

# XI Jornada Tècnica

## Societat Catalana d'Immunologia

### *Aplicacions diagnòstiques de les determinacions de nivells de citocines a líquids biològics*

Clara Franco Jarava

PhD | Facultatiu Especialista  
Servei d'Immunologia  
Hospital Universitari Vall d'Hebron

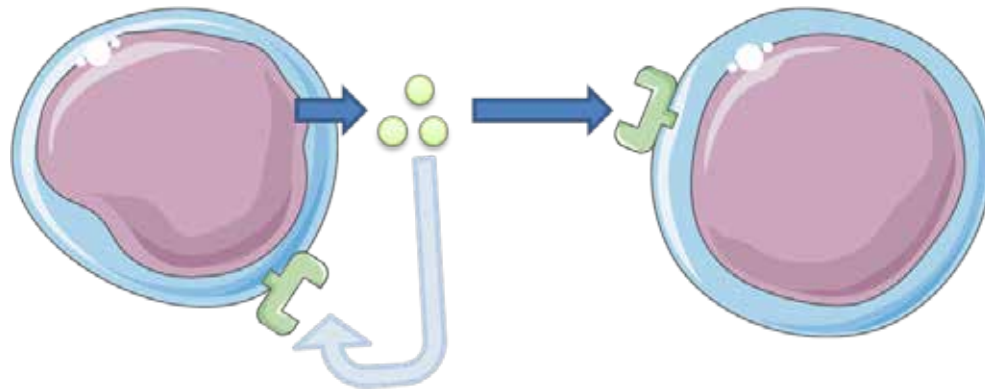
Barcelona, 15 de novembre de 2018

# INDEX

- Conceptes generals de les citocines
- Tècniques per quantificar citocines
- Aplicacions clíniques

# 1. Conceptes generals

Les citocines es defineixen com a polipèptids secretats pels leucòcits i d'altres tipus cel·lulars, que actuen principalment sobre cèl·lules hematopoètiques i els efectes de les quals inclouen la modulació del sistema immunitari i la resposta inflamatòria.



*Essentially, cytokines are the vocabulary of the language that cells use to communicate with one another*

# 1. Conceptes generals



1974 Stanley Cohen à Citoquina (vs. Mono&lympho-kines)

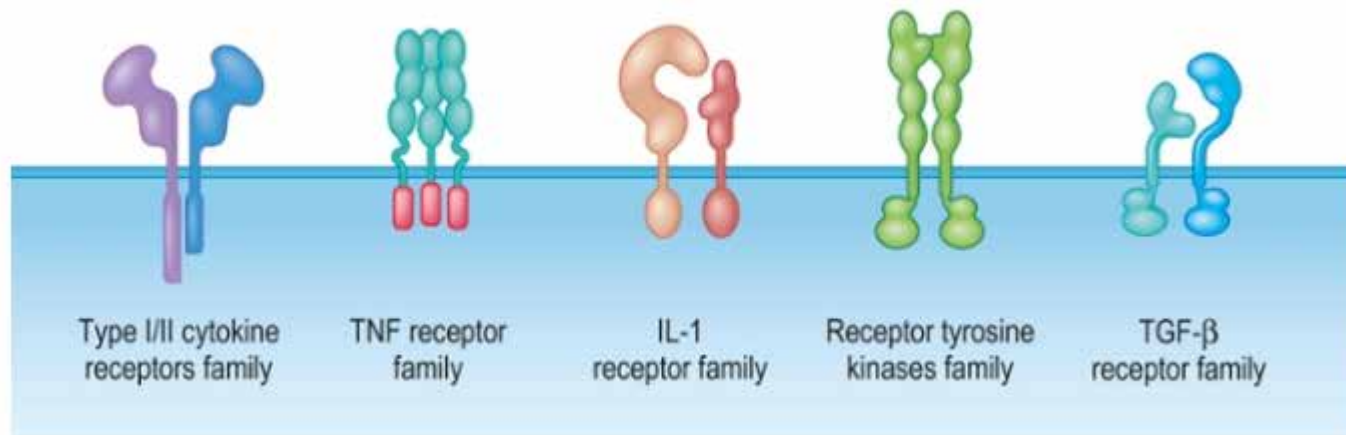
**Interleucines:** citocines produïdes per un leucòcit i que actuen sobre un altre.

**Quimiocines:** familia de citocines de petit tamany que tenen com a funció la coordinació del transit leucocitari

# 1. Conceptes generals

## CLASSIFICACIÓ SEGONS ELS RECEPTORS

- Enfatitza la relació evolutiva entre citocines/factors de creixement/hormones.
- Remarca las similituts en la transducció de les senyals.





# 1. Conceptes generals

## CARACTERÍSTIQUES DE LES CITOCINES

1. Les citoquines tenen efectes **pleiotròpics**

à poden tenir més d'un receptor.

2. Les citoquines poden ser **redundants**

à els receptors comparteixen subunitats.

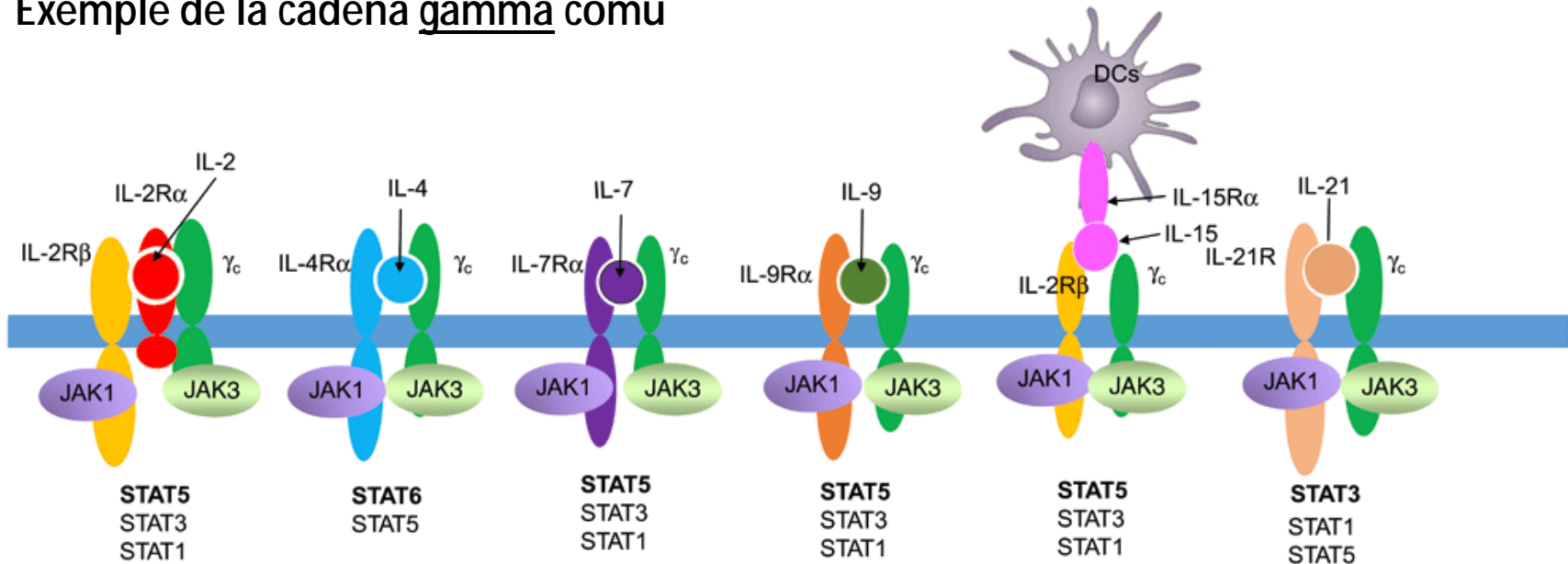
3. Les citoquines poden tenir funcions **específiques** i úniques

