



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Cuantificación de citoquinas y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes con leucemia aguda y neutropenia febril post quimioterapia, en el Instituto Nacional de Cancerología-Empresa Social del Estado

Ana María Madera Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina. Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
2015

Cuantificación de citoquinas y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes con leucemia aguda y neutropenia febril post quimioterapia, en el Instituto Nacional de Cancerología-Empresa Social del Estado.

Ana María Madera Rojas

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Medicina Interna

Director (a):

Dra. Sonia Isabel Cuervo Maldonado

Grupo de Investigación:

GREICAH: Grupo de Investigación en enfermedades infecciosas en cáncer y alteraciones hematológicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina. Departamento de Medicina Interna

Bogotá, Colombia

2015

“Cáncer es una palabra, no una sentencia”

John Diamond

Agradecimientos

Especial gratitud con *Beckton Dickinson* TM por su colaboración al facilitarnos el producto comercial *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit* y por la asesoría técnico científica para la realización de este trabajo de investigación

Resumen

Objetivos: En pacientes con leucemia aguda y neutropenia febril, conocer el comportamiento de varias citoquinas y su relación con la presencia de bacteriemia.

Métodos: Se almacenaron muestras de plasma obtenidas al momento del diagnóstico de la neutropenia, al inicio de la fiebre y a las 24 y 48 horas posteriores, las cuales se conservaron a -70°C y luego se descongelaron para su procesamiento mediante citometría de flujo.

Resultados: No hubo ningún reporte de muerte al egreso. La tasa de hemocultivos positivos fue 25%. Las IL 10 y 6 mostraron mayor porcentaje de variación durante el momento de la fiebre comparando el grupo de bacteriémicos con el de no bacteriémicos. IL1 β , IL12p70 y TNF α arrojaron niveles séricos por debajo del límite de detección de la prueba.

Conclusiones: Las citoquinas podrían cumplir un papel promisorio en el seguimiento de los pacientes neutropénicos febriles, dada la potencial asociación con presencia de bacteriemia.

Palabras clave: citoquinas, neutropenia, fiebre, quimioterapia, leucemia aguda, bacteriemia.

Abstract

Objectives: In patients with acute leukemia and febrile neutropenia, recognize the behavior of various cytokines and their relationship to the presence of bacteremia. **Methods:** Plasma samples obtained at diagnosis of neutropenia, at the onset of fever and 24 and 48 hours later were stored. These were preserved at -70°C and then thawed for processing by flow cytometry. **Results:** There was no report of death at discharge. The rate of positive blood cultures was 25% similar to the reviewed literature. The IL 10 and IL 6 showed greater percentage change during the time of fever bacteremic group comparing with non bacteremic. IL 1β , IL12p70 and TNF α showed serum levels below the detection limit of the test. **Conclusions:** Cytokines may play a promising role in the monitoring of febrile neutropenic patients given the potential association with the presence of bacteremia.

Keywords: cytokines, neutropenia, fever, chemotherapy, leukemia acute, bacteremia.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XIII
Introducción	1
1. Planteamiento del problema y justificación	5
2. Objetivos	9
3. Marco teórico	11
4. Materiales y métodos	21
4.1 Diseño del estudio	19
4.2 Definición de sujetos a estudio	20
4.3 Plan de análisis	21
4.4 Descripción de las intervenciones	22
5. Resultados	29
6. Discusión	30
7. Conclusiones	35
A. Anexo: Manual de procedimientos	36
Bibliografía	50

XIV Cuantificación de citoquinas y su relación con la presencia de bacteriemia en leucemias agudas y neutropenia febril post quimioterapia

Lista de figuras

	Pág
Figura 1: Cinética de procalcitonina en las muestras estudiadas.....	32
Figura 2: Cinética de IL 8 en las muestras estudiadas.....	33
Figura 3: Cinética de IL 8 en las muestras estudiadas.....	33
Figura 4: Cinética de IL 10 en las muestras estudiadas.....	34

Lista de tablas

	Pág
Tabla 1: Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	29
Tabla 2: Aislamientos microbiológicos en hemocultivos.....	32
Tabla 3: Niveles séricos de procalcitonina (ng/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia	33
Tabla 4: Niveles séricos de IL6 (pg/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia.....	33
Tabla 5: Niveles séricos de IL8 (pg/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia.....	34
Tabla 5: Niveles séricos de IL10 (pg/mL) distribuidos en medianas según la presencia o no de bacteriemia	34

Introducción

Más del 80% de los pacientes con malignidades hematológicas presentan neutropenia febril durante la quimioterapia de inducción y pueden presentar más de un episodio durante los siguientes ciclos de quimioterapia¹, constituyéndose esta en un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones graves, las cuales generan una alta morbimortalidad, estancia y costos hospitalarios².

A pesar de que se conocen los factores que impactan en la susceptibilidad a la infección y que se han diseñado escalas de predicción de riesgo^{3,4}, es difícil discriminar entre infecciones severas y episodios febriles de bajo riesgo. La presencia de bacteriemia por gérmenes Gram negativos se ha relacionado con desenlaces clínicos adversos, a diferencia del subgrupo de pacientes en que no se documenta un foco infeccioso claro o el agente microbiológico causal, población en la cual la resolución de la fiebre suele ser más rápida y con menor tasa de complicaciones⁵. Dentro del grupo de pacientes con neoplasias hematológicas hospitalizados para recibir quimioterapia y que desarrollan neutropenia febril se han documentado episodios de bacteriemia entre el 20⁶ y el 43⁷ % de los casos con predominio de los aislamientos de bacterias Gram negativas con tasas de hasta el 60.3%^{7,8}.

Dadas las limitaciones en la evaluación clínica de estos pacientes, se ha tratado de acceder a biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de episodios de neutropenia febril de alto riesgo. El biomarcador ideal debería ser rápido, específico, costo-efectivo y que permita predecir de forma temprana la presencia de bacteriemia. Desde hace algunos años se han evaluado proteínas de fase aguda, citoquinas, moléculas de adhesión solubles y procalcitonina como marcadores que contribuyan a identificar infecciones fúngicas o bacterianas, sin embargo el número de estudios que incluyen pacientes neutropénicos en el contexto post quimioterapia es pequeño con resultados que difieren ampliamente⁹.

Los pacientes neutropénicos mantienen la liberación plasmática de citoquinas independiente del conteo de leucocitos⁶ y se ha propuesto que gérmenes Gram positivos y Gram negativos provocan diferentes patrones de concentraciones séricas de citoquinas. Para investigar en qué medida los perfiles de citoquinas varían en respuesta a diferentes gérmenes se han diseñado estudios con ELISA y con Citometría de Flujo en modelos animales y en monocitos humanos¹⁰. La inducción más pronunciada en niveles séricos con Gram negativos se ha observado con IL 6, citoquina que en el contexto de neoplasias hematológicas y neutropenia febril también ha mostrado la mayor asociación con bacteriemia (92% de sensibilidad)^{7,11}. Los resultados con otras citoquinas del perfil TH1 en relación con la presencia de bacteriemia han mostrado asociación también con IL8 (87% de sensibilidad)¹², IL 10 (71% de sensibilidad)¹³ y TNF α ¹⁴ (89% de sensibilidad), mientras que para IL 1 e IL 12 no se han documentado reportes de sensibilidad para detección de bacteriemia en estudios clínicos.

En cuanto al tipo de técnica para su medición, las ventajas que suponen las técnicas de matrices múltiples como la Citometría de Flujo sobre el ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) incluyen alto rendimiento, necesidad de menor volumen de muestra, eficiencia en términos de tiempo y costo y principalmente la capacidad de medir múltiples citoquinas con una alícuota de muestra dada, factor que influyó principalmente en escoger este método¹⁵.

Con el interés de conocer el comportamiento de varias citoquinas en un grupo de pacientes neutropénicos febriles con leucemias agudas en el Instituto Nacional de Cancerología, se plantea realizar la medición de las mismas a través de la técnica de citometría de flujo e identificar su potencial relación con el desarrollo de bacteriemia. Dado que aún no existe un modelo *in vivo* que logre describir su cinética en este escenario clínico, se propone realizar la medición de interleuquinas 1 β , 6, 8, 10, 12p70 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) al inicio de la neutropenia, en el momento de aparición de la fiebre y a las 24 y 48 horas posteriores y compararlas con la cinética de procalcitonina medida en un estudio previo.

1. Planteamiento del problema y justificación

En pacientes con neoplasias hematológicas, la infección relacionada al empleo de quimioterapia genera una alta morbimortalidad, estancia y costos hospitalarios². La neutropenia derivada del tratamiento definida como un conteo absoluto de neutrófilos menor de 500 células/mm³ es un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones graves. La susceptibilidad a la infección está determinada por la enfermedad maligna de base, la potencia de la quimioterapia, factores ambientales y del hospedero (estado nutricional, comorbilidades, medidas de protección) y variaciones genéticamente determinadas del sistema inmune¹⁶. Es bien conocido en las últimas cuatro décadas la relación lineal entre el grado de neutropenia y el mayor riesgo de infección bacteriana y fúngica⁴.

