

Títol del treball:

Utilitat de la procalcitonina en líquid cefaloraquidi en el diagnòstic d'infeccions del sistema nerviós central (SNC)

Estudiant: Laura Vilà i Quintana

Grau en Biologia

Correu electrònic: lauravq616@gmail.com

Tutor: Anna Massaguer Vall-llovera

Cotutor*: Patricia Tejerina Fontaiña

Empresa / institució: Institut Català de la Salut

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Anna Massaguer Vall-llovera

Nom del cotutor*: Patricia Tejerina Fontaiña

Empresa / institució: Institut Català de la Salut

Correu(s) electrònic(s): anna.massaguer@udg.edu i
ptejerina.girona.ics@gencat.cat

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

RESUM

Introducció: La meningitis és una infecció greu que necessita un diagnòstic ràpid per poder ser tractada de forma eficient. El diagnòstic actual es basa en tècniques de biologia molecular i altres microbiològiques com el cultiu bacterià, que requereix molt de temps cosa que dificulta un diagnòstic precoç. Per aquesta raó es busca un nou biomarcador, sobretot en meningitis bacteriana ja que són les que presenten una evolució pitjor en el pacient. Interessa un biomarcador específic i sensible per mostres de líquid cefaloraquídi (LCR) que ens doni informació per infeccions al sistema nerviós central (SNC). S'ha vist que la procalcitonina (PCT) sèrica és una proteïna que augmenta quantitativament en presència d'una infecció bacteriana.

Objectius: Valorar l'ús de la PCT com a biomarcador de meningitis en mostres de LCR comparant-lo amb altres biomarcadors específics existents: PCT en sèrum i lactat en LCR.

Mètodes: Des del laboratori clínic de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta durant un període de sis mesos es van recollir dades de PCT en sèrum i LCR, lactat, recompte de cèl·lules i leucòcits, proteïnes i glucosa en LCR de 48 pacients amb sospita clínica de meningitis. Es van incloure pacients amb meningitis bacteriana, ja fos adquirida a la comunitat o post quirúrgica, meningitis vírica i un grup control sense malaltia i es va comparar l'ús d'aquests biomarcadors a partir de corbes ROC i tests de Mann-Whitney.

Resultats: La mitjana de la concentració de PCT en LCR per els diferents grups estudiats va ser: 0,16 ng/mL (IQR=0,12, SD=0,13) pel grup de meningitis bacteriana (n=7), 0,147 ng/mL (IQR=0, SD=NA) pel grup de meningitis vírica (n=1) i 0,52 ng/mL (IQR=0,11, SD=2,05) pel grup no infeccions (n=37). Les diferències entre les medianes (95%) del grup bacterià i no infeccions van presentar un p-valor de: 0,7949 en els nivells de PCT en LCR, de 0,06184 en els nivells de PCT sèrica i de 0,008075 en els nivells de lactat en LCR. Els resultats de les corbes ROC comparant el grup bacterià respecte el no infeccions van resultar amb una AUC 0,9063 (95%, IC: 0,7591-1,0534) per la PCT en plasma, una AUC 0,5336 (95%, IC: 0,2875-0,7797) per la PCT en LCR i una AUC 0,9167 (95%, IC: 0,7661-1,0672) pel lactat en LCR.

Conclusions: Es suggereix que la PCT en LCR no és un bon biomarcador pel diagnòstic de meningitis comparat amb la PCT en sèrum i el lactat. En canvi, es suggereix que el lactat si que és un biomarcador vàlid pel diagnòstic de meningitis bacteriana.

RESUMEN

Introducción: La meningitis es una infección grave que necesita un diagnóstico rápido para poder ser tratada de forma eficiente. El diagnóstico actual se basa en técnicas de biología molecular y otras microbiológicas como el cultivo bacteriano, que requiere mucho tiempo lo que dificulta un diagnóstico precoz. Se busca un nuevo biomarcador, sobre todo en meningitis bacteriana ya que son las que presentan una evolución peor en el paciente, específico y sensible para muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) que nos dé información para infecciones en el sistema nervioso central (SNC). Se ha visto que la procalcitonina (PCT) sérica es una proteína que aumenta cuantitativamente en presencia de una infección bacteriana.

Objetivos: Valorar el uso de la PCT como biomarcador de meningitis en muestras de LCR comparándolo con otros biomarcadores específicos existentes: PCT en suero y lactato en LCR.

Métodos: Desde el laboratorio clínico del Hospital Universitario Doctor Josep Trueta durante un período de seis meses se recogieron datos de PCT en suero y LCR, lactato, recuento de células y leucocitos, proteínas y glucosa en LCR de 48 pacientes con sospecha clínica de meningitis. Se incluyeron pacientes con meningitis bacteriana, ya fuera adquirida en la comunidad o post quirúrgica, meningitis vírica y un grupo control sin enfermedad y se comparó el uso de los biomarcadores a partir de curvas ROC y tests de Mann-Whitney.

Resultados: La media de la concentración de PCT en LCR para los diferentes grupos estudiados fue: 0,16 ng/mL (IQR=0,12, SD=0,13) para el grupo de meningitis bacteriana (n=7), 0,147 ng/mL (IQR=0, SD=NA) por el grupo de meningitis vírica (n=1) y 0,52 ng/mL (IQR=0,11, SD=2,05) para el grupo no infeccioso (n=37). Las diferencias entre las medianas (95%) del grupo bacteriano y no infeccioso presentaron un p-valor de: 0,7949 para la PCT en LCR, de 0,06184 para la PCT sérica y de 0,008075 para el lactato en LCR. Los resultados de las curvas ROC comparando el grupo bacteriano respecto al no infeccioso resultaron con una AUC 0,9063 (95%, IC:0,7591-1,0534) por la PCT sérica, una AUC 0,5336 (95%, IC:0,2875-0,7797) para la PCT en LCR y una AUC 0,9167 (95%, IC:0,7661-1,0672) para el lactato en LCR.

Conclusiones: Se sugiere que la PCT en LCR no es un buen biomarcador para el diagnóstico de meningitis comparado con la PCT en suero y el lactato. En cambio, se sugiere que el lactato sí que es un biomarcador válido para el diagnóstico de meningitis bacteriana.

ABSTRACT

Introduction: Meningitis is a serious infection that in order to be treated efficiently needs a quick diagnosis. The current diagnosis is based on molecular biology and other microbiological techniques such as bacterial culture, which requires a lot of time and makes it difficult for an early diagnosis. For this reason, a new biomarker is sought especially in bacterial meningitis, since they are the ones that show a worse evolution in patient. We are looking for a specific and sensitive biomarker for cerebrospinal fluid (CSF) samples that give us relevant information for infections of the central nervous system (CNS). It has been shown that serum procalcitonin (PCT) is a protein that increases quantitatively in the presence of a bacterial infection.