à Els receptors també tenen subunitats específiques de lligand.

# 1. Conceptes generals

## REDUNDÀNCIA, PLEIOTROPIA I ESPECIFICITAT

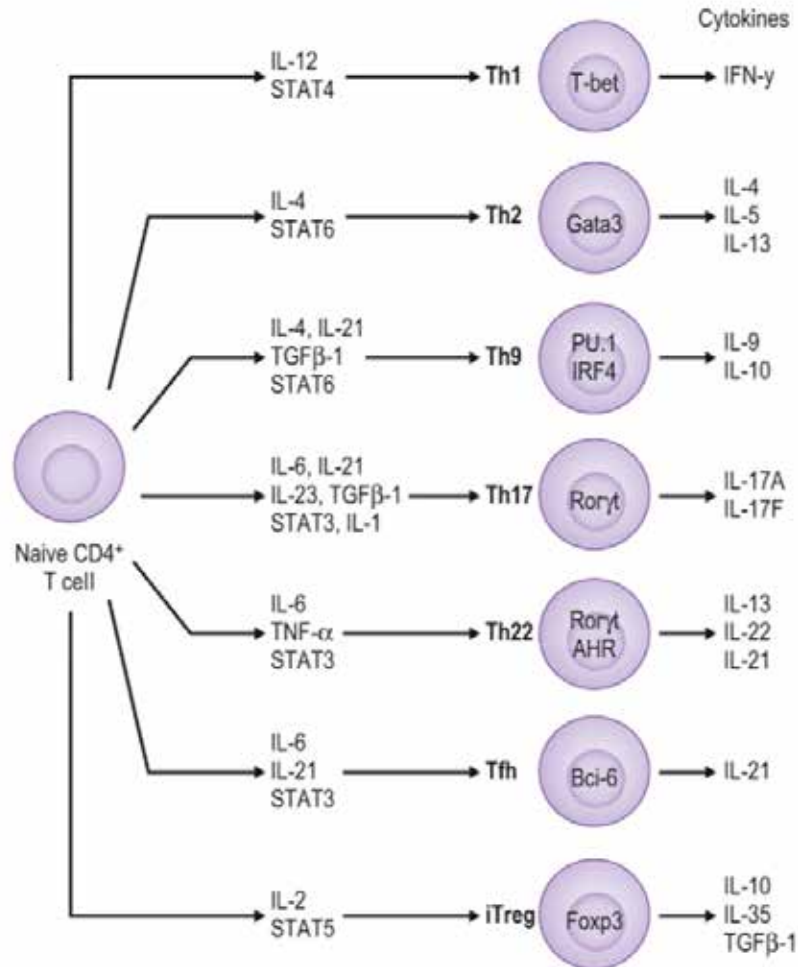
Exemple de la cadena gamma comú



La cadena beta comú es la cadena comú en els receptors de IL-3, IL-5 i GM-CSF

# 1. Conceptes generals

## DIFERENCIACIÓ DE SUBTIPUS DE LIMFÒCITS T HELPER





## 2. Tècniques per quantificar citocines en líquids biològics

1. ELISA
2. Multiplex
  - 2.1 Luminex
  - 2.2 CBA
3. Simple Plex



ELISA

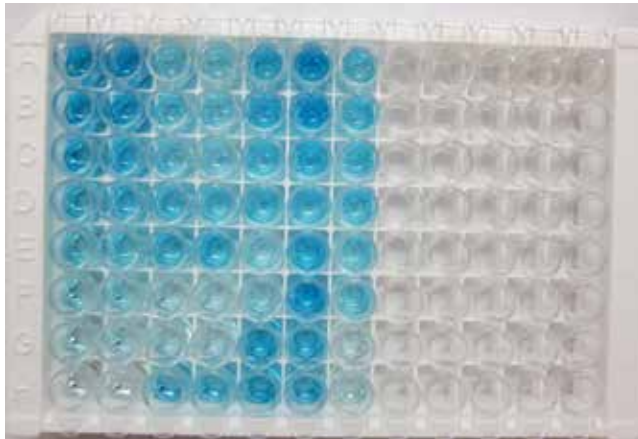
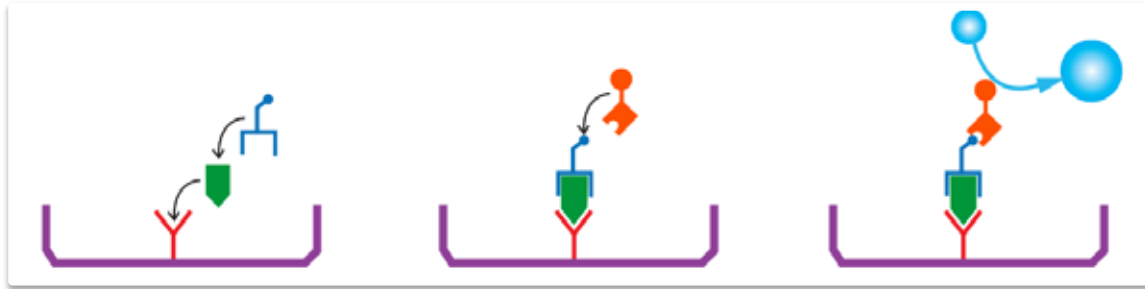