Los factores anteriormente mencionados se han empleado en la práctica clínica como herramientas para definir la vía de terapia antibiótica, el sitio de manejo y el tiempo del tratamiento mediante escalas de predicción de riesgo¹⁷. Sin embargo es difícil discriminar entre infecciones severas y episodios febriles de bajo riesgo. La presencia de bacteriemia por gérmenes Gram negativos e infiltrados pulmonares se ha relacionado con desenlaces clínicos adversos, a diferencia del subgrupo de pacientes en que no se documenta un foco infeccioso claro o el agente microbiológico causal, población en la cual la resolución de la fiebre suele ser más rápida y con menor tasa de complicaciones⁶. Dentro del grupo de pacientes con neoplasias hematológicas hospitalizados para recibir quimioterapia y que desarrollan neutropenia febril se han documentado episodios de bacteriemia entre el 20¹⁸ y el 43¹⁹ % de los casos con predominio de los aislamientos de bacterias Gram negativas con tasas de hasta el 60.3%^{19,20}

Por estas razones es imperativo acceder a marcadores rápidos, específicos y costo-efectivos que permitan predecir de forma temprana la presencia de bacteriemia en pacientes hospitalizados con neutropenia febril post quimioterapia. Es necesario que estos marcadores sean liberados independientemente del conteo de leucocitos y de la actividad de la enfermedad de base y reflejen la severidad de la infección subyacente.

Desde hace algunos años se han estado evaluando proteínas de fase aguda, citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión solubles y procalcitonina como marcadores que contribuyan a identificar infecciones fúngicas o bacterianas, sin embargo el número de estudios que incluyen pacientes neutropénicos en el contexto intrahospitalario post quimioterapia es pequeño y el valor predictivo es bajo como para influir en decisiones clínicas. Asimismo, los resultados difieren ampliamente entre los estudios⁷. Los

marcadores encontrados en la literatura incluyen: procalcitonina, proteína C reactiva, amiloide sérico A, interleuquinas 6, 8 y 10, $TNF\alpha$, dos receptores solubles del $TNF\alpha$ (sTNF-R I y sTNF-R II), la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1, neopterin, proteína inflamatoria de macrófagos 1α y eotaxina ⁷. Sin embargo, los marcadores que han mostrado mayor rendimiento en la identificación temprana de pacientes con alto riesgo de bacteriemia son procalcitonina e interleuquinas IL 6 y 8 (IL 6 e IL8). Los resultados con PCR (Proteína C Reactiva) han resultado contradictorios, con tendencia a mostrar un menor rendimiento ⁹.

Pocos estudios han comparado procalcitonina con IL 6 y 8, aunque los datos disponibles a la fecha concluyen en general que ninguno de los marcadores resulta ser superior en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo o valor predictivo positivo, no obstante existen algunos datos acerca de una mayor rapidez en la detección de bacteriemia por gérmenes diferentes a *Estafilococos Coagulasa Negativos* ⁸ y mejor precisión en detectar bacteriemias por Gram negativos con IL 6 e IL 8 ¹⁰.

En el contexto de neutropenia febril el inicio de terapia antibiótica está claramente indicado aun sin evidencia clínica o microbiológica de un proceso infeccioso y si bien la medición de marcadores indirectos de infección no influirá en la decisión de iniciar terapia antibiótica si se podrían convertir para el clínico en una herramienta útil para definir tiempo de la terapia en situaciones clínicas determinadas como es la fiebre de origen desconocido, con impacto en estancia hospitalaria, resistencia antimicrobiana, calidad de vida y costos.

Teniendo en cuenta los pocos datos que se encuentran en la literatura internacional y la ausencia de información en nuestro medio se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la utilidad de la medición de interleuquinas 1β , 6, 8, 10, 12, $TNF\alpha$ para predecir la presencia de bacteriemia en pacientes con leucemia aguda y neutropenia febril post quimioterapia, en el Instituto Nacional de Cancerología-Empresa Social del Estado?

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la posible asociación entre el cambio en los niveles de citoquinas y la documentación de bacteriemia en pacientes con neutropenia febril de alto riesgo en el Instituto Nacional de Cancerología en un año.

2.2 Objetivo específico

- Describir los niveles de interleuquinas 1 β , 6, 8, 10, 12 y factor de necrosis tumoral (TNF α) en pacientes adultos con leucemia aguda y neutropenia febril post quimioterapia al momento del diagnóstico de la neutropenia, al momento del inicio de la fiebre y a las 24 horas y 48 horas posteriores.

3.Marco Teórico

Han pasado cuatro décadas desde que Bodey y colaboradores reconocieron por primera vez la relación entre el grado de neutropenia y el riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas al realizar una descripción detallada de las complicaciones infecciosas en 52 pacientes tratados con citotóxicos para el tratamiento contra la leucemia aguda. Ellos hicieron la observación que de acuerdo a la disminución de los granulocitos, la frecuencia, la duración y gravedad de las infecciones aumentaban dramáticamente. Esto fue especialmente marcado cuando el recuento de neutrófilos cayó por debajo de 500 células / mm³ ²¹. Ahora está claro que los principales factores están determinados por la enfermedad subyacente y la potencia de la quimioterapia.

Más del 80% de los pacientes con malignidades hematológicas presentan neutropenia febril durante la quimioterapia de inducción y pueden presentar más de un episodio de neutropenia febril durante los siguientes ciclos de quimioterapia ²²

En pacientes con cáncer la morbilidad y la mortalidad por complicaciones infecciosas después de quimioterapia agresiva y potencialmente curativa sigue siendo un problema clínico importante en la actualidad. Discriminar entre las infecciones graves y los episodios de febriles de bajo riesgo en pacientes febriles con neutropenia es difícil pues debido a la misma neutropenia los signos clínicos y radiológicos de infecciones bacterianas pueden no estar presentes ²³.

Los pacientes con bacteriemia por gérmenes Gram negativos o con infiltrados pulmonares, presentan una significativa morbilidad y en estos subgrupos los desenlaces clínicos suelen ser desalentadores. Por el contrario, los pacientes sin foco clínico documentado de infección y sin aislamiento microbiológico de germen causal por lo general tienen una duración más corta de la fiebre y menor riesgo de desarrollar complicaciones clínicas significativas ²⁴

En la mayoría de los episodios de neutropenia febril los agentes infecciosos causales no pueden ser identificados. Rintala y colaboradores evaluaron las características de 554 episodios febriles en 126 pacientes con cáncer hematológico durante un período de 6 años (1985-1990) con el fin de estudiar la incidencia y la importancia clínica de la positividad de los hemocultivos. La infección fue documentada microbiológicamente en 28 % y clínicamente en 30 % de los episodios. Los hemocultivos fueron positivos en el 19% de los episodios febriles. La muerte por sepsis ocurrió en el 23% de los episodios febriles con hemocultivo positivo, con una mediana de supervivencia de dos días. Por lo tanto, la pequeña proporción de episodios febriles cuya etiología puede ser establecida por hemocultivo representa ' la punta del iceberg ', es decir, representan infecciones rápidamente letales con una alta tasa de mortalidad ²⁴

Un estudio más reciente ¹⁹ evidencia aislamientos microbiológicos en hemocultivos en el 43% de los episodios de neutropenia febril en 116 pacientes hospitalizados para administración de quimioterapia aplasante en el servicio de hematología en un centro médico en Malasia estudiados de forma retrospectiva entre enero de 2004 y enero de 2005.

En el mismo contexto de infecciones bacterianas nosocomiales en pacientes neutropénicos febriles, otro estudio retrospectivo entre septiembre de 2007 y septiembre de 2009 ²⁵ analizó los resultados de cultivos obtenidos en 95 pacientes neutropénicos con fiebre, la cual se presentó después de 48 horas del ingreso al hospital o a menos de una semana del egreso hospitalario, encontrando que un 63% de los pacientes tenían hemocultivos positivos, con 43% de aislamientos de gérmenes Gram negativos, 29,8% de Gram positivos, 3,2% fueron polimicrobianos y solo un hemocultivo documentó hongos. El microorganismo más observado fue *Escherichia coli* (27,7%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (16%), *Acinetobacter baumannii* (10,5%), *Klebsiella pneumoniae* (8%), estafilococo coagulasa positivos (8%) y estafilococos coagulasa negativos (8%).

Estos datos nos permiten concluir que la tasa de aislamiento microbiológico del germen o gérmenes causales en neutropenia febril postquimioterapia ha aumentado en los últimos

años producto del perfeccionamiento de las técnicas de laboratorio microbiológico, sin embargo algunos factores tales como el momento de la toma de los hemocultivos o el uso previo de antibióticos podrían afectar este rendimiento.