Objectives: To assess the use of PCT as a meningitis biomarker in CSF samples comparing it with other existing specific biomarkers: PCT in serum and lactate in CSF.

Methods: From the clinical laboratory of the Hospital Universitari Doctor Josep Trueta for a period of six months, we collected data of PCT in serum and LCR, lactate, count of the cells and leukocyte, proteins and glucose in LCR of 48 patients with clinical suspicion of meningitis. We included patients with bacterial meningitis, either acquired in the community or post-surgical, viral meningitis and a control group without a disease and we compared the use of the biomarkers with ROC curves and Mann-Whitney tests.

Results: The average concentration of PCT in CSF for the different groups studied was: 0.16 ng/mL (IQR=0.12, SD=0.13) for the bacterial meningitis group (n=7), 0.147 ng/mL (IQR=0, SD=NA) for the group of viral meningitis (n=1) and 0.52 ng/mL (IQR=0.11, SD=2.05) for the non-infectious group (n=37). The median differences (95%) between the bacterial and non-infectious group presented a p-value of: 0.7949 at PCT levels in CSF, 0.06184 at serum PCT levels and 0.008075 at levels of lactate in CSF. The results of the ROC curves comparing the bacterial group to the non-infectious group resulted in an AUC 0.9063 (95%, IC:0.7591-1.0534) for PCT in plasma, an AUC 0.5336 (95%, IC:0.287-0.7797) for PCT in CSF and an AUC 0.9167 (95%, CI:0.7661-1.0672) for lactate in CSF.

Conclusions: It is suggested that PCT in LCR is not a good biomarker for the diagnosis of meningitis compared to the PCT in serum and lactate. In contrast, it is suggested that lactate is a valid biomarker for the diagnosis of bacterial meningitis.

ÍNDEX

1. MARC TEÒRIC	1
1.1. Què és la procalcitonina (PCT)	1
1.1.1. Estructura	1
1.1.2. Paper biològic	1
1.2. Paper de les infeccions del sistema nerviós central	3
1.3. Reactants de fase aguda: augment dels seus nivells en sèrum	4
1.4. La PCT com a biomarcador en mostres de LCR	5
1.5. Necessitat d'obtenir un nou biomarcador en LCR	5
2. OBJECTIVE	6
3. METODOLOGIA	7
3.1. Proves microbiològiques	8
3.1.1. Cultiu bacterià i tinció gram	8
3.1.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	8
3.1.3. Filmarray®	8
3.1.4. Tècnica d'immunocromatografia	9
3.2. Anàlisi del LCR	10
3.3. Tractament de dades	10
4. SOSTENIBILITAT I ÈTICA	11
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	12
6. CONCLUSIONS	19
7. AGRAÏMENTS	20
8. BIBLIOGRAFIA	20

1. MARC TEÒRIC

1.1. Què és la procalcitonina (PCT)

1.1.1. Estructura

La molècula de PCT és un pèptid de 116 aminoàcids d'aproximadament 14,5 KDa, i pertany a la superfamília de la calcitonina (CT). Es pot dividir en tres seccions incloent la terminal amino de la regió PCT, la calcitonina immadura i el pèptid terminal-carboxil-1 de la calcitonina (CCP-1, també conegut com a katalcalcina) (*Fig. 1*). Està codificada pel gen CALC-1 que es localitza al cromosoma 11. Primer de tot, un cop es produeix la transcripció primària del gen CALC-1, es dona una escissió que dona com a resultat la pre-PCT. Després, aquesta experimenta una sèrie d'escissions proteolítiques de la seva seqüència per produir la PCT. Un dels pèptids relacionats amb el gen de la calcitonina, concretament el pèptid I, també està codificat per CALC-1, i es genera per el tall i unió alternatiu del transcrit primari de l'RNAm de CALC-1. El pèptid II, en canvi, està codificat per altres gens.¹

L'expressió de la PCT es produeix de forma teixit- específica.¹

Es defineix com la precursora de la hormona calcitonina i és una proteïna que en presència d'endotoxines o citocines, com la interleucina-6 o el factor alfa de necrosis tumoral, pot ser alliberada per cèl·lules parenquimàtiques². Les endotoxines són els lipopolisacàrids (LPS) que es troben a la membrana externa de diversos bacteris gram-negatius i són reconegudes pel sistema immunitari³. Aquestes interactuen amb les cèl·lules a partir de receptors solubles en el plasma o receptors de membrana específics (CD13/CD14, CD16, Scd14, L-selectina, etc)³. Aquesta interacció, resulta en la producció d'un gran nombre de citocines pro inflamatòries (interleucina-6, factor alfa de necrosis tumoral)³. Així doncs, durant una inflamació bacteriana els nivells de PCT augmenten de forma significativa, però no ho fa en reaccions inflamatòries virals o no infeccioses².

1.1.2. Paper biològic

En absència d'infecció, la transcripció del gen CALC-1 per la PCT en teixits no neuroendocrins es troba suprimida, excepte en les cèl·lules C de la glàndula tiroide, on la seva expressió produeix PCT, la qual mitjançant un procés post-traduccional genera pèptids petits i CT madura, generada com a resultat de l'escissió de la glicina C-terminal de la CT immadura, a partir de l'enzim alfa amidant monooxigenasa peptidil-glicina (PAM). Seguidament, la CT madura s'emmagatzema a

grànuls secretors i és secretada a la sang per regular la concentració de calci. En canvi, en presència d'una infecció microbiana els teixits no neuroendocrins també expressen el gen CALC-1 per produir PCT. Així doncs, en una infecció microbiana s'indueix un augment substancial de l'expressió del gen CALC-1 en tots els teixits parenquimàtics i diferents tipus de cèl·lules diferenciades del cos produint PCT (Fig. 2). La funció de la PCT sintetitzada en els teixits no neuroendocrins sota infecció microbiana és actualment poc clara; tot i així, la seva detecció ha ajudat en el diagnòstic diferencial de processos inflamatoris.¹