Multiplex



Simple Plex

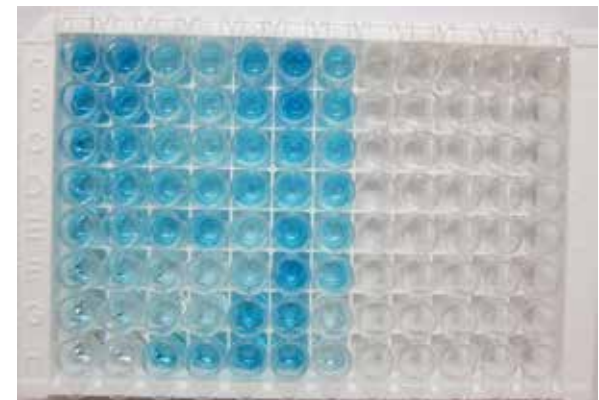
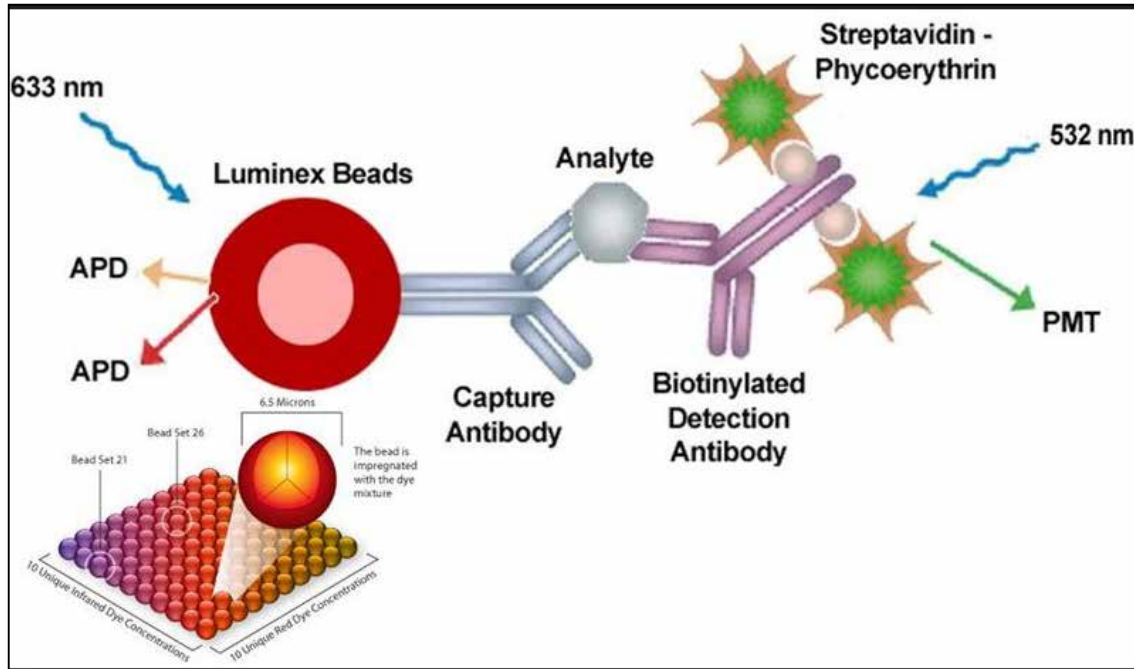
# 1. ELISA



- 40 mostres per placa. *Fent duplicats*
- Es pot dividir el kit (16 + 16 mostres)
- Es pot automatitzar el procés

## 2. Multiplex

### 2.1 Luminex

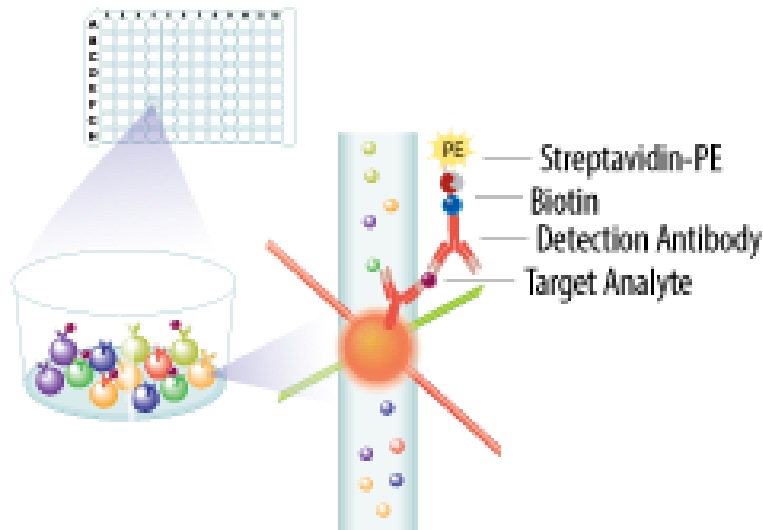


## 2. Multiplex

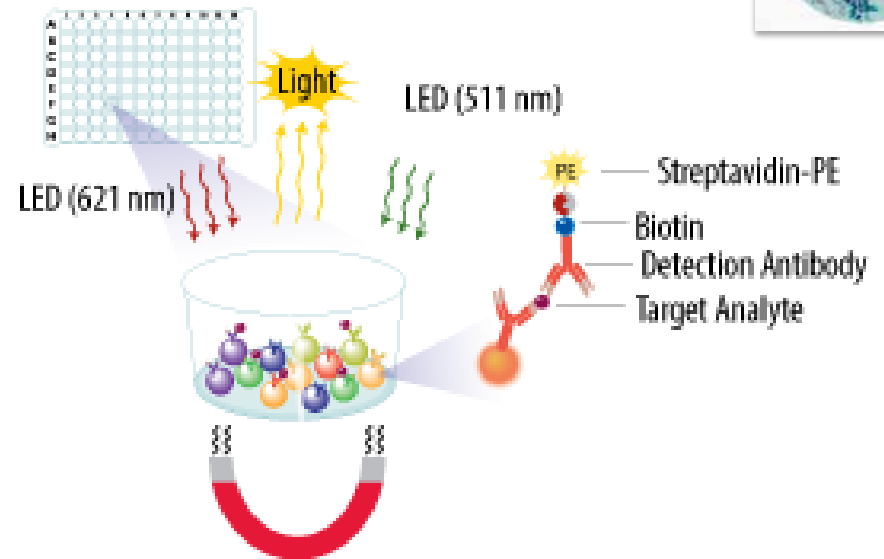
### 2.1 Luminex



Polystyrene beads:



Magnetic beads:

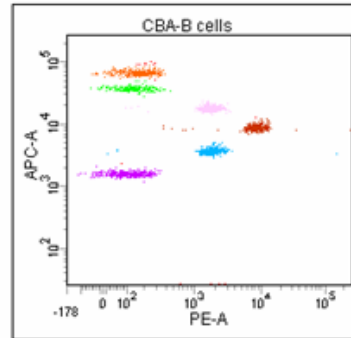
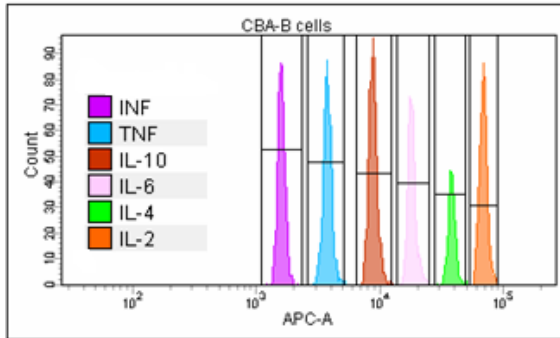
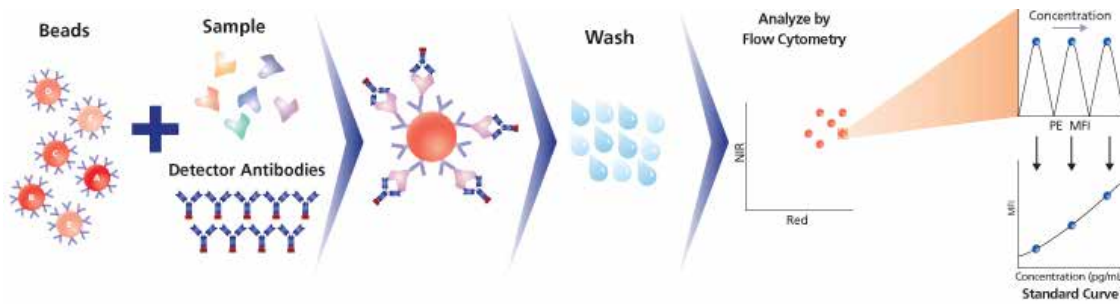


- 40 mostres per placa. *Fent duplicats*
- Es pot dividir el kit (16 + 16 mostres)
- **NO** es pot automatitzar el procés
- Requereix aparell especial (LUMINEX)



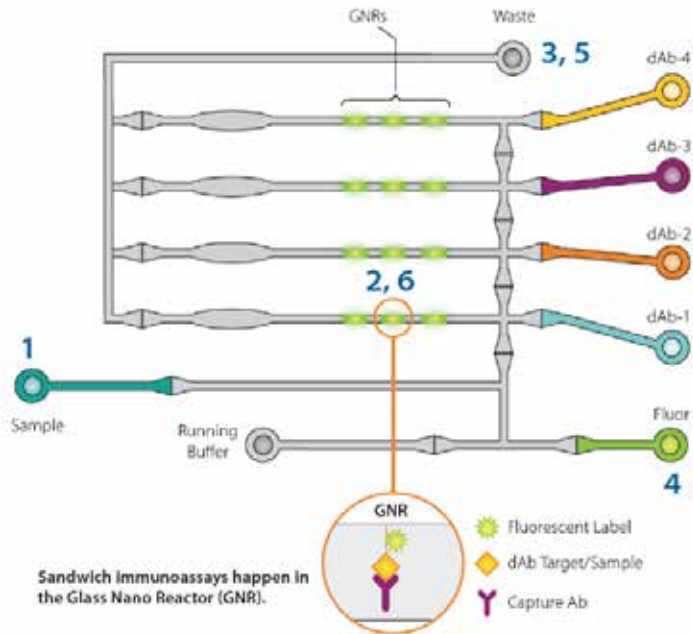
# 1. Multiplex

## 2.2 CBA



- No limitació de mostres. *No duplicats*
- No es pot dividir el kit
- **NO** es pot automatitzar el procés
- No Requereix aparell especial (Citòmetre)

## 2. Simple Plex - ELLA



**R&D SYSTEMS**  
a biotechne brand



- 70/30/14 mostres. *Triplicats inclosos*
- **No** es pot dividir el kit
- Procés automatitzat
- Requereix aparell especial
- Ràpid (70 minuts)

# 3. Aplicacions clíniques

- Sèrum
- Sobrenedant de cultius cel·lulars
- Líquid amniòtic
- Líquid cefaloraquídi
- Humor vitri

# SEPSIS

**1a def (1990):** Resposta sistèmica a una infecció, caracteritzat per una inflamació generalitzada.

**2a def (2016):** Disfunció orgànica potencialment mortal degut a una desregulació en la resposta immunitària front a una infecció.

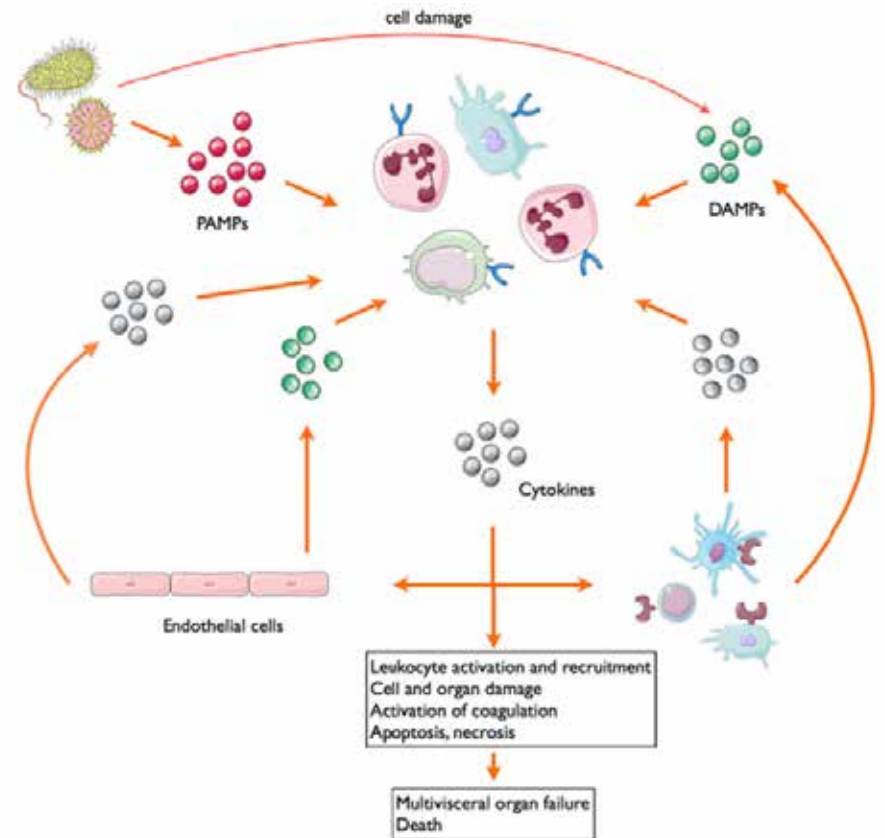
## Epidemiologia

- 450/100.000 habitants
- 15-30 Milions casos/any
- 20% mortalitat (3-6 Milions)



### 3. 1 Aplicacions clíniques en sèrum à SEPSIS

- Resposta de l'hoste un cop detectats els patrons moleculars (PAMPs)
- S'alliberen citocines inflamatòries que indueixen la producció de més citocines i això acaba provocant dany cel·lular o tissular.