El valor de las citoquinas proinflamatorias, así como de la procalcitonina y la PCR ha sido bien establecido en el diagnóstico y evaluación de infección bacteriana en pacientes neutropénicos. Recientes estudios con pacientes inmunocomprometidos con neutropenia febril han demostrado que estos pacientes también son capaces de producir niveles plasmáticos elevados de citoquinas proinflamatorias, así como de procalcitonina y PCR^{26,27,28}

Estos estudios también han documentado que el aumento en los niveles de PCR se correlaciona con las infecciones bacterianas en pacientes leucémicos y que los niveles de PCR son significativamente mayores si los hemocultivos son positivos. Ha sido difícil identificar los puntos de corte con un alto poder predictivo que discrimine subgrupos de pacientes de interés^{26,27,28}

La procalcitonina, una proteína precursora de la calcitonina humana, ha sido señalada como un marcador específico y sensible de infección bacteriana severa en pacientes inmunocomprometidos^{29,30} La cinética de la procalcitonina después de la aparición de una reacción inflamatoria sistémica es similar a la de la PCR. La vida media es aproximadamente 20 horas y las concentraciones pico se alcanzan entre las 24 y 48 horas después de un estímulo inflamatorio^{30,31}

En la literatura hay pocos informes de la fiabilidad de la procalcitonina como marcador para la discriminación de la gravedad de una infección en los pacientes neutropénicos febriles. En un estudio la procalcitonina se analizó de forma temprana después de la aparición de la fiebre y el inicio del tratamiento antimicrobiano. En 28 casos de neutropenia febril los autores calcularon la sensibilidad para la detección de bacteriemia o infección clínica a 55 % y la especificidad de 88 % con un nivel del PCT de 0,5 ng / ml³² Otro estudio incluyó 33 casos de bacteriemia, donde se observaron los niveles más

altos de procalcitonina durante el primer día, en episodios de bacteriemias por gérmenes Gram negativos en comparación con los otros cuadros clínicos³³. Para la predicción de bacteriemia por gramnegativos los autores calcularon una sensibilidad del 57 %, una especificidad del 94 % y VPN de 92 % en el caso de la procalcitonina a un nivel de 1,1 ng / ml.

Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, secretadas durante las respuestas inmunes natural y específica. Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada intracelular de transducción de señales que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica. Debido a los correspondientes ARNm que inducen, estas tienen una vida media corta, su producción suele ser transitoria y limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo.

Los niveles reportados de citoquinas circulantes pueden verse afectados por los protocolos en la recolección de las muestras, tales como la manipulación, el procesamiento y almacenamiento de las mismas e incluso por comportamientos de los pacientes antes de la recolección. Variables como la hora del día en que se obtiene la muestra, el estado de alimentación, el estrés agudo, el método de almacenamiento, su duración y la elección del anticoagulante pueden influir en los niveles reportados de citoquinas circulantes³⁴

Se recomienda la estandarización de los procedimientos de toma de muestras de sangre y el almacenamiento del plasma para reducir las variaciones inter ensayo. Para obtener las muestras de plasma, la sangre entera debe recogerse en tubos estériles con anticoagulantes, colocarse inmediatamente en hielo y ser centrifugada lo antes posible, preferiblemente dentro de treinta minutos. Muchas citoquinas tienen una vida muy corta y comienzan a degradarse, por tanto, deben mantenerse pequeñas alícuotas, evitando la congelación-descongelación repetida^{35.36}.

La hora del día en que se toman las muestras de sangre debe estar sincronizada, idealmente en la mañana pues se puede atenuar la influencia de los patrones circadianos. Ciertas citoquinas, en particular los que están afectados por los glucocorticoides, pueden exhibir variaciones diurnas que son altamente predecibles. El interferón gamma (IFN-gamma), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleuquina 1 (IL-1) y la IL-12 presentan picos en la mañana y guardan relación inversa con el ritmo de cortisol plasmático³⁷

Algunas mediciones pueden verse afectadas por la alimentación. Por ejemplo, los niveles circulantes de proteína C-reactiva (PCR), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) e IL-6 se elevan después de la ingesta de un alto contenido de grasa, mientras que los niveles de TNF-alfa disminuyen. Este efecto postprandial se relaciona probablemente con la respuesta de la insulina a la hiperglucemia aguda ³⁸

El suero y el plasma no son equivalentes. El plasma conservado en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) ha demostrado que produce los resultados más consistentes para muchas citoquinas, mientras que el citrato de sodio puede disminuir los niveles de algunas citoquinas (IL-6 y TNF- α). Las muestras deben recogerse en tubos estériles, refrigerados y ser procesados rápidamente para mantener la estabilidad de citoquinas.

Los niveles de IL-6 disminuyen en muestras de sangre entera a temperatura ambiente (significativa después de 4 horas). Por el contrario, los niveles de TNF α aumentaron en condiciones similares. Por lo tanto, el plasma o suero deben separarse de las células de sangre de forma rápida para evitar la degradación o absorción. Las muestras deben mantenerse refrigeradas hasta su procesamiento, ya que se han encontrado diferencias en mediciones de citoquinas entre los que se mantienen a temperatura ambiente y -4° C. Las muestras se deben congelar a -70° C hasta el ensayo y se deben evitar ciclos múltiples de congelación-descongelación. La mayoría de las citoquinas son estables hasta por dos años de almacenamiento a esta temperatura ³⁶.

En cuanto al tipo de técnica, el rendimiento del ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) es altamente dependiente de la calidad de los anticuerpos, el fabricante del kit, así como la habilidad y la experiencia del operador. El ELISA permite la medición de una sola citoquina a la vez en una alícuota de muestra dada, lo que se convierte en limitante para medir mayor número de moléculas inflamatorias, sobre todo cuando están disponibles cantidades limitadas de material biológico, mientras que las técnicas de matrices múltiples (citometría de flujo, quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia con citometría de flujo) permiten la medición de hasta de 25 citocinas ³⁹.

Las ventajas de la citometría de flujo sobre la técnica de ELISA incluyen: alto rendimiento, menos volumen de muestra necesario, eficiencia en términos de tiempo y costo, capacidad para evaluar los niveles de una molécula inflamatoria en múltiples

contextos y detectar con fiabilidad diferentes proteínas a través de un amplio rango de concentraciones. Sin embargo, el grado de correlación entre ambos métodos es bueno⁴⁰.

En cuanto a la cinética de las citoquinas, se ha propuesto que gérmenes Gram positivos y Gram negativos provocan diferentes patrones de concentraciones plasmáticas. Para investigar en qué medida los perfiles de citoquinas son similares en diferentes enfermedades bacterianas se han diseñado estudios con ELISA y con citometría de flujo para cuantificar los niveles plasmáticos de diversas citoquinas en modelos animales y en monocitos humanos con respuesta a gérmenes diferentes. En ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni* la diferencia más pronunciada en la inducción de citoquinas se observó con la IL 6, citoquina que ha mostrado la mayor asociación con bacteriemia por Gram negativos⁴¹. Los diferentes patrones de citoquinas se han atribuido a las características en la estructura celular bacteriana, sin embargo aún no existe un modelo *in vivo* que logre describir el comportamiento de las citoquinas en bacteriemias, en parte debido a la gran variabilidad inter e intra individuo y los factores relacionados a la recolección y procesamiento de las muestras anteriormente mencionados.

Específicamente en el contexto de neutropenia febril post quimioterapia, un estudio prospectivo con pacientes hospitalizados, compara diversos métodos (procalcitonina, PCR y citoquinas: IL 6 e IL 8)³³ mostró una especificidad de 80% con un valor predictivo negativo de 85% en los pacientes neutropénicos febriles sin bacteriemia. Encontró que ninguno de los marcadores analizados fue superior en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para bacteriemia. Sin embargo, la IL-6 e IL-8 permitieron una detección más precoz de procesos infecciosos severos (10 horas) comparadas con procalcitonina y PCR.

18 Cuantificación de citoquinas y su relación con la presencia de bacteriemia en leucemias agudas y neutropenia febril post quimioterapia

4. Materiales y métodos

4.1 Diseño del estudio:

Estudio descriptivo, prospectivo, sujeto a las normas de buenas prácticas en investigación clínica, en el que se midieron los niveles séricos de interleuquinas 1 β , 6, 8, 10, 12 y factor de necrosis tumoral (TNF α) en pacientes con leucemia aguda y neutropenia de alto riesgo posquimioterapia hospitalizados en el servicio de hematología del Instituto Nacional de Cancerología en Bogotá, antes y durante un episodio de neutropenia febril, con el fin de evaluar la relación entre las concentraciones de interleuquinas 1 β , 6, 8, 10, 12 y factor de necrosis tumoral (TNF α) y la documentación de bacteriemia.

4.2. Hipótesis operativas:

4.2.1 Hipótesis alterna: En los pacientes adultos con leucemia aguda y neutropenia febril post quimioterapia de alto riesgo, los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias se relacionan con la presencia de bacteriemia

4.2.2 Hipótesis nula: En los pacientes adultos con leucemia aguda y neutropenia febril postquimioterapia de alto riesgo los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias no se relacionan con la presencia de bacteriemia

4.3. Definición de sujetos de estudio: Se analizaron 44 episodios de neutropenia febril ocurridos en 35 pacientes mayores de 18 años con leucemia aguda, hospitalizados en el Instituto Nacional de Cancerología entre mayo de 2013 y mayo de 2014 durante la ejecución del proyecto de investigación INC-C41030610-410 "*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto*

Nacional de Cancerología” . De estos pacientes, se almacenaron muestras de plasma obtenidas al momento del diagnóstico de la neutropenia, al inicio de la fiebre y a las 24 horas y 48 horas posteriores. Se obtuvieron entre 2-3 ml de plasma de cada muestra de sangre y se almacenaron a -70 ° C para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Todas las muestras incluídas contaron con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes que ingresaron al proyecto de investigación en mención¹, en relación con la aceptación voluntaria para donar las muestras de plasma para uso futuro.