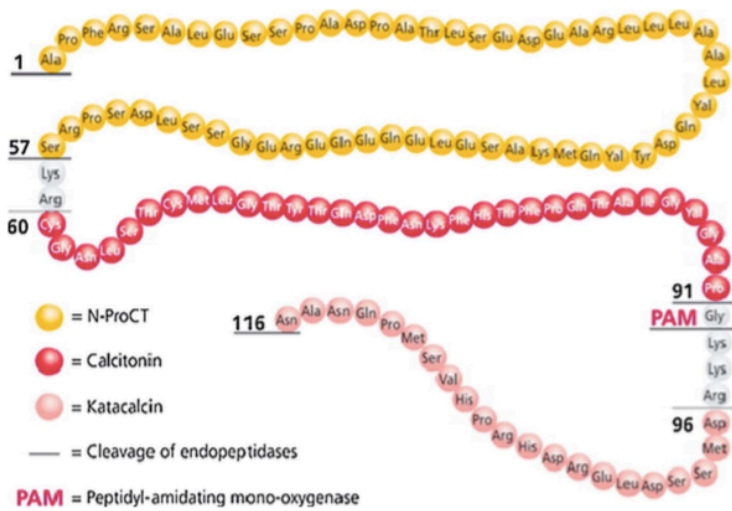


Figura 1: Representació del transcrit primari (RNAm) del gen CALC-1 donant lloc a la pre-PCT, de 116 aa dividida en tres seccions: terminal amino, calcitonina immadura, CCP-1. Localització de l'escissió proteolítica de la regió CCP-1 de la pre-PCT per formar calcitonina madura a partir de l'enzim PAM. Font: Memar *et al*, 2017.

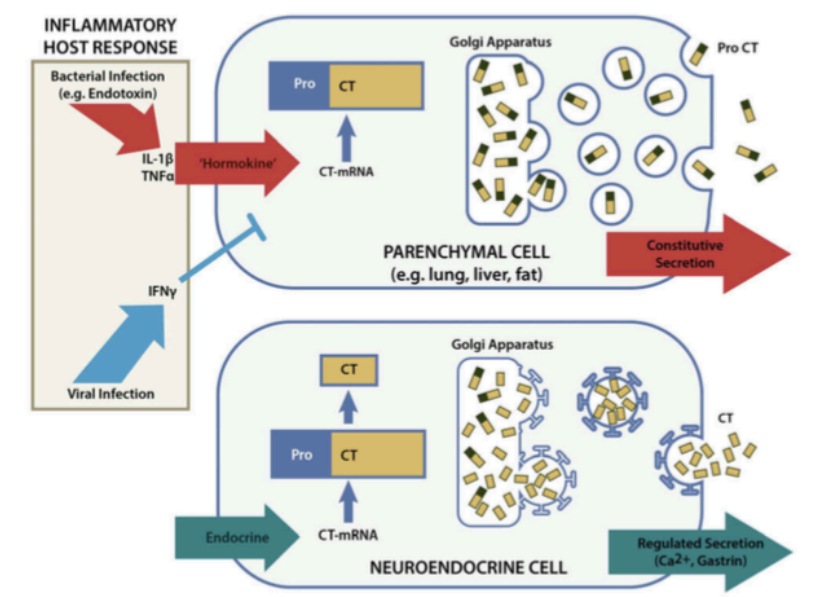


Figura 2: Diferents vies de síntesi de la PCT. Font:

<http://www.dynamed.com/topics/dmp~AN~T474234/Procalcitonin-guided-antibiotic-therapy>

1.2. Paper de les infeccions del sistema nerviós central

Les infeccions en el sistema nerviós central són un repte degut a la potencial mortalitat i morbiditat que suposen així com de les dificultats implicades en trobar un tractament. Aquestes infeccions principalment són la meningitis, l'encefalitis i abscessos en el cervell i tendeixen a causar una mitjana de mortalitat i morbiditat superior a les infeccions en altres sistemes orgànics.⁴

La meningitis és una condició severa que causa inflamació de les meninges, i per tant afecta la piamàter, la meninge aracnoide i a la duramàter⁵. Pot resultar de varies causes, tant infeccioses com no infeccioses, i poden estar causades per un agent bacterià, víric o fúngic.

La meningitis bacteriana és una condició que pot esdevenir fatal i que requereix d'un reconeixement i tractament temprà⁶. Després del període de nounat, les causes més comunes de meningitis bacteriana són: *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*⁶. Tots tres organismes són patògens respiratoris⁶. Són transmesos de persona a persona per contacte a partir de secrecions respiratòries⁶. Una vegada adquirit, cada espècie pot colonitzar la mucosa de la nasofaringe i l'orofaringe⁶. Des d'allà, poden creuar la mucosa i entrar a la sang⁶. Un cop a la sang, poden arribar a les meninges, causant meningitis, o a altres parts del cos causant altres síndromes⁶. S'estimen més d'1.2 milions de casos de meningitis bacteriana arreu del món cada any⁶. La incidència i el rang de casos de mortalitat per meningitis bacteriana varia segons la regió, el país, el patogen i l'edat del grup afectat⁶. Per exemple, als països africans els meningococs del grup A són els que causen més mortalitat⁶, mentre que a Catalunya el serotip B és el que causa més morts, tenint en compte que la vacunació en infants inclosa al calendari vacunal protegeix del grup C⁷. En qualsevol cas, sense tractament el rang de mortalitat pot ser del 70%, i un de cada cinc supervivents de meningitis bacteriana pot quedar amb seqüeles permanents com: pèrdua de capacitat auditiva o discapacitat neurològica⁶. A continuació, es classifiquen els patògens comuns segons la seva prevalença en la població de nounats, nens i adults i gent gran⁴:

- Nounats: *Streptococcus* grup B, *E.coli* i *Listeria monocytogenes*
- Nens: *Neisseria meningitides*
- Adults i gent gran: *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*

La meningitis vírica varia segons la situació geogràfica del pacient i la causa i origen del patogen causant de la infecció. En la gran majoria de meningitis víriques s'estima que el 90% dels casos en països en que hi ha immunització contra *Mixovirus parotiditis*, són causades per enterovirus

i solen afectar a nens. Tot i així els arbovirus, que són una sèrie de virus transmesos per vectors artròpodes, són la principal causa reportada de meningitis vírica als Estats Units d'Amèrica. En països en què no hi ha una vacuna contra el virus *M. parotiditis*, s'estima que aquest és la causa d'aproximadament el 30% dels casos de meningitis vírica.⁸

La meningitis fúngica sol aparèixer en pacient immune deprimits o que han patit intervencions neuroquirúrgiques. La causa principal en la majoria de casos implica una infecció respiratòria amb una disseminació hematògena. Els agents patògens comuns per la meningitis fúngica inclouen *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomycoses* i *Coccidioides immitis*.⁴

La meningitis pot aparèixer a qualsevol edat, però s'ha vist que els nadons són més susceptibles. Altres factors de risc poden incloure alguna infecció a la zona del cap o coll, tenir el sistema immunitari debilitat ja sigui per condició mèdica o tractament, treballar en laboratoris o altres zones on els patògens causants de la meningitis es manipulin o estiguin presents, haver patit algun tipus de cirurgia; sempre que aquesta permeti al bacteri arribar al sistema nerviós⁹. La recurrència a patir meningitis és possible però estranya⁹. Alguns estudis realitzats demostren que el 59% dels casos de recurrència es donen per defectes anatòmics, i un 36% apareix en persones amb el sistema immunitari debilitat⁹. Els exàmens per el diagnòstic de la meningitis inclouen anàlisi de sang, proves d'imatges i una punció espinal per examinar el líquid cefaloraquidi (LCR)¹⁰.