### 3. 1 Aplicacions clíniques en sèrum à SEPSIS

De entre totes les citocines pro-inflamatòries estudiades durant la sepsis, les més rellevants son:

TNFa, IL-1b, IL-6, IL-12, IL-17

TNFa à Primer marcador que es va trobar

IL-1b à promou síntesi d'altres citocines pro-inflamatòries

IL-6 à Activació del complement i extravassament capilar.

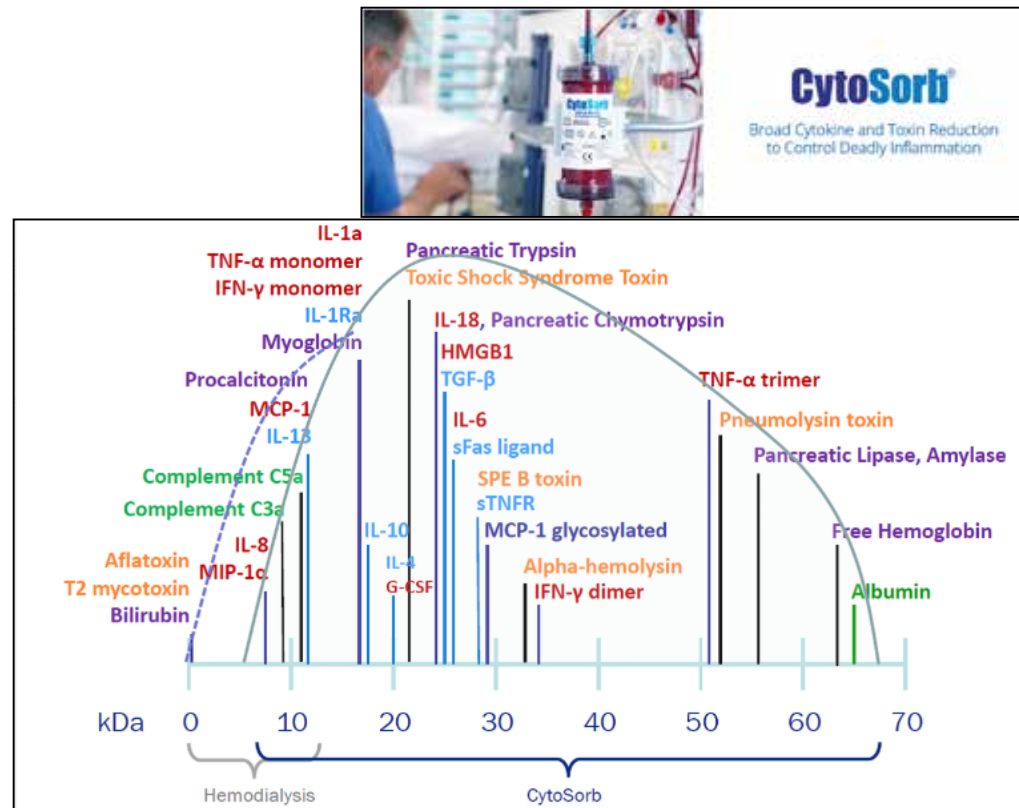
IL-12 à Activa NKs que produïran IFNg.

IL-17 à Indueix la síntesi de citocines pro-inflamatòries i quimiocines per part de cèlules endotelials, epitelials, fibroblasts o macròfags.

Associats a la gravetat.  
Com més elevats, pitjor pronòstic

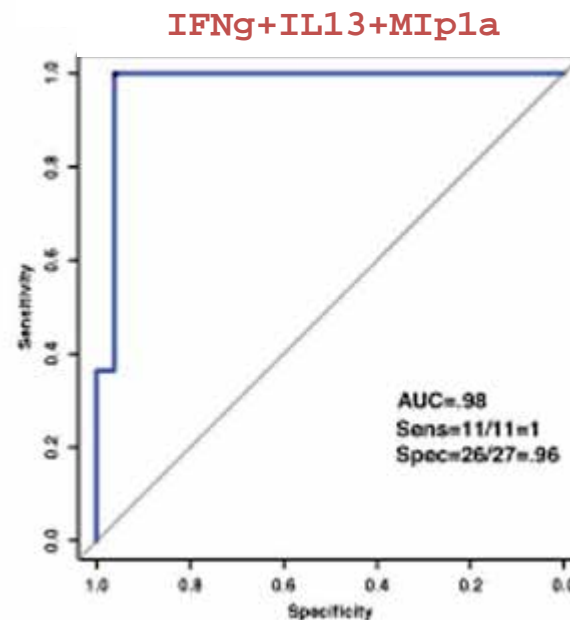
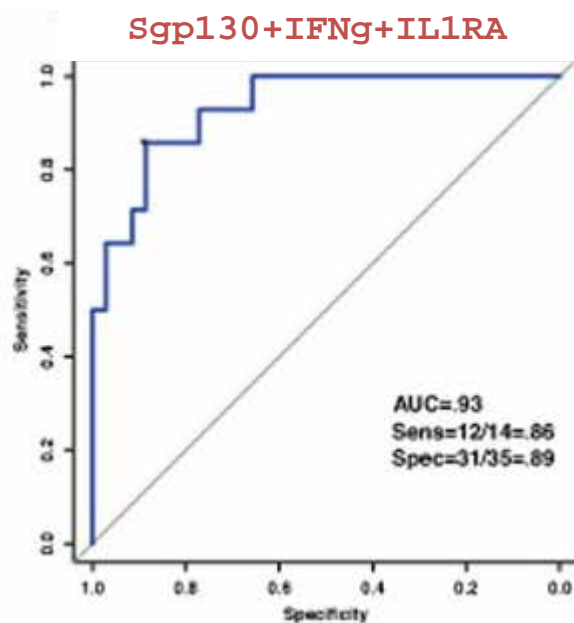
### 3. 1 Aplicacions clíniques en sèrum à SEPSIS

- Implicació terapèutica directa:



## Cytokine Release Syndrome

- Efecte secundari a l'administració d'immunoteràpia
  - Anticossos bi-específics
  - CAR-T cells
- Monitorització de citocines com sCD25 o IL-6 en assaigs clínics