4.3.1 Criterios de inclusión

- Este estudio incluye las muestras de suero tomadas en el proyecto de investigación INC-C41030610-410 “*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*” y que tengan consentimiento informado firmado para uso futuro.
- Todos los pacientes hombres y mujeres mayores de 18 años con leucemia aguda hospitalizados para aplicación de poliquimioterapia aplasante y neutropenia de alto riesgo, definida como neutropenia esperada por más de 7 días, conteo absoluto de neutrófilos inferior a 500/uL, comorbilidades significativas, dolor abdominal, neumonía, hipotensión o cambios neurológicos, hospitalizados en el servicio de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E.

4.3.2 Criterios de exclusión

Se tuvieron en cuenta los criterios de exclusión del proyecto de investigación INC-C41030610-410 “*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*”:

- Pacientes con neutropenia febril no relacionada a quimioterapia.
- Pacientes que ingresaron remitidos de otra institución.
- Pacientes con infección por VIH/SIDA.
- Pacientes que por sus comorbilidades o refractariedad al tratamiento, o por otras razones, el servicio tratante contraindique tratamiento activo de su neoplasia.
- Pacientes gestantes.

- Pacientes con enfermedad renal avanzada con depuración calculada de creatinina inferior a 30 mL/min
- Pacientes con procesos infecciosos diagnosticados por clínica o por el laboratorio al momento de la toma de la primera muestra de suero
- Pacientes que estén recibiendo antibioticoterapia por más de 24 horas previas al inicio de la neutropenia febril

Plan de análisis

Se utilizó la base de datos del proyecto de investigación INC-C41030610-410 “*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*” con las características clínicas y paraclínicas de los pacientes incluidos y objeto de este estudio. Para el componente descriptivo se utilizaron medianas junto con sus correspondientes medidas de dispersión (desviación estándar o rango intercuartílico dependiendo de las características de las variables continuas). En el caso de variables discretas la descripción se efectuó utilizando proporciones y porcentajes. Para el caso de los análisis de asociación, y teniendo en cuenta la eventual no independencia, se utilizaron métodos de regresión logística condicional. Para las pruebas de hipótesis de los coeficientes de regresión se utilizarán valores de significación del 5%. Los análisis estadísticos se efectuarán con el programa STATA 11.

4.4. Descripción de las intervenciones

4.4.1 Descripción de la técnica: La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz.

El principio en el que se basa esta tecnología es hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una, por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se

transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora ⁴².

4.4.2 Materiales:

1. *Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences™ Cytometric Bead Array: CBA)*
2. Citómetro de flujo *BD FACS Canto II*.

4.5. Procedimientos

4.5.1 Evaluación de los criterios de inclusión y de exclusión

Los pacientes incluidos en el estudio INC-C41030610-410 “*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*” fueron evaluados por los investigadores y la coordinadora de investigación del mencionado estudio, quienes revisaron el cumplimiento de los criterios de inclusión y de exclusión. Éste estudio adicionalmente contó con monitoría por parte del Instituto Nacional de Cancerología quienes verificaron que éste se desarrollara de acuerdo a las normas de buenas prácticas clínicas en investigación.

4.5.2 Explicación sobre el estudio y obtención del consentimiento informado por escrito

Los consentimientos informados del grupo de pacientes incluidos en INC-C41030610-410 “*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*” fueron obtenidos por la coordinadora de investigación del mencionado estudio, explicando a los pacientes todos los interrogantes respecto al mismo y la posibilidad de ser incluidos en estudios posteriores. Sólo se tuvieron en cuenta las muestras de aquellos pacientes que firmaron consentimiento para uso futuro de las muestras de suero que se encontraban en el congelador *Revco® Ultima Plus* del Banco Nacional de Tumores Terry Fox del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E.

4.5.3 Identificación y procesamiento de las muestras

Se obtuvieron las muestras congeladas a -70°C de los pacientes del estudio INC-C41030610-410 “Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología” las cuales se encuentran en el Revco® del Banco Nacional de Tumores Terry Fox del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E.

Al recibirse las muestras se asignó un número consecutivo a cada tubo para su correcta identificación con el número del episodio de neutropenia acompañado de las iniciales del paciente y la fracción correspondiente, según fuera tomada al momento de diagnóstico de la neutropenia, al momento de la fiebre y a las 24 y 48 horas siguientes.

El procesamiento de muestras mediante citometría de flujo incluyó las siguientes fases:

- Preparación: Visualización del experimento en un análisis previo (pre-citometría) mediante la adecuación de las condiciones de la muestra y del citómetro. Selección de parámetros a medir y reactivos necesarios. Diseño de Protocolos de preparación. Selección de fluorocromos.
- Descongelación de los sueros en baño de María a 37°C por 5 minutos.
- Citometría de Flujo: Procesamiento de las muestras en un citómetro de flujo. Medición de los parámetros seleccionados en la fase de preparación.

Los niveles de citoquinas se obtuvieron de los resultados arrojados por la matriz *Software Matriz FCAP*, propiedad de *BD™*.

Los niveles séricos normales descritos para las citoquinas a estudiar corresponden a:

- IL 1 β : (Indetectable a 5 pg/mL)⁴³
- IL 6: (Indetectable a 4.30 pg/mL)⁴⁴
- IL 10: (Indetectable a 13.68 pg/mL)⁴⁴
- IL 8: 12.35 ± 7.0 pg/mL⁴⁵
- TNF α 6.11 ± 3.3 pg/mL⁴⁵
- IL 12p70 (Subunidad biológicamente activa): Indetectable en sueros de sujetos sanos⁴⁶

En el anexo A se describe el manual de procedimientos implementado en el desarrollo del trabajo de investigación.

4.5.4 Recolección de datos:

Los datos de las variables establecidas se obtendrán de la base de datos construida para el proyecto de investigación "*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*", el cual fue aprobado y revisado por el Grupo de Monitoría Clínica y la copia de esta base de datos se encuentra en el computador de la Oficina de Infectología, en el INC-E.S.E.

4.5.5 Evaluación del estado funcional según la escala de ECOG

El investigador y el auxiliar de investigación, debidamente cualificado(a), evaluó el estado funcional del sujeto seleccionado para participar en el estudio INC-C41030610-410 mediante la escala de ECOG que se encuentra anotado en la historia de ingreso del paciente.

4.5.6. Comprobación de la enfermedad neoplásica de base y de la neutropenia febril

Los investigadores del estudio INC-C41030610-410 "*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*" con conocimiento acerca de la enfermedad hematológica de base y de la condición de la neutropenia febril de los pacientes, construyeron la base de datos a utilizar en el presente estudio. Esta información obtuvo de la historia clínica del sujeto seleccionado a través del sistema SAP (Software de Sistema, Aplicaciones y Productos a nivel empresarial utilizado actualmente en el Instituto Nacional de Cancerología como apoyo en el manejo de la información).

4.5.7 Repaso de los antecedentes

Se tomaron los datos de historia clínica consignados en el sistema SAP (Software de Sistema, Aplicaciones y Productos a nivel empresarial utilizado actualmente en el Instituto Nacional de Cancerología como apoyo en el manejo de la información).

4.5.8 Registro de los medicamentos concomitantes

Se revisó en el sistema SAP la formulación de los medicamentos que adicionalmente se administraron al paciente.

4.5.9. Registro de talla, peso corporal, conteo absoluto de neutrófilos, creatinina, ECOG.

Estos datos se tomaron del sistema SAP y se registraron en el formulario.

Definiciones:

Para este estudio se usaron las definiciones propuesta por la *Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, IDSA* por sus siglas en inglés⁴⁷:

Fiebre: Se definió como una medida única oral de temperatura $\geq 38,3$ ° C (101 °F) o una temperatura de $\geq 38,0$ ° C (100,4 °F) sostenida durante un periodo de 1 hora. El uso de la temperatura oral registrada mediante termómetro de mercurio fue la tomada como referencia de acuerdo a protocolos Institucionales de enfermería para la toma de signos vitales y el protocolo institucional de neutropenia febril en el Instituto Nacional de Cancerología. Mediciones de la temperatura rectal (y exámenes rectales) se evitan durante la neutropenia para prevenir la colonización de organismos intestinales entren en la mucosa circundante y los tejidos blandos.

Neutropenia: Se definió como un CAN (conteo absoluto de neutrófilos) de <500 células/mm³ o un CAN que se espera que disminuya a <500 células / mm³ durante las próximas 48 horas.

Neutropenia febril: se definió como aquel paciente con neutropenia que presentó una temperatura aislada oral mayor o igual a 38,3°C, o de 38°C que se mantuvo por lo menos durante una (1) hora, asociado a neutropenia tal y como fue definida arriba.

Bacteriemia: Aislamiento de bacterias cultivables en el torrente sanguíneo que nunca son contaminantes entre los cuales se encuentran las enterobacterias, bacterias Gram negativas no fermentadoras y cocos Gram positivos como *S aureus*, *S pneumoniae*, *S pyogenes*, *S agalactiae* y *Streptococcus* del grupo B y C.