1.3. Reactants de fase aguda: augment dels seus nivells en sèrum

En la infecció per meningitis s'experimenta la resposta de fase aguda, que bàsicament reflecteix la inflamació aguda i crònica en curs. Els canvis que es produeixen en fase aguda es divideixen en: canvis en les concentracions de proteïnes plasmàtiques conegudes com proteïnes de fase aguda, canvis metabòlics, fisiològics com la leucocitosi i nutricionals, que es presenten a partir d'unes hores després de l'estímul inflamatori. Les proteïnes de fase aguda són aquelles la concentració de les quals augmenta o disminueix com a mínim un 25% durant la inflamació. Les que augmenten es coneixen com a reactants positius, i són produïdes per hepatòcits sota l'estímul de citocines secretades per monòcits activats, macròfags o cèl·lules endotelials. Aquestes citocines pro inflamatòries són inductores d'una reacció multi orgànica que involucra el fetge, el sistema nerviós central, el sistema immunitari, la medul·la òssia i el sistema vascular. Les principals proteïnes de fase aguda són: la proteïna C-reactiva, alguns components del complement sèric, el fibrinogen, l'amiloide A sèric (AAS), l'alfa-1 antitripsina, la ceruloplasmina

i l'haptoglobina. Només passades unes hores després de l'estímul inicial, els nivells sèrics de proteïna C- reactiva i amiloide A sèric (AAS) augmenten més de 1000 vegades en estadis inflamatoris severos i infeccions. En el cas de la PCT quan hi ha una infecció severa, pot ser produïda durant un període prolongat de temps per diversos tipus de cèl·lules, i els seus nivells poden elevar-se molt més en comparació amb aquests paràmetres d'infeccions microbianes i aquest nivell persisteix fins a la recuperació.¹¹

Per aquesta raó, els nivells de PCT en sèrum es correlacionen amb la severitat de la infecció i amb la mortalitat¹¹, i en els darrers anys s'ha demostrat la utilitat d'aquesta com a marcador diagnòstic de sèpsies en unitats de cures intensives, en comparació amb altres biomarcadors d'inflamació¹². S'han fet estudis comparatius de la seva especificitat i sensibilitat amb la proteïna C reactiva, i s'ha pogut demostrar l'elevat poder acurat d'aquesta respecte l'altre, per diferenciar entre meningitis bacteriana i vírica¹². També ha estat indicat en diversos estudis que la seva concentració en sèrum té un valor pronòstic superior comparat amb d'altres variables mèdiques usades en la descripció del síndrome de la resposta inflamatòria sistèmica (SIRS), que són temperatura anormal, taquicàrdia, taquipnea i recompte anormal de glòbuls blancs en sang¹³.

1.4. La PCT com a biomarcador en mostres de LCR

A nivell clínic interessa trobar un biomarcador efectiu per a mostres de LCR, ja que presenta molts avantatges en l'estudi de condicions neurodegeneratives i neuroinflamatòries, tot i que és molt més invasiu que el mostreig amb orina o sang ja que s'extreu a partir d'una punció lumbar. Degut a la seva proximitat al sistema nerviós central, el LCR reflecteix de millor manera l'evolució de la patologia en el cervell, medul·la espinal i meninges, i per tant proveeix informació important.¹⁴

L'èxit de l'ús de la PCT en sèrum com a biomarcador per la determinació de meningitis bacteriana, ha plantejat l'estudi de l'efectivitat de la PCT en mostres de LCR, ja que en els dos casos la seva concentració augmenta durant una infecció, i per tant tots dos poden servir com a marcadors diagnòstic¹⁵. Vist els avantatges de les mostres de LCR per a l'estudi d'infeccions neuroinflamatòries, interessa valorar la utilitat de la PCT en LCR.

1.5. Necessitat d'obtenir un nou biomarcador en LCR

Generalment, el diagnòstic de meningitis recau en tests microbiològics i troballes al laboratori. Els símptomes clínics per a la meningitis són ambigus i el diagnòstic actual manca de sensibilitat².

La identificació del patogen a través de cultius bacterians i tinció gram de mostres de LCR és molt específic, però, la sensibilitat del cultiu bacterià i la tècnica de la tinció és baixa i ha estat reportat que gairebé la meitat dels pacients amb meningitis bacteriana tenen troballes microbiològiques negatives¹⁵. A més, són tècniques que requereixen molt de temps, pel que fa un diagnòstic precoç impossible¹⁶. L'anàlisi de leucòcits, el nivell de proteïnes en LCR i el nivell de glucosa en LCR poden servir com a mètodes alternatius pel diagnòstic de meningitis bacteriana, però la seva sensibilitat no és suficientment alta i poden no complir-se en el 12% dels pacients². Així doncs per a millorar el diagnòstic actual de meningitis, es creu necessari l'estudi de la PCT en LCR com a biomarcador. Tot i així, actualment encara no hi han dades disponibles de la seva estabilitat en LCR, però es coneix que depèn bàsicament de les característiques del pacient i de la mostra¹⁷.

Recentment s'ha proposat el lactat com a biomarcador potencial en mostres de LCR per a la diferenciació entre infecció i inflamació (meningitis infecciosa o no infecciosa), i entre meningitis bacteriana respecte la vírica gràcies al seu poder discriminatori. Això és degut a que s'ha establert que la seva producció en LCR, per part dels astròcits, és desencadenada per les infeccions bacterianes.¹⁸

Per aquesta raó, algunes investigacions recents suggereixen que la combinació del lactat i la PCT en mostres de LCR poden permetre el diagnòstic precoç de meningitis bacterianes respecte les infeccions no bacterianes.¹⁸

2. OBJECTIVE

The initial objective is to know if the PCT in cerebrospinal fluid (CSF) samples can be used as a biomarker to determine viral or bacterial infections in the central nervous system.

To do so, in this study we aim:

- To compare the PCT levels in CSF samples between patient groups: bacterial meningitis, viral meningitis, non-infectious group.
- To compare the PCT levels in CSF samples and PCT levels in serum samples in each group: bacterial meningitis, viral meningitis and non-infectious group.
- To compare the PCT levels in CSF samples and Lactate levels in CSF samples in each group: bacterial meningitis, viral meningitis and non-infectious group.