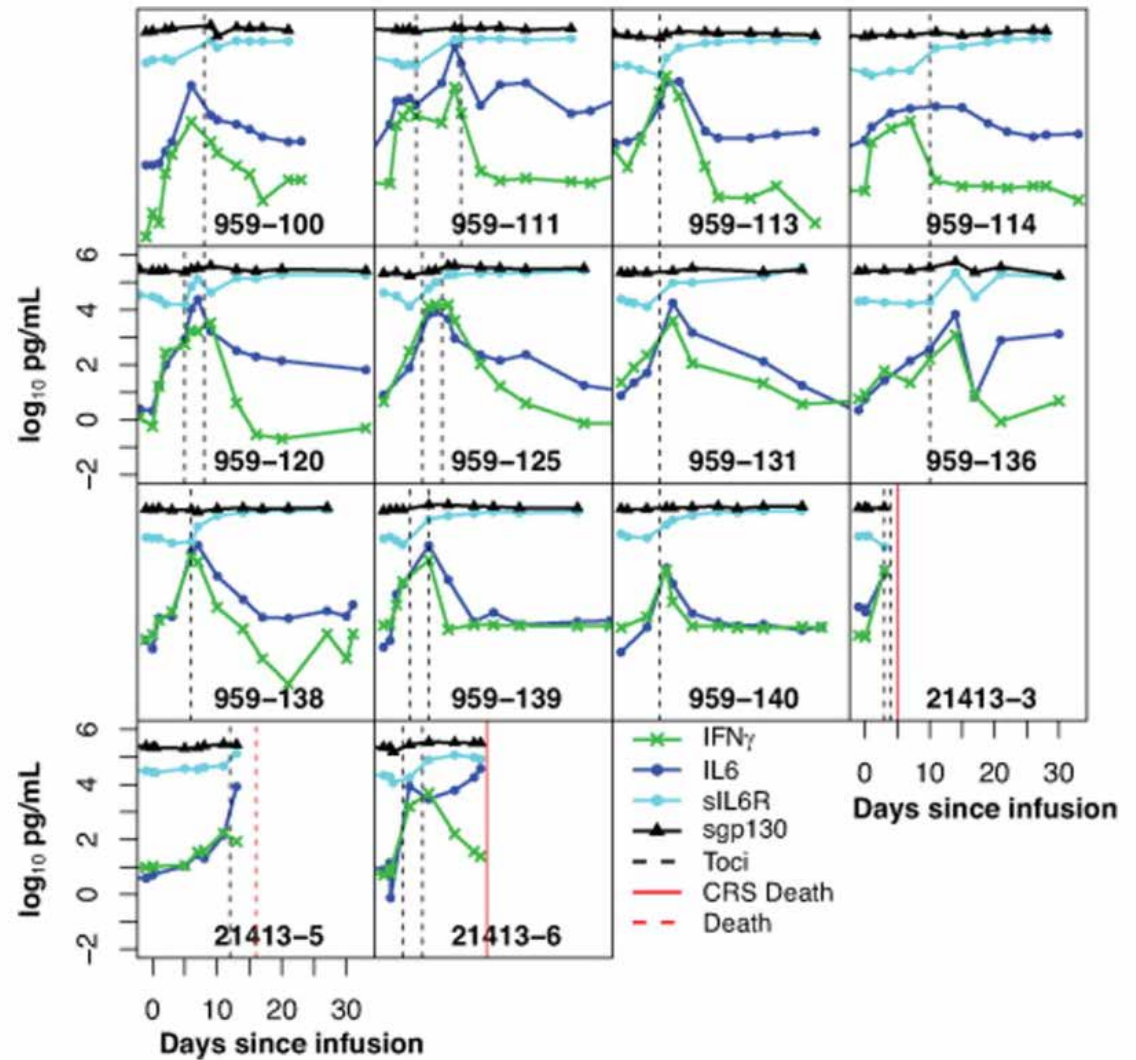


Cytokine profiles can predict severe CRS. Cytokines were analyzed from the first 3 days after infusion, sent before patients developed severe CRS. Teachey *et al.* Cancer Discovery. PMID: [27076371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27076371/)

### 3. 1 Aplicacions clíniques en sèrum à SEPSIS, CRS, IDPs

- Implicació terapèutica directa:

TOCILIZUMAB (anti IL-6)



Tocilizumab improves hypercytokinemia in patients with severe CRS. 14 of 51 patients developed severe CRS and all were treated with tocilizumab

. Teachey *et al.* Cancer Discovery. PMID: [27076371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27076371/)

### 3. 1 Aplicacions clíniques en sèrum à SEPSIS, CRS, IDPs

#### Immunodeficiències primàries

##### - **sCD25**: Marcador diagnòstic de síndrome hemofagocític (HLH)

Punt de tall a referències bibliogràfiques: **2400 UI**/mL

La majoria dels assaigs dona els resultats en pg/mL

Cal mirar la relació UI—pg de cada casa comercial

R&D (ELISA, ELLA): 1UI à 0.0602pg

Per tant, en pg/mL el punt de tall és de 40000pg/ml

##### - **IL-10 i sFASL**: Marcadors diagnòstics de **ALPS** per mutacions germinals a FAS.

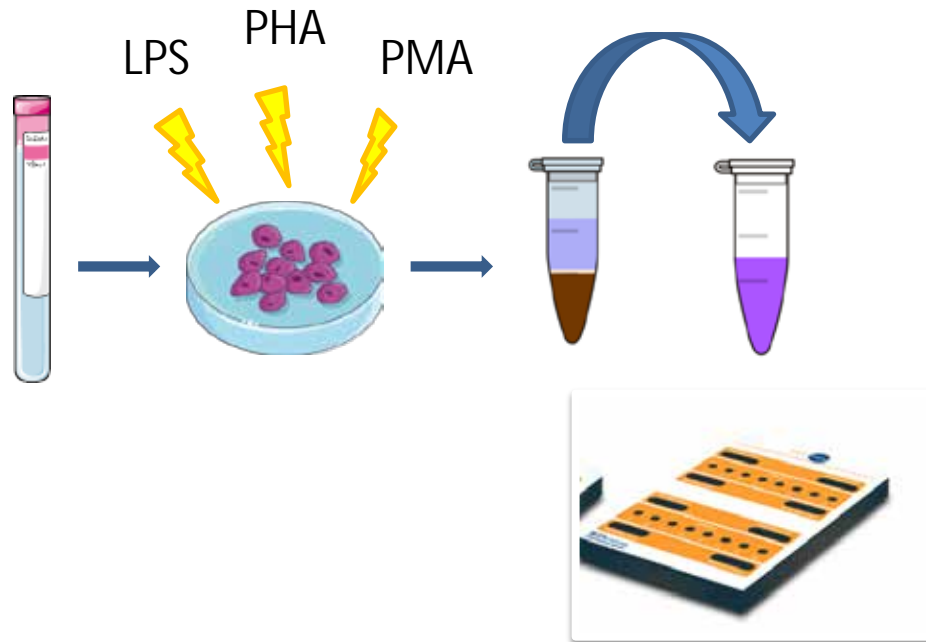
Segons els criteris diagnòstics de Síndrome Linfoproliferatiu Autoimmune (ALPS), es considera un criteri de laboratori amb valors de IL-10 superiors a 20pg/mL

Segons els criteris establerts pel NIH, valors superiors a 300pg/mL son indicatius de ALPS degut a mutacions germinals o somàtiques en FAS. No obstant, segons criteris dels grups europeus, aquest valor de tall del sFASL es situa en 559pg/mL.