5. Resultados

Se analizaron 44 episodios de neutropenia febril en 35 pacientes de los cuales 65.8 % correspondieron a mujeres, con una mediana de edad de 36 años. Las características clínicas de los pacientes se describen en la *Tabla 1*.

Tabla 1 Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

Característica	n (44 episodios de neutropenia-35 pacientes)
Edad	
Mediana	36
Rango	18-56
Sexo n° (%)	
- Masculino	12 (34,2%)
- Femenino	23 (65,8%)
Diagnóstico oncológico n° (%)	
- Leucemia mieloide aguda	22 (62,8)
- Leucemia linfoide aguda	12 (34,2)
- Leucemia promielocítica aguda:	1 (2,8)
+G-CSF (%)	
- Si	37 (84%)
- No	7 (6%)
Estado de la leucemia n° (%)	
- De novo	8 (18,8)
- Recaída	13 (29,5)
- Remisión	17 (38,6)
- Refractaria	6 (13,6)
Ciclo de quimioterapia n° (%)	
- Consolidación	17 (38,6)
- Inducción	

- Reinducción	8 (18,8)
- Rescate	6 (13,6)
	13 (29,5)
Quimioterapia recibida n° (%)	
- Hypercvad: 17 (38,6)	17 (38,6)
- Hidac: 10 (2,72)	10 (2,72)
- IDA-Flag: 5 (1,1)	5 (1,1)
- 7x3: 4 (0,9)	4 (0,9)
- 5x3: 3 (0,68)	3 (0,68)
- POMP: 1 (0,22)	1 (0,22)
- PETHEMA: 1 (0,22)	1 (0,22)
- AME: 1 (0,22)	1 (0,22)
- CALBG: 1 (0,22)	1 (0,22)
- Larson+Dasatinib: 1 (0,22)	1 (0,22)
	1 (0,22)
Días de estancia hospitalaria (mediana)	27
Catéter venoso central n° (%)	12 (27,2%)
Estado funcional: ECOG al ingreso (mediana)	1
Días entre la neutropenia y la fiebre (mediana)	3
Duración de la neutropenia en días (mediana)	15
Diabetes n° (%)	1 (0,22)
HTA n° (%)	3 (0,68)
Cirrosis y falla renal n° (%)	0
Egreso n° (%)	
Vivo	35 (100)
Fallecido	0

[†]G-SCF: Factor estimulante de colonias de granulocitos humanos

Se documentaron 13 casos de bacteriemias, representando 25% de positividad de los hemocultivos. De estos aislamientos, 9 correspondieron a gérmenes gram negativos. Los aislamientos microbiológicos de los hemocultivos se reportan en la *tabla 2*.

Tabla 2 Aislamientos microbiológicos en hemocultivos

Categoría	nº	Gérmenes
Bacteriemias por gérmenes Gram positivos	4	<i>S. saprophyticus</i> – <i>S. aureus</i>
		<i>S. epidermidis</i> - <i>S. aureus</i>
		<i>Streptococcus constelatus</i>
		<i>Micrococcus luteus</i>
Bacteriemias por gérmenes Gram negativos	9	<i>E. coli</i>
		<i>K. pneumoniae</i>
		<i>E. coli</i>
		<i>E. coli</i>
		<i>K. pneumoniae</i>
		<i>Moraxella catarrhalis</i>
		<i>E. coli</i> , <i>K pneumoniae</i>
		<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
		<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>

Los niveles de procalcitonina, así como los de algunas citoquinas, específicamente IL 6, IL 8 e IL 10, mostraron diferencias en su cinética en relación con la presencia o no de bacteriemia. Los resultados se establecieron mediante medianas y rangos intercuartílicos calculados para las cuatro muestras, correspondientes al momento de diagnóstico de la neutropenia, el momento de aparición de la fiebre y las 24 y 48 horas posteriores. IL 1, IL12p70 y TNF α reflejaron niveles séricos indetectables para los estándares de la prueba, razón por la cual no se presentan sus resultados. Las *figuras 1 a 4* esquematizan los datos mencionados

Figura 1: Cinética de procalcitonina en las muestras estudiadas

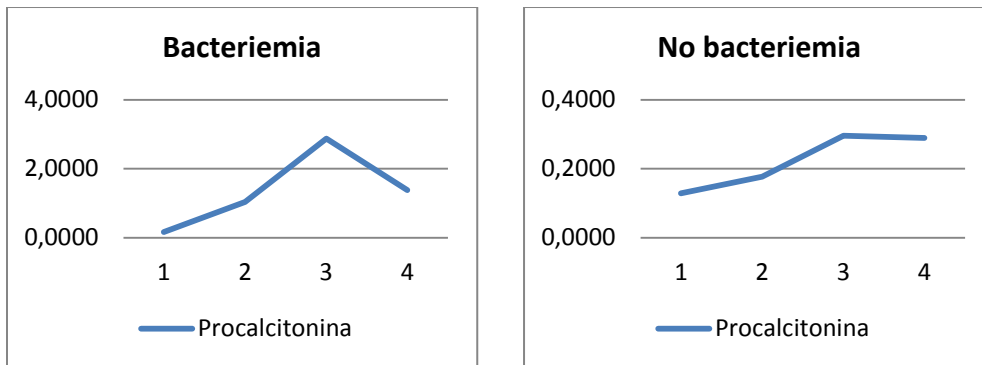


Tabla 3 Niveles séricos de procalcitonina (ng/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia

Bacteriémicos n=13	Procal-1	Procal-2	Procal-3	Procal-4
Mediana	0,16	1,04	2,87	1,38
RIQ	0,151	12,315	8,92	4,00
IC 85%	0,08 - 1,07	0,10 - 45,29	0,24 - 20,82	0,15 - 10,88
No bacteriémicos n=31	Procal-1	Procal-2	Procal-3	Procal-4
Mediana	0,13	0,18	0,30	0,29
RIQ	0,129	0,334	0,633	0,810
IC 85%	0,051 - 0,308	0,065 - 2,121	0,066 - 3,199	0,066 - 3,155

Figura 2: Cinética de IL6 en las muestras estudiadas

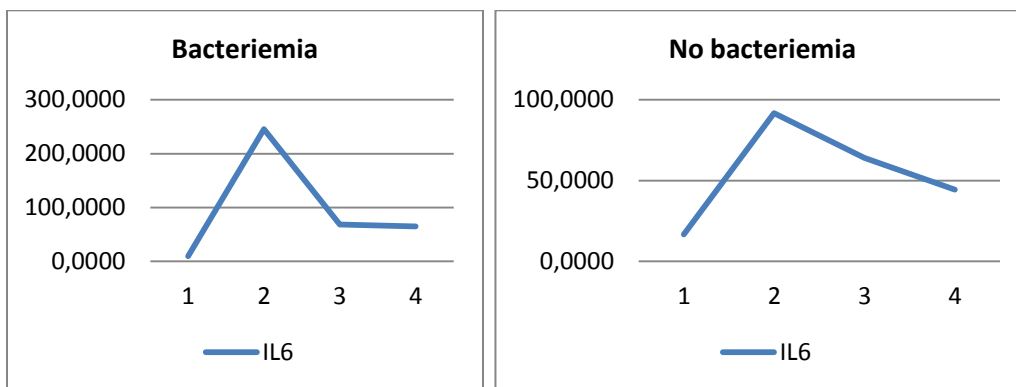


Tabla 4 Niveles séricos de IL6 (pg/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia

Bacteriémicos n=13	IL6-1	IL6-2	IL6-3	IL6-4
Mediana	9,90	245,30	68,66	65
RIQ	22,11	298,51	54,30	98,80
IC 85%	0,06 – 289,46	37,66 - 1694,42	2,69 -138143,57	0,77 – 783,77
No bacteriémicos n=31	IL6-1	IL6-2	IL6-3	IL6-4
Mediana	16,79	91,72	64,11	44,48
RIQ	32,57	154,35	102,97	117,52
IC 85%	0,000 - 149,6	15,3 -543,8	10,7 - 512,3	6,9 - 610,9

Figura 3: Cinética de IL8 en las muestras estudiadas

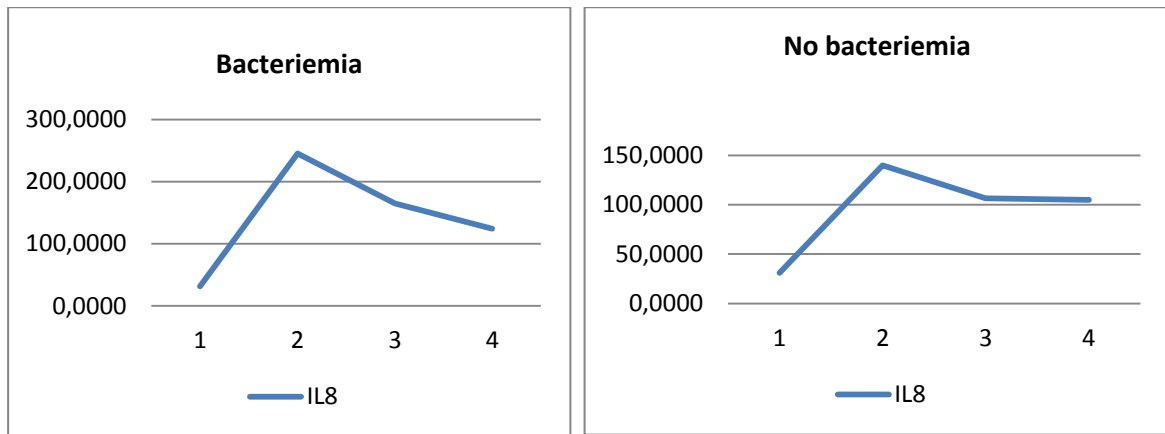


Tabla 5 Niveles séricos de IL8 (pg/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia

Bacteriémicos n=13	IL8-1	IL8-2	IL8-3	IL8-4
Mediana	31,61	245,12	164,95	124,22
RIC	31,97	295,57	156,24	138,77
IC 85%	11,68 – 328,01	36,18 – 389781,22	17,01-12068,72	7,42 - 801,90
No bacteriémicos n=31	IL8-1	IL8-2	IL8-3	IL8-4
Mediana	30,97	139,71	106,35	104,97
RIC	47,32	164,15	207,06	190,72
IC 85%	7,01 - 364,98	24,22 - 603,49	17,60 - 546,94	13,79 - 556,63

Figura 4 Cinética de IL 10 en las muestras estudiadas

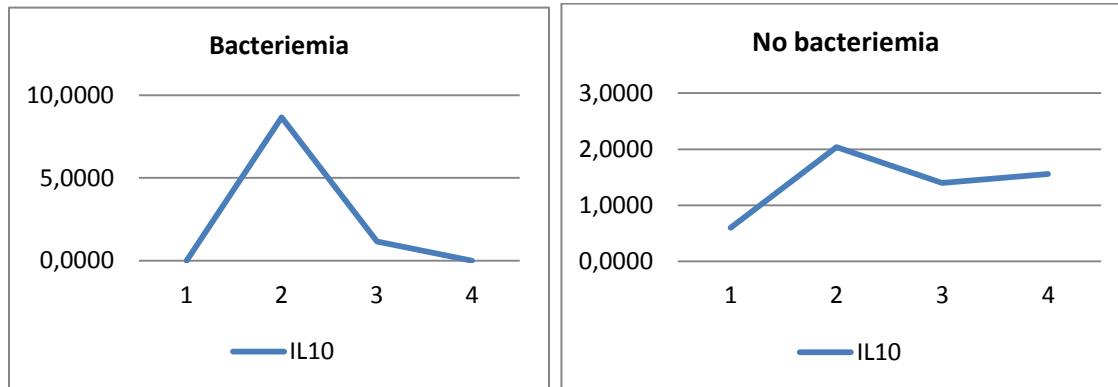


Tabla 6 Niveles séricos de IL10 (pg/mL) distribuidos por medianas según la presencia o no de bacteriemia

Bacteriémicos n=13	IL10-1	IL10-2	IL10-3	IL10-4
Mediana	0,00	8,67	1,16	0,00
RIC	0,09	65,33	9,2	1,72
IC 85%	0,00 - 4,20	0,54 - 648,32	0,00 - 23,09	0,00 - 2,42
No bacteriémicos n=31	IL10-1	IL10-2	IL10-3	IL10-4
Mediana	0,60	2,04	1,40	1,56
RIC	1,88	7,50	3,94	5,0
IC 85%	0,000 - 7,93	0,000 - 21,17	0,000 - 152,64	0,000 - 25,0

6. Discusión

Está bien descrita la relación entre el grado de neutropenia y el riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas en pacientes con neoplasias hematológicas en quimioterapia. Hace cuatro décadas, *Bodey y cols*² realizan una descripción detallada de las complicaciones infecciosas en 52 pacientes tratados con citotóxicos para el tratamiento contra la leucemia aguda. Ellos hicieron la observación que de acuerdo a la disminución de los granulocitos, la frecuencia, la duración y gravedad de las infecciones aumentaban dramáticamente. Esto se presentó especialmente cuando el recuento de neutrófilos cayó por debajo de 500 células / mm³. En la actualidad, se reconoce no sólo el conteo absoluto de neutrófilos como factor de riesgo de mortalidad sino que ésta también se relaciona con la enfermedad subyacente y la potencia de la quimioterapia. A pesar del mayor conocimiento de la patología y de los avances técnico científicos, la morbilidad y la mortalidad por complicaciones infecciosas después de quimioterapia agresiva y potencialmente curativa en pacientes con neoplasias hematológicas sigue siendo un problema clínico, con tasas de mortalidad reportadas en nuestro medio entre 7,2⁴⁸ y 11,6%⁴⁹. En nuestro estudio en el que se reportaron 11 bacteriemias no se documentó ninguna muerte al egreso hospitalario.

Documentación de bacteriemia en neutropenia febril

En la mayoría de los episodios de neutropenia febril los agentes infecciosos causales no pueden ser identificados. *Rintala y cols*⁴ evaluaron las características de 554 episodios febriles en 126 pacientes con cáncer hematológico durante un período de 6 años. Los hemocultivos fueron positivos en el 19% de los episodios febriles. Un estudio más reciente¹⁹ evidencia aislamientos microbiológicos en hemocultivos en el 43% de los episodios de neutropenia febril en 116 pacientes hospitalizados para administración de quimioterapia aplasante. Otro estudio retrospectivo²⁰ analizó los resultados de cultivos obtenidos en 95 pacientes neutropénicos con fiebre, encontrando que un 63% de los pacientes tenían hemocultivos positivos, con 43% de aislamientos de gérmenes Gram negativos, 29,8% de Gram positivos, 3,2% fueron polimicrobianos y solo un hemocultivo documentó hongos. En nuestro estudio se logró una tasa hemocultivos positivos del 25% similar a lo revisado en la literatura, con mayor frecuencia de aislamientos de gérmenes

Gram negativos (69%) y con la presencia de bacteriemias polimicrobianas en el 38% de los casos.

Marcadores inflamatorios y documentación de bacteriemia

Recientes estudios en pacientes inmunocomprometidos con neutropenia febril han demostrado que estos pacientes también son capaces de producir niveles plasmáticos elevados de citoquinas, así como de procalcitonina y Proteína C Reactiva²⁷⁻²⁹. En un estudio la procalcitonina se analizó de forma temprana después de la aparición de la fiebre y el inicio del tratamiento antimicrobiano. En 28 casos de neutropenia febril los autores calcularon la sensibilidad para la detección de bacteriemia o infección clínica a 55 % y la especificidad de 88 % con un nivel del PCT de 0,5 ng / ml³³. Otro estudio incluyó 33 casos de bacteriemia, donde se observaron los niveles más altos de procalcitonina durante el primer día, en episodios de bacteriemias por gérmenes Gram negativos en comparación con los otros cuadros clínicos⁴¹. De forma similar, nuestro estudio mostró que los mayores niveles de PCT se presentaron hacia las 24 horas del episodio febril (muestra 3) en los episodios de bacteriemia, sin embargo los intervalos de confianza resultaron muy amplios para definir la significancia estadística de esta observación.

En cuanto a las citoquinas, el contexto de neutropenia febril post quimioterapia, un estudio prospectivo, compara diversos métodos (procalcitonina, PCR y citoquinas: IL 6 e IL 8)⁴¹ mostrando una especificidad de 80% con un valor predictivo negativo de 85% en los pacientes neutropénicos febriles sin bacteriemia. Encontró que ninguno de los marcadores analizados fue superior en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para bacteriemia. Sin embargo, la IL-6 e IL-8 permitieron una detección más precoz de procesos infecciosos severos (10 horas) comparadas con procalcitonina y PCR.

Nuestro estudio infortunadamente y por circunstancias ajenas a los investigadores, no pudo disponer de todas las muestras del proyecto en prensa INC-C41030610-410 "*Niveles de procalcitonina y su relación con la documentación de bacteriemia en pacientes adultos con neoplasias hematológicas y neutropenia febril de alto riesgo inducida por quimioterapia en el Instituto Nacional de Cancerología*" por lo cual los datos difieren a los presentados en el mencionado estudio y no se logró establecer valores predictivos para la documentación de bacteriemia con los marcadores medidos, sin embargo, se pudo perfilar la cinética de los mismos, encontrándose que IL 10 e IL 6 mostraron mayor porcentaje de variación durante el momento de la fiebre (muestra 2) comparando el grupo de bacteriémicos con el de no bacteriémicos (42 y 37%,

respectivamente), información que nos permitiría establecer una mayor utilidad de estas dos pruebas en la detección precoz de los episodios febriles de alto riesgo, hallazgo similar al encontrado en la referencia anteriormente mencionada. Dada el amplio rango de concentraciones en estas dos citoquinas en particular, un análisis posterior muy valioso sería el de establecer puntos de corte relacionados con la presencia de bacteriemia.