3. METODOLOGIA

Des del Desembre del 2017 fins al Maig del 2018, es van recollir dades de pacients que es sotmetien a una punció lumbar i a l'extracció d'una mostra de sang a causa de la sospita clínica d'un diagnòstic de meningitis.

Es van recollir dades d'un total de 48 pacients, però per tal d'utilitzar-les per la realització de l'estudi, es van definir uns criteris d'inclusió i exclusió. Es va tenir en compte l'edat del pacient, el qual havia de ser adult (>18).

Es van dividir els pacients en tres grups segons els criteris citobioquímics; valors de glucosa, proteïnes i cel·lularitat en LCR. Primer, el grup de meningitis bacteriana, ja fos adquirida a la comunitat o després d'una intervenció quirúrgica (post quirúrgica), segon un grup de meningitis vírica i per últim, el grup control sense malaltia, la punció lumbar dels quals es realitza per sospita clínica.

Dels 48 pacients, es va tenir en compte els valors de la PCT (ng/mL) en LCR i en plasma, el lactat en LCR (mg/dL), el recompte de leucòcits (mCL), les proteïnes en LCR (mg/dL), la glucosa en LCR (mg/dL), les cèl·lules polinucleades (%), les cèl·lules mononucleades (%) i els resultats de les proves microbiològiques realitzades amb cadascun d'ells.

Els rangs establerts pel laboratori de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta que s'han tingut en compte per a cadascun dels paràmetres són:

- Glucosa en LCR: 50-80 mg/dL
- Proteïnes en LCR: 15-45 mg/dL
- Lactat: 5-15 mg/dL
- PCT en sèrum: <0,5 ng/mL
- El valor de referència de la PCT en LCR es desconeix ²

Així doncs, un pacient amb valors fora dels rangs citats anteriorment pels paràmetres estudiats era considerat com a sospitós de patir meningitis, de manera que es procedia a realitzar les proves microbiològiques, que serveixen per a la identificació del patogen i per facilitar el tractament específic posterior. Inclouen: cultiu bacterià, tinció gram, identificació de patogen a partir de proves de biologia molecular com reacció en cadena de la polimerasa (PCR) o Filmarray® i detecció de l'antigen de *S. pneumoniae* en mostres de LCR a partir de la tècnica d'immunocromatografia. Es poden fer varies proves microbiològiques per a cada mostra. A continuació, es descriuen aquestes proves que es duen a terme al laboratori clínic de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta.

3.1. Proves microbiològiques

3.1.1. Cultiu bacterià i tinció gram

El cultiu bacterià permet identificar la presència de bacteris patògens. La tinció gram permet identificar i diferenciar entre gram positius i gram negatius gràcies a les diferències estructurals de la paret bacteriana. Aquesta última és una tècnica que es basa en estendre una colònia de bacteris sobre un portaobjectes i fixar la preparació amb alcohol al 50%. Seguidament s'afegeix cristall violeta fins cobrir l'extensió i es deixa un minut. Després, es fa un rentat amb aigua, i s'afegeix lugol fins a cobrir la preparació durant un minut. Es torna a rentar amb aigua tot inclinant el portaobjectes. Tot seguit s'afegeix alcohol-acetona durant un minut màxim, passat aquest temps es treu l'excés amb aigua i per últim s'hi afegeix safranina cobrint l'extensió durant un minut. Es fa l'últim rentat amb aigua i es deixa assecar.¹⁹

Els positius tenen una capa molt gruixuda de peptidoglicà, i durant el procés de tinció gram retenen el cristall violeta de manera que s'observen de color blau o violeta al microscopi òptic. En canvi, els negatius tenen una capa molt més prima de peptidoglicà, i no retenen el cristall violeta a la tinció gram i per això apareixen de color rosa al microscopi òptic.²⁰

3.1.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La tècnica de la PCR a temps real es basa en usar l'habilitat de la DNA polimerasa per a sintetitzar una nova cadena de DNA complementària a la que s'utilitza com a plantilla. La DNA polimerasa només pot afegir un nucleòtid a un grup 3'-OH preexistent, de manera que necessita un *primer* per poder afegir el primer nucleòtid. Aquest requisit permet delinear una regió específica de la seqüència de DNA plantilla que l'investigador vol amplificar. Al final de la PCR, la seqüència específica serà acumulada en billons de còpies (amplicons).²¹

Per a dur a terme una PCR, és necessari una mostra de DNA, *primers* específics i uns paràmetres d'amplificació establerts. En aquest cas, les PCR ens permeten la identificació i detecció de bacteris com *neisseria meningitidis* i pneumococs, i també la identificació dels virus: VHS-1, VHS-2, VHZ, *cytomegalovirus* i enterovirus.

3.1.3. Filmarray® Meningitis/Encephalitis ME

Filmarray® ME consisteix en una prova diagnòstica qualitativa de reacció PCR múltiple, que permet detectar de forma simultània a 14 patògens en una única mostra de LCR.²²

Les seves dianes inclouen bacteris, virus i fongs (*Taula 1*). Es tracta d'una prova automatitzada que consta d'un vial d'injecció de la mostra i un vial d'injecció d'hidratació, que s'han d'incorporar en el cartutx seguint un procediment abans de començar amb l'anàlisi d'aquest. Primer de tot, s'hidrata el cartutx. El vial d'injecció d'hidratació s'insereix en el port d'hidratació del cartutx, s'empeny cap a baix fins que la solució d'hidratació s'introdueix en el cartutx. Llavors, es prepara la mostra. La mostra de LCR s'ha de barrejar amb el tampó per la mostra en el vial d'injecció de la mostra. Un cop fet això, aquest vial es situa en el port de mostra del cartutx, s'empeny avall fins que la mescla s'introdueix a l'interior del cartutx. Llavors, ja es pot procedir a fer l'anàlisi d'aquest perquè posteriorment es puguin veure els resultats en pantalla.²³

Taula 1: Dianes de FilmArray® ME. Font: <http://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/filmarrayr-panel-meningitisencefalitis-me>

Virus	Bacteris	Fongs
Citomegalovirus (CMV)	<i>Escherichia coli k1</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Enterovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	
Virus herpes simple 1 (VHS—1)	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Virus herpes simple 2 (VHS-2)	<i>Neisseria meningitidis</i>	
Herpes virus humà 6 (HHV-6)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
Parechovirus humà	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Virus herpes Zoster (VHZ)		