# 3. Aplicacions clíniques

- Sèrum a SEPSIS, CRS, IDPs
- Sobrenedant de cultius cel·lulars a Diagnòstic IDPs
- Líquid amniòtic
- Humor vitri
- Líquid cefaloraquidi

### 3. 2 Aplicacions clíniques en **sobrenedant**



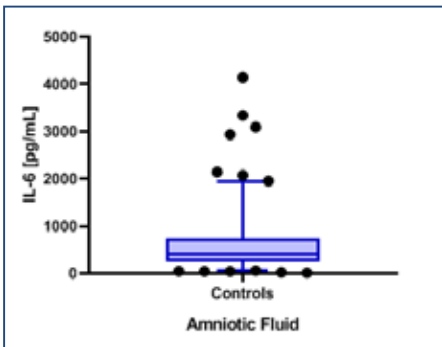
IL-12p70 } Defectes via IFN $\gamma$  (MSMD)  
IFN $\gamma$  }  
TNF $\alpha$  à IL10/IL10R (VEO-IBD)  
IL-1 $\beta$  à Inflamasoma



# 3. Aplicacions clíniques

- Sèrum → SEPSIS, CRS, IDPs
- Sobrenedant de cultius cel·lulars → Diagnòstic IDPs
- Líquid amniòtic → Corioamnionitis
- Líquid cefaloraquídi
- Humor vitri

# CORIOAMNIONITIS SUBCLÍNICA



Es recullen 147 mostres.  
 Valor Mig: 626 pg/mL. (mín: 13, max: 4141)  
 Valors de referència assumint un interval de confiança del 95% son 521-731 pg/mL.

Veure pòster

“Establiment de valors de normalitat de la concentració d’interleucina-6 en líquid amniòtic”. Cinta Rabaza

## ESTABLIMENT DE VALORS DE NORMALITAT DE LA CONCENTRACIÓ D'INTERLEUCINA-6 EN LÍQUID AMNIOÈTIC

Cinta Rabaza<sup>1</sup>, Alex Pérez<sup>1</sup>, Jose Gálvez<sup>1</sup>, Mar Goya<sup>2</sup>, Clara Franco-Jarava<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Immunology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.  
<sup>2</sup> Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

### INTRODUCCIÓ

**Què és la corioamnionitis?**  
 La **corioamnionitis** és la infecció del líquid amniòtic i de les membranes. S'associa amb el part preterm i la ruptura prematura de membranes.

**Com es pot tractar?**  
 La prevenció de la corioamnionitis consisteix en antibiòtics endovenosos i inducció del part si la dinàmica uterina s'atura.

El 80% de casos no es manifesta fins després del part, i els signes son febre >38°C, irritabilitat uterina i signes d'infecció fetal.

**Com es diagnostica actualment?**

- Cultiu de líquid amniòtic
- Elevació de reactants de fase aguda
- Increment LDH i esterasa leucocitària
- Leucocitosi materna
- Hemocultus

→ Poc específic  
Llarg temps

**PROPOSTA**  
 A nivell de recerca s'ha vist que **determinar IL-6 en líquid amniòtic** prediu la corioamnionitis amb un 100% de sensibilitat i un 83% d'especificitat. Alguns autors coincideixen que la IL-6 és el millor marcador d'infecció intra-amniòtica amb un valor de tall de 2600 pg/mL.

### OBJECTIU DE L'ESTUDI

Establir **una rang de normalitat** d'IL-6 en líquids amniòtics de la nostra població que permetin establir els intervals de referència pel diagnòstic precoç de corioamnionitis en menys de 3 hores.

### MÈTODES

**MOSTRES**  
 S'obtenen mostres de líquid amniòtic d'embarassades sense sospita de corioamnionitis, a les quals s'hi practica l'amniocentesi per estudi genètic.

**METODE**  
 S'estudia la concentració de IL-6 mitjançant immunoassaiig amb tecnologia de microfluids (ELLA Protein Simple).

### RESULTATS

Es recullen 147 mostres. El valor mig de IL-6 és de 626 pg/mL. Tot i que el valor mínim és de 13 pg/mL, i el màxim de 4141 pg/mL, els valors de referència assumint un interval de confiança del 95% son 521-731 pg/mL. Hi ha 4/147 mostres (2,72%) que superen el punt de tall de 2600pg/mL, establert a la bibliografia, però en cap d'aquestes es va arribar a un diagnòstic de corioamnionitis.

### CONCLUSIÓ

Aquestes dades van a favor del percentatge d'especificitat de 83% descrit per altres grups. Futurs estudis en pacients amb sospita de corioamnionitis permetran establir la sensibilitat de la tècnica.

Fig 1. Diagrama de caixa amb bigotes. La caixa representa el rang interquartílic i els bigotes indiquen el límit inferior i superior. Aquells valors que excedeixen 1,5 vegades el Rang interquartílic es consideren outliers i s'identifiquen amb un punt.

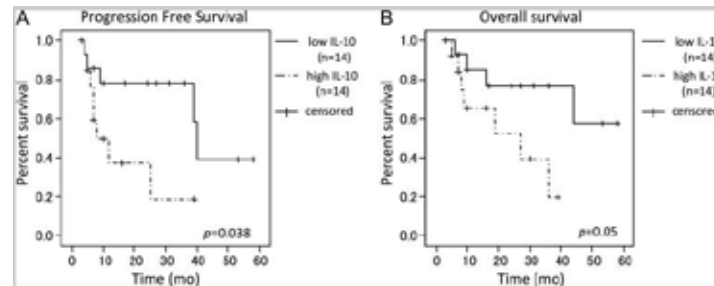
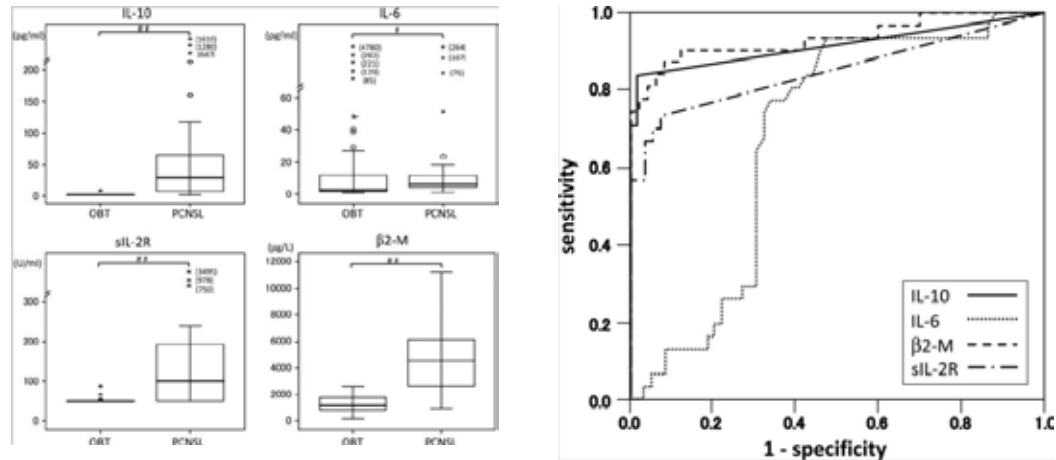
# 3. Aplicacions clíniques