Consideraciones técnicas de la prueba

Llamativamente, IL1, IL12p70 y TNF α arrojaron niveles por debajo de los estándares de la prueba (10 a 2500 pg/mL) situación no esperada según los datos reportados por la literatura y previamente mencionados. Esta situación podría explicarse por la vida media tan corta de las citoquinas y por factores relacionados a la toma y procesamiento de las muestras, aspectos críticos en las variaciones inter ensayo. Se recomienda que al obtenerse las muestras, la sangre entera debe recogerse en tubos estériles con anticoagulantes, colocarse inmediatamente en hielo y ser centrifugada lo antes posible, preferiblemente dentro de treinta minutos ³⁶.

Adicionalmente, la hora del día en que se toman las muestras de sangre debe estar sincronizada, idealmente en la mañana pues se puede atenuar la influencia de los patrones circadianos. Ciertas citoquinas, en particular los que están afectados por los glucocorticoides, pueden exhibir variaciones diurnas que son altamente predecibles. El interferón gamma (IFN-gamma), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleuquina 1 (IL-1) y la IL-12 presentan picos en la mañana y guardan relación inversa con el ritmo de cortisol plasmático ³⁷.

Plasma o suero deben separarse de las células de forma rápida para evitar la degradación de las citoquinas. Las muestras deben mantenerse refrigeradas hasta su procesamiento pues se han encontrado diferencias en mediciones de citoquinas entre las que se mantienen a temperatura ambiente y -4 ° C. Las muestras pueden permanecer congeladas a -70° C hasta por dos años, manteniéndose estables los niveles de citoquinas. Un aspecto fundamental en el éxito del ensayo es evitar ciclos múltiples de congelación-descongelación³⁶. Durante la ejecución de nuestra prueba se acataron estrictamente estas recomendaciones, manteniendo cadena de frío durante todo el proceso, llevando a cabo una descongelación gradual de las muestras y efectuando la lectura de citometría en un mismo tiempo para los 180 tubos.

7. Conclusiones

En el contexto de neutropenia febril, el inicio de terapia antibiótica está claramente indicado aún sin evidencia clínica o microbiológica de un proceso infeccioso y si bien la medición de marcadores indirectos de infección no influirá en la decisión de iniciar terapia antibiótica, sí se podrían convertir para el clínico en una herramienta útil para definir el tiempo de la terapia en situaciones clínicas complejas como es la fiebre de origen desconocido, con impacto en estancia hospitalaria, resistencia antimicrobiana, calidad de vida y costos.

Las citoquinas podrían cumplir un papel promisorio en el seguimiento de los pacientes neutropénicos febriles dada la potencial asociación con presencia de bacteriemia, desenlace bien conocido como predictor de morbilidad y mortalidad en esta población. Sin embargo, se requieren más estudios con mayor población para definir una recomendación clara en las guías de manejo de neutropenia febril post quimioterapia.

Adicionalmente, con este trabajo se logró iniciar un campo de investigación valioso basado en la técnica de citometría de flujo, con las ventajas que esta representa: precisión y velocidad de procesamiento de muestras para estudio inmunológico.

A. Anexo: Manual de procedimientos

A continuación se describen las fases del procesamiento de muestras mediante la técnica de citometría de flujo³⁹:

1. Preparación: Visualizar el experimento en un análisis previo (pre-citometría), mediante la adecuación de las condiciones de la muestra y del citómetro. Selección de los parámetros a medir y reactivos necesarios.

- a) **Adecuación de las condiciones de la muestra:** Descongelación de los sueros a temperatura de 4° C por 24 horas.
- b) **Adecuación de las condiciones del citómetro:** Seleccionar y ajustar el voltaje hasta que las poblaciones celulares sean visibles en el centro de los histogramas tipo *dot-plots* en un análisis por tamaño de partículas *FSC (Forward Scatter)*.
- c) **Selección de parámetros a medir:** Niveles de IL1 β , 6, 8, 10, 12 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en pg/mL, los cuales se medirán mediante el producto comercial *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit*.
- d) **Selección de fluorocromos:** Isotiocianato de fluorescencia (FITC), Ficoeritrina (PE) y Aloficocianina (APC).

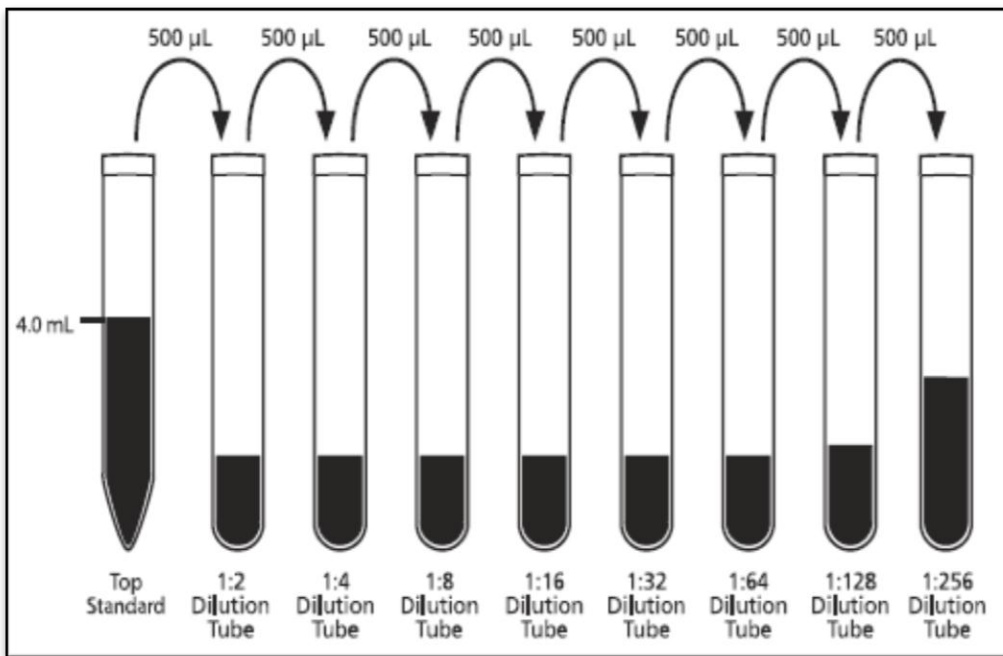
2. Citometría de Flujo: Realizar la lectura de la muestra y un pre-análisis de su comportamiento. Procesamiento de las muestras en un citómetro de flujo. Medición de los parámetros seleccionados en la fase de preparación.

Preparación de los estándares para el kit

Los estándares del kit son sustancias liofilizadas y debieron ser reconstituidas y diluidas en serie inmediatamente antes de mezclar las perlas de captura y los reactivos de detección.

1. Colocar todas las esferas liofilizadas en un tubo de polipropileno de 15 ml. Este se rotula como tubo estándar.
2. Reconstituir los estándares con 4 ml de diluyente.
3. Dejar que el estándar reconstituido se equilibre durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente.

4. Mezclar suavemente el estándar reconstituido sólo con una pipeta.
5. Etiquetar ocho tubos de 12 ×75 mm y organizar en el siguiente orden: 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16 1:32, 1:64, 1: 128, y 1: 256.
6. Pipetear 500 µL de diluyente de ensayo en cada uno de los tubos.
7. Llevar a cabo una serie de dilución.
8. Transferir 500 µL del tubo estándar al tubo de dilución 1: 2 tubo de dilución y mezclar cuidadosamente sólo con una pipeta.
9. Continuar haciendo diluciones seriadas transfiriendo 500 µL del tubo 1:2 al tubo 1:4 y así hasta la dilución 1:256
10. Preparar un tubo de 12x75 mm que contenga el diluyente para servir como control negativo.



Se recomienda que los primeros 10 pozos o tubos en el experimento sean los estándares. Estos deben ser leídos o corridos en orden de menor concentración (0 pg / mL) a mayor concentración para facilitar el análisis del Software Matriz FCAP.

Mezclar las perlas de captura

1. Determinar el número de proteínas necesarias para el experimento.

2. Agitar los tubos para resuspender las perlas del fondo.
3. Determinar el volumen total de perlas diluídas necesarios para el experimento. Cada tubo / pocillo requiere 50 μ L de las perlas diluídas.
4. Determinar el volumen necesario para cada perla. Las perlas son llenadas de forma que $1.0 \mu\text{L} = 1 \text{ test}$, por lo tanto el volumen requerido por las perlas es igual al número de test.
5. Determine el volumen de diluyente necesario, restando el volumen de cada perla medida a partir del volumen total de perlas diluídas necesarias para realizar el ensayo.
6. Pipetear las perlas de captura y las de diluyente en un tubo etiquetado "perlas de captura mixtas."