3.1.4. Tècnica d'immunocromatografia

La tècnica d'immunocromatografia és una prova diagnòstica ràpida per la detecció qualitativa de l'antigen de *S.pneumoniae*. Binax NOW® *S.pneumoniae*, permet el diagnòstic en LCR del polisacàrid C de *S.pneumoniae*, comú a tots els serotips pneumococs.²⁴

El procediment és molt senzill; es disposa d'una targeta d'anàlisi i una caixa de lectura dels resultats. Es submergeix un bastonet a la mostra de LCR i s'introdueix a l'orifici inferior de la targeta, empenyent-lo cap a munt de manera que la punta del bastonet sigui visible per la part

superior. Llavors, s'afegeixen tres gotes de reactiu a l'orifici inferior de la targeta. Es retira el paper adhesiu de la targeta d'anàlisi perquè quedi tancada i es deixa durant 15 minuts. Posteriorment, s'insereix el dispositiu de la prova a la caixa i es llegeixen els resultats.²⁵

3.2. Anàlisi del LCR

L'anàlisi del LCR consta d'un examen físic, en el qual s'analitza el color, la terbolesa i la coagulació. El LCR ha de ser incolor, si és groguenc és símptoma d'infecció. Si té color vermell pot ser degut a una hemorràgia per punció traumàtica durant l'extracció. Si el LCR és tèrbol, pot significar un augment dels elements cel·lulars o la presència de bacteris. La coagulació pot esdevenir d'una punció traumàtica o d'un nivell molt elevat de proteïnes.²⁶

Seguidament es fa el recompte de cèl·lules, ja que es tracta d'una mostra amb baix contingut de proteïnes i les cèl·lules lisen a mesura que passa el temps, per tant s'ha de fer el més ràpid possible²⁶. Es poden usar diverses tècniques, però la més coneguda és la càmera de Neubauer²⁷. Llavors, es fa el recompte diferencial amb la tècnica de Giemsa, per identificar els diferents tipus cel·lulars²⁷. El LCR normalment només conté limfòcits (cèl·lules mononucleades), però en presència d'una infecció poden aparèixer neutròfils, eosinòfils i basòfils (cèl·lules polinucleades)²⁶. Per a l'examen químic, concretament la determinació de glucosa, proteïnes totals, PCT i lactat, es fan servir mètodes espectrofotomètrics en analitzadors automatitzats²⁸.

3.3. Tractament de dades

Un cop recollides i ordenades les dades en grups d'anàlisi (bacterià, víric, no infeccions) segons el diagnòstic del pacient tenint en compte els valors dels paràmetres i els resultats dels tests microbiològics, es procedeix a fer l'anàlisi amb el programa estadístic R Studio® i EPIDAT per les corbes ROC. Primer de tot es calculen les diferències mitjanes dels nivells de PCT entre els grups. Per a fer-ho es realitza una taula resum amb la mitjana, la desviació estàndard i el rang interquartil (IQR) per la PCT en LCR, en plasma i el lactat en LCR en cadascun dels grups d'anàlisi. Per tal d'identificar diferències entre els grups d'infecció (meningitis bacteriana i meningitis vírica) i no infecció per la PCT en plasma, LCR i lactat s'utilitza el test Mann-Whitney; una prova no paramètrica que mesura aquestes diferències a partir de la mediana dels dos grups de mostres independents²⁹. S'utilitza un interval de confiança (IC) del 95%, i si aquest interval no conté el valor de la diferència, llavors aquesta és significativa i el p-valor $<0,05$ ². A més, per valorar la propietat discriminatòria de la PCT en LCR, en plasma i lactat en infecció bacteriana o vírica respecte no infecció, es fan corbes ROC. Aquesta és útil quan la variable que utilitzem per

a realitzar un diagnòstic és quantitativa i contínua, de manera que és possible utilitzar diferents punts de tall³⁰. Els valors de PCT entre les persones amb infecció bacteriana o vírica i sense infecció, segueixen una distribució diferent. Tot i així, les dos distribucions es poden solapar, i tenir persones sense infecció per sobre el punt de tall (falsos positius) i persones amb infecció per sota el punt de tall (falsos negatius)³⁰. Doncs, la corba ROC resulta d'unir els diferents valors de sensibilitat i especificitat per a cada punt de tall³⁰, i quantifica la capacitat d'un indicador diagnòstic, en aquest cas la PCT, per discriminar entre malalts i sans³¹. La prova diagnòstica tindrà més capacitat de classificació com més gran sigui l'àrea sota la corba³⁰. Aquesta àrea equival a la probabilitat que, si s'agafessin dos individus a l'atzar, un amb infecció i l'altre sense, la prova classificaria a tots dos correctament³⁰. Així doncs, si l'àrea sota la corba és de 0,5 hi ha la mateixa probabilitat de classificar un malalt com a sa, que com a malalt³⁰. S'interpreta com a una prova no informativa, ja que no redueix el grau d'incertesa de si el pacient pateix infecció o no³⁰. Es busca una àrea de la corba superior al 0,5 per que sigui informativa i superior a 0,75 per que sigui discriminatòria entre malalts i sans.

4. SOSTENIBILITAT I ÈTICA

Per a la realització d'aquest estudi es va seguir el model de l'estudi prospectiu de diagnòstic publicat per Imanda M.E. Alons *et Al* que avalua l'ús de la PCT en mostres de LCR en meningitis, i no es va sol·licitar el consentiment dels pacients per a participar degut a que la PCT ja es troba disponible en mostres de LCR i sang, i no van ser necessaris volums de mostreig addicionals per a dur-lo a terme. A més, els pacients van ser tractats i investigats d'acord amb la pràctica clínica i no van ser sotmesos a cap test o qüestionari addicional.

La meningitis és una condició severa que moltes vegades pot ser curada mitjançant un reconeixement del patogen i un tractament temprà. En el cas de la meningitis bacteriana, un diagnòstic eficient i acurat per part dels microbiòlegs del laboratori clínic, serveix com a guia a l'hora de decidir un antibiòtic eficaç així com per trobar tractaments alternatius pel pacient.⁶ Doncs, el paper del laboratori de microbiologia és essencial per prevenir la morbiditat i la mortalitat per meningitis.⁶

La incidència d'aquesta malaltia és especialment alta en els països de l'Àfrica subsahariana, del Senegal a l'oest fins a Etiòpia del est, incloent 26 països³², on s'ha establert que el nombre d'afectats per meningitis meningocòccica és molt més elevat que a la resta del món, causant danys cerebrals i sent mortal en el 50% dels casos no tractats³². Aquests països africans estan considerats en perill de registrar epidèmies de meningitis³². Així doncs, si es provés que la PCT és un biomarcador sensible i específic en mostres de LCR per el diagnòstic de meningitis, i ens

permetés diferenciar entre bacteriana i vírica, es disminuiria la mortalitat i morbiditat d'aquesta malaltia en els països afectats, ja que permetria un diagnòstic eficaç i un tractament amb antibiòtic temprà. A més, amb un major nombre de pacients diagnosticats i tractats es podria crear una vacuna preventiva segons els resultats del serogrup o serotip dels aïllats de meningitis bacteriana de la població afectada⁶.