- Sèrum à SEPSIS, CRS, IDPs
- Sobrenedant de cultius cel·lulars à Diagnòstic IDPs
- Líquid amniòtic à Corioamnionitis
- Líquid cefaloraquídi à Limfoma de sistema nerviós central primari (PCNSL)
- Humor vitri

### 3. 2 Aplicacions clíniques en LCR

## LINFOMA PRIMARI DE SNC

En la població immunocompetent, els LPSNC solen aparèixer en pacients entre els 50 i 60 anys. És important destacar que, s'ha informat d'haver augmentat la incidència de LPSNC en més de 10 vegades (de 2,5 casos a 30 casos per cada 10 milions d'habitants) en la població immunocompetent



# 3. Aplicacions clíniques

- Sèrum à SEPSIS, CRS, IDPs
- Sobrenedant de cultius cel·lulars à Diagnòstic IDPs
- Líquid amniòtic à Corioamnionitis
- Líquid cefaloraquídi à Limfoma de sistema nerviós central primari (PCNSL)
- Humor vitri à Linfoma intraocular primari vs. Uveïtis

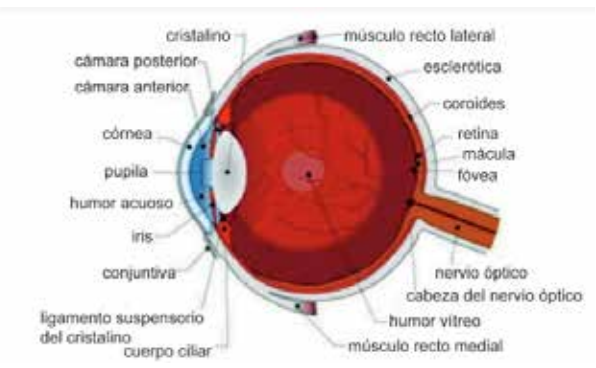
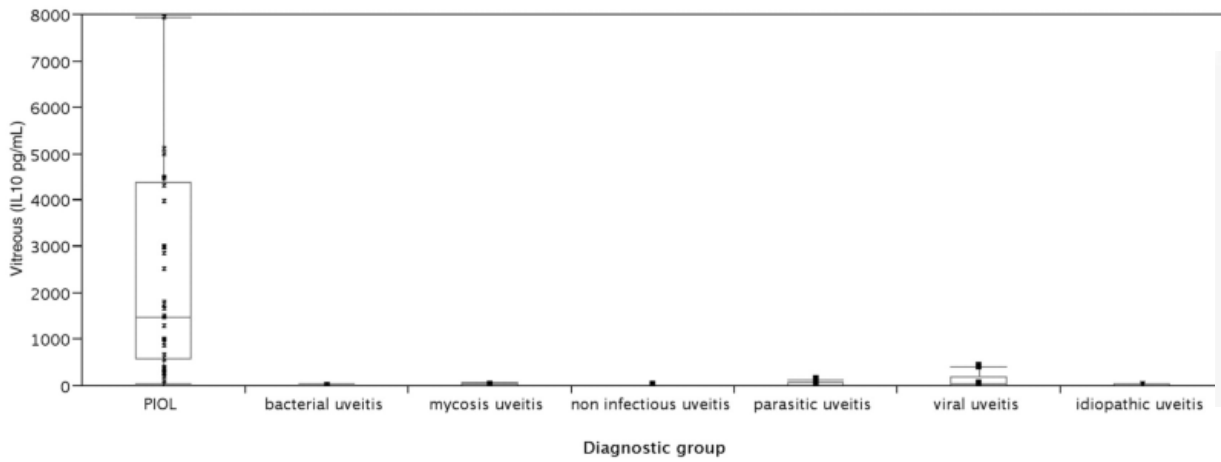
### 3. 2 Aplicacions clíniques en humor vitri / humor acuós

- El **limfoma intraocular primari** es un subtipus de limfoma primari del sistema nerviós central.
- És molt agressiu i la seva incidència a USA en l'última dècada s'ha triplicat.
- Els símptomes inicials son visió borrosa i de mosques volants à símptomes freqüentment atribuïts a uveïtis.
- Tècnica gold stàndard pel diagnòstic és l'exàmen citològic de l'humor vitri, però és molt difícil donat a la fragilitat de les cèl·lules del limfoma.
- Al voltant d'un 30% dels resultats son FALSOS NEGATIUS.

Arch Ophthalmol. 1997 Sep;115(9):1157-60.  
**Association of interleukin 10 in the vitreous and cerebrospinal fluid and primary central nervous system lymphoma.**  
 Whitcup SM<sup>1</sup>, Stark-Vancs V, Wittes RE, Solomon D, Podgor MJ, Nussenblatt RB, Chan CC.

**IL10:IL6 >1**

Immunology and Microbiology | July 2007  
**IL-10 Measurement in Aqueous Humor for Screening Patients with Suspicion of Primary Intraocular Lymphoma**  
 Nathalie Cassoux, Alain Giron, Bahram Rodaghi, Thi H. C. Trac, Sylvie Baudet, Frédéric Davy, Chi C. Chen, Phuc Lehoang, Hélène Marie-géral



**IL-10 level of 50 pg/mL, sensitivity was 89% and specificity 93%.**

# CONCEPTES CLAU

- Conceptes generals de les citocines
  - Polipèptids secretats per cèl·lules (importància de centrifugar ràpid post-extracció)
  - Sensibles a canvis de temperatura (no congelar/descongelar)
- Tècniques per quantificar citocines
  - LUMINEX (moltes citocines; 40 mostres/placa; duplicats; 2d o 8h)
  - ELISA (una única citocina; 40 mostres/placa; duplicats; 5h)
  - ELLA (fins a 4 citocines; 12 o 30 mostres/placa; triplicats; 2h)
- Aplicacions clíniques
  - No només a sèrum
  - Marcador diagnòstic i pronòstic
  - Valors de referència

# Agraïments

Servei d'Immunologia del Hospital Universitari Vall d'Hebron

Dr. Manuel Hernández  
Dr. Ricardo Pujol  
Dra. Mónica Martínez  
Dra. Romina Dieli

