>. El GM-CSF prima a neutrófilos y monocitos, e induce la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Además, GM-CSF juega un papel central en la interconexión entre la inmunidad innata y la adquirida. Al igual que GM-CSF, el IFN- $\gamma$  es un contribuyente clave de la inmunidad adaptativa, especialmente de las respuestas T-helper<sup>9</sup>. Finalmente, la IL-2 juega un papel muy importante en la activación de los linfocitos T. La IL-2 estimula el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de los linfocitos T-citotóxicos seleccionados por el antígeno<sup>10</sup>. En consecuencia, los valores relativamente menores de IL-2, GM-CSF e IFN- $\gamma$  en pacientes con NAC y diagnóstico previo de EPOC respecto a los que no presentan EPOC, pudiera reflejar la existencia de problemas por parte de los primeros para



**Figura 1** Comparación de las concentraciones de citocinas en plasma (pg/ml) y de la saturación de O<sub>2</sub> (%) en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (grupo 1) y pacientes con NAC sin EPOC (grupo 2) al ingreso.

desencadenar la respuesta inmune secundaria, la cual contribuye de forma decisiva a superar la infección, mediante el desarrollo de la respuesta inmune celular y de anticuerpos. Esta respuesta deficiente puede también contribuir a explicar el incremento de la mortalidad observada previamente en los pacientes con NAC y EPOC. El reducido tamaño muestral de este estudio impide llegar a conclusiones definitivas, pero los resultados obtenidos inciden en la necesidad de realizar estudios con mayor número de pacientes que incluyan una evaluación más amplia del estado de inmunidad en los pacientes con EPOC, los cuales podrían ayudar a diseñar estrategias preventivas frente a las infecciones respiratorias en estos enfermos.

Nuestro trabajo demuestra finalmente la utilidad de las técnicas *multiplex* de detección simultánea de citocinas en el desarrollo de estudios de investigación clínica.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al equipo de enfermería del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valladolid su cooperación en la recogida de muestras de este estudio, la cual realizaron de la forma más cómoda posible para los pacientes.

## Bibliografía

1. Restrepo MI, Mortensen EM, Pugh JA, Anzueto A. COPD is associated with increased mortality in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2006;28:346–51.
2. Berenson CS, Wrona CT, Grove LJ, Maloney J, Garlipp MA, Wallace PK, et al. Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:31–40.
3. Yoshikawa T, Dent G, Ward J, Angco G, Nong G, Nomura N, et al. Impaired neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;75:473–9.
4. Takabatake N, Sata M, Abe S, Inoue S, Saito H, Yuki H, et al. Impaired systemic cell-mediated immunity and increased susceptibility to acute respiratory tract infections in patients with COPD. *Respir Med* 2005;99:485–92.
5. Manali E, Papadopoulos A, Tsiodras S, Polychronopoulos V, Giamarellou H, Kanellakopoulou K. The impact on community acquired pneumonia empirical therapy of diagnostic bronchoscopic techniques. *Scand J Infect Dis* 2007;4:1–7.
6. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1256–76.
7. Lennette ET, Bullocks A, Hansler WJ, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1985. p. 160–200.
8. Vlahos R, Bozinovski S, Hamilton JA, Anderson GP. Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). *Pharmacol Ther* 2006;112:106–15.
9. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:439–54.
10. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby; 1998. p. 121–37.