A Catalunya, la incidència de malaltia meningocòccica ha presentat una davallada progressiva important al llarg del temps gràcies a la vacuna generalitzada de la població i a la millora de les condicions higièniques, però cada any es presenten uns 50-60 casos⁷. La franja de població afectada són principalment els nounats i la tercera edat³³. Una troballa d'aquestes característiques a nivell clínic, faria que la meningitis tingués una incidència cada vegada més baixa i que el tractament contra aquesta fos molt més eficient i ràpid, disminuint així la possibilitat de causar danys cerebrals permanents o morts.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Seguint els criteris d'inclusió i exclusió per a la realització d'aquest estudi, dels 48 pacients se'n van excloure tres ja que pertanyien a pediatria (<18), deixant un total de 45 pacients.

D'aquests 45 pacients es recullen els resultats i les característiques a la *Taula 2* i *Taula 3*. A la *Taula 2* es poden comparar els resultats obtinguts entre els diferents grups d'anàlisi. Pel diagnòstic de pacients amb meningitis bacteriana (n=7), s'espera pleocitosi polinuclear, és a dir un increment en el nombre de cèl·lules tipus basòfils, eosinòfils i neutròfils³⁴, un elevat recompte de leucòcits, disminució de glucosa en LCR i elevat nombre de proteïnes en LCR². En canvi, pel diagnòstic de pacients amb meningitis vírica (n=1) s'espera pleocitosi mononuclear, significativament un increment en el nombre de cèl·lules amb un únic nucli com els limfòcits o monòcits³⁴, elevat recompte de leucòcits, nivells de glucosa en LCR normals i un possible augment de proteïna en LCR². El recompte de leucòcits pel grup de meningitis bacteriana (14481,71 leucòcits/mcL) és significativament més elevat que el grup no infeccios (331,33 leucòcits/mcL), i en aquest cas també ho és respecte el de meningitis vírica (193 leucòcits/mcL) ja que s'esperaria que aquest mostrés un valor més elevat que el grup no infeccios. En quan a cèl·lules polinucleades passa el mateix, és superior en el grup de meningitis bacteriana (83,42 %) respecte el no infeccios (56,64%) i respecte el víric (10%), en canvi aquest últim té un valor inferior respecte el no infeccios. Passa el contrari per les cèl·lules mononucleades, on el grup de meningitis víric (90%) té un valor superior respecte el grup de meningitis bacteriana (16,58%) i el no infeccios (49,25%), mentre el bacterià té un valor inferior que el grup no infeccios. Per la glucosa i les proteïnes en LCR, s'observa una disminució de glucosa (31,57 mg/dL) en el grup bacterià respecte el no

infeccions (100,51 mg/dL) i un augment de proteïnes (350,81 mg/dL) comparat amb el no infeccions (86,11 mg/dL). En el cas del grup víric, el nivell de glucosa (75 mg/dL) és més baix que el no infeccions i el de proteïnes més elevat (101,1 mg/dL). Per a tots aquests paràmetres es compleix el que s'esperava per a cadascun dels grups.

En quan als nivells de PCT, s'esperaria un valor més elevat en els grups amb infecció respecte el no infeccions. S'observa que pel grup de meningitis bacteriana es compleix en plasma (11,71 ng/mL (SD 16.10, n=7) > 3,39 ng/mL (SD 17.64, n=37)), però no es compleix en LCR (0,16 ng/mL (SD 0.13, n=7) < 0,52 ng/mL (SD 2.05, n=37)). Tot i així cal tenir en compte que l'IQR de la PCT en plasma d'aquest mateix grup és molt més elevat (IQR 11,39) que el del paràmetre de PCT en LCR (IQR 0,12), significant una major dispersió de les dades³⁵. En canvi, en cap cas es compleix pel grup víric, on el valor sempre és més baix comparat amb el grup no infeccions. Si es comparen els valors de PCT entre el grup víric i bacterià, es veu que la diferència és molt baixa, essent el valor del grup bacterià superior (0,16 ng/mL > 0,147 ng/mL). Estudis anteriors donaven a conèixer resultats conflictius sobre la PCT en grup bacterià respecte el víric, ja que alguns afirmen que hi ha concentracions significativament altes de PCT en pacients amb meningitis bacterianes respecte els pacients amb meningitis vírica², en canvi altres demostren que no hi ha diferència entre la meningitis bacteriana i la vírica².

Pel lactat no disposem de dades en el grup víric. Tot i així, s'espera que el nivell de lactat en LCR en el grup de pacients amb meningitis bacteriana sigui superior al grup sense infecció, cosa que es compleix (90,25 mg/dL (SD 53.21, n=7) > 27,60 mg/dL (SD 15.47, n=37)). Cal mencionar que la dispersió de dades d'aquest paràmetre per aquest grup és molt elevat (IQR 78,25) tenint en compte la n total (n=7).

A la *Taula 3* es presenten les característiques dels pacients i es posa de manifest tres qüestions importants: la primera és la predominança del sexe masculí en tots els grups, essent el percentatge en cadascun d'ells superior al 50%. La segona és que el percentatge de cultius positius per al diagnòstic de meningitis bacteriana és molt baix (57,1%), demostrant la baixa sensibilitat d'aquesta tècnica. La tercera és l'escassetat de mostres en el grup de meningitis vírica, ja que només està comprès per un pacient. Això suposa, que l'anàlisi estadístic comparatiu entre els grups d'infecció bacteriana i infecció vírica respecte el de no infecció no es pugui realitzar, ja que una sola mostra no representa un grup poblacional i no es pot obtenir el valor de la mediana, que és el nombre intermedi d'un conjunt de nombres ordenats de menor a major³⁶, per poder fer el test de Mann-Whitney. A més, en el cas de la corba ROC és necessari tenir dos poblacions, una de malalts i l'altre de sans, per poder determinar si l'indicador permet una classificació correcta³¹. Al només tenir una sola dada per la població de malalts, no ens permet realitzar l'anàlisi estadístic.