Procedimiento para la medición de citoquinas

1. Agitar (vortex) las perlas de captura mixtas y añadir 50 μ L a todos los tubos de ensayo.
2. Añadir 50 μ L de las diluciones estándar de citoquinas inflamatorias humanas (kit) a los tubos de control como muestra la siguiente figura:

Tube label	Concentration (pg/mL)	Standard dilution
1	0 (negative control)	no standard dilution (Assay Diluent only)
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312.5	1:16
7	625	1:8

Tube label	Concentration (pg/mL)	Standard dilution
8	1,250	1:4
9	2,500	1:2
10	5,000	Top Standard

3. Añadir 50 μ L de cada muestra desconocida a los tubos etiquetados.
4. Incubar los tubos de ensayo durante 1,5 horas a la temperatura de la habitación, protegidos de la luz.
5. En este momento se procederá a la configuración del citómetro.
6. Añadir 1 ml de tampón de lavado a cada tubo de ensayo y centrifugar a 200 g durante 5 minutos.
7. Con cuidado y consistentemente, aspirar y descartar el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 μ L de líquido en cada tubo de ensayo.
8. Añadir 50 μ L del reactivo de citoquinas inflamatorias humanas a todos los tubos de ensayo y agitar suavemente los tubos para resuspender las partículas.
9. Incubar los tubos de ensayo durante 1,5 horas a la temperatura de la habitación, protegido de la luz.
10. Añadir 1 ml de tampón de lavado a cada tubo de ensayo y centrifugar a 200 g durante 5 minutos.
11. Con cuidado aspirar y desechar el sobrenadante de cada tubo de ensayo.

Bibliografía

1. Courtney D, Aldeen A, Gorman S, Handler J, Trifilio S, Parada J, et al. Cancer-Associated Neutropenic Fever: Clinical Outcome and Economic Costs of Emergency Department Care. *The Oncologist*. 2007; 12 : 1019-1026
2. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ: Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Annals of Internal Medicine*. 1966; 64: 328–40.
3. Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, et al: The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol*. 2000;18: 3038-3051
4. Rintala E: Incidence and clinical significance of positive blood cultures in febrile episodes of patients with haematological malignancies. *Scand J Infect Dis*. 1994;26(1):77-84
5. Persson L, Engervall P, Magnuson A, Vikerfors T, Soderquist B, Hansson LO, Tidefelt U. Use of inflammatory markers for early detection of bacteraemia in patients with febrile neutropenia. *Scand J Infect Dis*. 2004;36:365–371.
6. Carvalho L, Bittencourt H, Tiburcio A, Lucio A, Teixeira M, Cerqueira J, Nobre V: Plasma levels of procalcitonin and eight additional inflammatory molecules in febrile neutropenic patients. *Clinics* 2011;66(10):1699-1705

7. Von Lilienfel M, Dietrich MP, Glasmacher A, Lehmann L, Breig P, Hahn C, et al. Markers of bacteremia in febrile neutropenic patients with hematological malignancies: procalcitonin and IL-6 are more reliable than C-reactive protein. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 539–544
8. Engel A, Steinbach G, Kern P, Kern WV: Diagnostic value of procalcitonin serum levels in neutropenic patients with fever: comparison with interleukin-8. *Scand J Infect Dis*.1999; 31(2):185-9.
9. Carvalho L, Bittencourt H, Tiburcio A, Lucio A, Teixeira M, Cerqueira J, Nobre V: Plasma levels of procalcitonin and eight additional inflammatory molecules in febrile neutropenic patients. *Clinics* 2011;66(10):1699-1705
10. Abram M, Vučković D, Wraber B, Dori M. Plasma cytokine response in mice with bacterial infection. *Mediators of Inflammation*. 2000; 9: 229–234.
11. Parsa M, Najafi S, Jafari N, Mohraz M, Ghavamzadeh A, Bahar B, Izadi, M, Radar M, Ghofrani H. Diagnostic relevance of Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor Alpha in discriminating high risk and low risk groups in febrile patients with neutropenia. *Journal of Biological Sciences* 7 (2): 338-342, 2007
12. M. Diepold. Performance of Interleukin-6 and Interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for the assessment of low-risk. *BMC Infectious Diseases* 2008, 8:28
13. M Vänskä. IL-10 combined with procalcitonin improves early prediction of complications of febrile neutropenia in hematological patients. *Cytokine* 2012 (60) 787–792.
14. LC Neuenschwander. Plasma levels of procalcitonin and eight additional inflammatory molecules in febrile neutropenic patients. *Clinics* 2011;66(10):1699-1705.
15. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006; 38:317-323.
16. Neth OW, Bajaj-Elliott M, Turner MW, Klein NJ: Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. *British Journal of Haematology*. 2005; 129 (6): 713–722.

17. Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, et al: The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol.* 2000;18: 3038-3051
18. Cortés JA, Cuervo SI, Arroyo CP. Hallazgos microbiológicos en pacientes con neutropenia febril. *Rev. Colomb. Cancerol.* 2003; 7: 5-11.
19. Baskaran ND. et al. Bacteremia in patients with febrile neutropenia after chemotherapy at a university medical center in Malaysia. *International Journal of Infectious Diseases* 2007; 11, 513—517
20. Yadegarynia D. et al. Current spectrum of bacterial infections in patients with nosocomial fever and neutropenia. *Caspian J Intern Med* 2013; 4(3): 698-701
21. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ: Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Annals of Internal Medicine.* 1966;64: 328—40.
22. Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Jeha S, et al. Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer.*2004; 101:2788-801.
23. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, et al. 2002 Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 730- 51.
24. Rintala E: Incidence and clinical significance of positive blood cultures in febrile episodes of patients with haematological malignancies. *Scand J Infect Dis.* 1994;26(1):77-84
25. Yadegarynia D. et al. Current spectrum of bacterial infections in patients with nosocomial fever and neutropenia. *Caspian J Intern Med* 2013; 4(3): 698-701
26. Manian FA. A prospective study of daily measurement of C reactive protein in serum of adults with neutropenia. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 114-21.

-
27. Katz JA, Mustafa MM, Bash RO, Cash JV, Buchanan GR. Value of C reactive protein determination in the initial diagnostic evaluation of the febrile, neutropenic child with cancer. *Pediatr Infect Dis J.* 1992; 11: 708-12.
 28. Arber C, Passweg JR, Fluckiger U, Pless M, Gregor M, Tichelli A, et al. C-reactive protein and fever in neutropenic patients. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32: 515- 20.
 29. Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin as a marker of bacterial infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19: 679-87.
 30. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* 1993; 341: 515-8.
 31. Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med.* 1998; 24: 888-9.
 32. Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, Bohuon C. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 1605-8.
 33. Ruokonen E, Nousiainen T, Pulkki K, Takala J. Procalcitonin concentrations in patients with neutropenic fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18: 283-5.
 34. Haack M, Pollmacher T, Mullington JM. Diurnal and sleep-wake dependent variations of soluble TNF- and IL-2 receptors in healthy volunteers. *Brain Behav.Immun.* 2004; 18:361–367
 35. Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Trakada G, Chrousos GP. IL-6 and its circadian secretion in humans. *Neuroimmunomodulation.* 2005; 12:131–140.
 36. Zhou X, Fragala M, McElhaney J, Kuchel G. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*2010; 13(5): 541–547
 37. Petrovsky N, McNair P, Harrison LC. Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine.* 1998; 10:307–312.

38. Payette C, Blackburn P, Lamarche B, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux. Sex differences in postprandial plasma tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and C reactive protein concentrations. *Metabolism*. 2009; 58:1593–1601.
39. Stefura WP, Campbell JD, Douville R, Stinson MJ, Simons FE, Becker AB, et al. Ultrasensitive ELISA for measurement of human cytokine responses in primary culture. *Methods Mol Med*. 2008; 138:107-119.
40. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006; 38:317-323.
41. Persson L, Engervall P, Magnuson A, Vikerfors T, Söderquist B, Hansson LO, et al: Use of Inflammatory Markers for Early Detection of Bacteraemia in Patients with Febrile Neutropenia. *Scand J Infect Dis*. 2004; 36 (5):365-71.
42. Brown M, Wittwera C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. 2000; 46(8):1221-1229
43. Reichelt U, Jung R, Nierhaus A, Tsokos M. Serial monitoring of interleukin-1beta, soluble interleukin-2 receptor and lipopolysaccharide binding protein levels after death: A comparative evaluation of potential postmortem markers of sepsis. *Int J Legal Med*. 2005;119:80–7
44. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 2001; 97(1): 256-63
45. Stephen J. Polyak, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated Levels of Interleukin-8 in Serum Are Associated with Hepatitis C Virus Infection and Resistance to Interferon Therapy. *J Virol*. 2001; 75(13): 6209–6211.
46. Ethuin F, Delarche C, Gougerot-Pocidal MA, B Eurin, Jacob L, Chollet-Martin S. Regulation of Interleukin 12 p40 and p70 Production by Blood and Alveolar Phagocytes During Severe Sepsis. *Lab Invest*. 2003, 83:1353–1360.
47. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, Raad I, Rolston KV, Young JH, Wingard JR. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the

Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 52(4):e56–e93

48. Bermúdez C. Caracterización de la neutropenia febril en pacientes con leucemia linfocítica aguda, tratados con quimioterapia de alto riesgo, atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología desde 1 de enero al 31 de diciembre de 2008. Repositorio Universidad Nacional de Colombia.
49. Cortes JA, Cuervo SI, Gómez C, Bermúdez D, Martínez T, Arroyo P. Neutropenia febril en el trópico: una descripción de los hallazgos clínicos y microbiológicos y el impacto de la terapia inapropiada que utilizan en un centro de referencia oncológica en Colombia. *Biomédica*. 2013; 33:70-7