Taula 2: Recompte de cèl·lules, nivell de glucosa, proteïnes i PCT en LCR, PCT en plasma i lactat per grup

	Meningitis bacteriana (n=7)	Meningitis vírica (n=1)	No infecció (n=37)
Leucòcits LCR /mCL mitjana	14481,71	193	331,33
Cèl·lules polinucleades en % mitjana	83,42	10	56,64
Cèl·lules mononucleades en % mitjana	16,58	90	49,25
Glucosa LCR mg/dL mitjana	31,57	75	100,51
Proteïnes LCR mg/dL mitjana	350,81	101,1	86,11
PCT en LCR ng/mL mitjana (IQR) (SD)	0,16 (0,12)(0,13)	0,147 (0,00) (NA)	0,52 (0,11) (2,05)
PCT en plasma ng/mL mitjana (IQR) (SD)	11,71 (11,39) (16,10)	0,022 (0,00) (NA)	3,39 (0,12) (17,64)
Lactat en LCR mg/dL mitjana (IQR) (SD)	90,25 (78,25) (53,21)	-	27,60 (12,25) (15,47)

Taula 3: Característiques dels pacients

	Meningitis bacteriana (n=7)	Meningitis vírica (n=1)	No infecció (n= 37)
Edat mitjana (SD)	55,3 (SD 10,5)	72	59,7 (SD 14,8)
Sexe masculí (% respecte n)	5 (71,4%)	1 (100%)	24 (64,9%)
Cultiu positiu (% respecte n)	4 (57,1%)	1 (100%)	0

Per aquesta raó, tenint en compte les característiques dels grups d'anàlisi descrits a la *Taula 3*, per dur a terme l'anàlisi estadístic de l'estudi s'ha cregut convenient tenir en compte un sol grup d'infecció i un de no infecció. Primerament s'havia contemplat la possibilitat d'agrupar les dades dels pacients de meningitis bacteriana i les del pacient amb meningitis vírica sota el mateix, però amb els resultats d'aquest últim, que no compleix el que s'esperava respecte el grup no infecció en quan a la PCT i, no ens facilita la dada pel lactat, s'ha decidit extreure aquest pacient i fer anàlisi estadístic comparatiu entre el grup bacterià i el no infecció, per tal de disminuir la desviació i obtenir uns resultats més fiables.

Per tant, a la *Taula 4* s'observen els resultats pel test no paramètric de Mann-Whitney per a la PCT en plasma, en LCR i el lactat en LCR pel grup d'infecció bacteriana respecte el no infecció. Per tal d'interpretar aquest test es té en compte el p-valor, comparant-lo amb el nivell de significança, que és de 0,05³⁷. A partir d'aquí, tenim dos hipòtesis, la nul·la i l'alternativa. La hipòtesi nul·la diu que la diferència entre les medianes de les poblacions no és estadísticament significativa, mentre que l'alternativa diu que la diferència en les medianes de les poblacions és estadísticament significativa³⁷. Això significa que si el p-valor > 0,05, s'accepta la hipòtesi nul·la, mentre que si el p-valor < 0,05 s'accepta la hipòtesi alternativa³⁷. Els resultats obtinguts són que per la PCT, ja sigui en plasma (p-valor=0,06184) o en LCR (p-valor=0,7949) el p-valor>0,05, de manera que acceptem la hipòtesi nul·la, és a dir, que la diferència entre les medianes de les poblacions de pacients amb meningitis bacteriana respecte els pacients amb no meningitis no són significatives per el biomarcador de la PCT.

En canvi, pel lactat en LCR (p-valor=0,008075) el p-valor<0,05, de manera que acceptem la hipòtesi alternativa per aquest cas; es pot concloure que la diferència entre les medianes de les poblacions de pacients amb meningitis bacteriana respecte els pacients amb no infecció és significativa per aquest biomarcador.

Taula 4: Resultats del test Mann Whitney per la PCT en plasma, PCT en LCR i lactat en LCR entre el grup bacterià i no infecció

	PCT en plasma	PCT en LCR	Lactat en LCR
P-valor	0,06184	0,7949	0,008075

L'estadístic de Mann-Whitney equival a l'àrea sota la corba ROC³⁸, els resultats de la qual es mostren a la *Taula 5*. El p-valor resultant del test no paramètric, si és significatiu (< 0,05), l'àrea

sota la corba ROC ha de ser major (proper a 1), significant una major especificitat i sensibilitat del biomarcador per aquestes dues poblacions de pacients amb meningitis bacteriana respecte els pacients sense infecció.

Així doncs, tenint en compte els resultats de la *Taula 4* i observant els de la corba ROC a la *Taula 5*, es pot veure com pel lactat en LCR es compleix la premissa anterior. El test no paramètric de Mann-Whitney mostra que per aquest marcador les diferències són significatives, de manera que s'espera una àrea sota la corba ROC gran, sent aquesta de 0,9167 (IC 0,7661 – 1,0672 i SD 0,0768 pel mètode de DeLong *et al*). Això vol dir que el lactat discrimina molt bé als sans, pacients sense infecció, respecte als malalts, essent els pacients amb meningitis bacteriana, és a dir, que les dos distribucions de les poblacions casi no es solapen. A més, el valor de AUC = 0,9167 té una interpretació pràctica; la probabilitat de que un malalt obtingui un valor més extrem que un sa és del 91,67%, o que de totes les possibles parelles formades entre un sa i un malalt, en un 91,67% d'aquestes el pacient malalt té un valor pel lactat més patològic que els sans³¹ (*Fig. 3*). A mesura que més se solapen les corbes, més s'assemblen els resultats entre sans i malalts, de manera que disminueix la capacitat discriminatòria de l'indicador i, per tant, baixa la probabilitat de que un malalt obtingui un valor major que un sa per aquell indicador³¹. Això és el que s'observa per la PCT en LCR on s'ha obtingut un AUC = 0,5336 (IC 0,2875 – 0,7797 i SD 0,1256 pel mètode de DeLong *et al*). En aquest cas, que l'AUC és aproximadament del 0,5, significa que les dos distribucions de malalts i sans per aquest biomarcador es solapen gairebé totalment, de manera que el valor de l'indicador de PCT en LCR és independent a l'estat del pacient, és a dir que no aporta informació³¹ (*Fig. 4*). Això es correspon amb el resultat d'aquest biomarcador per el test no paramètric Mann-Whitney comentat anteriorment, on es mostra un p-valor > 0,5. En el cas de la PCT en plasma, els resultats obtinguts són conflictius. Per una banda s'obté un p-valor > 0,05 però per l'altre, una àrea de la corba ROC (AUC) de 0,9063 (IC 0,7591 – 1,0534 i SD 0,0751 pel mètode de DeLong *et al*). Així doncs el test no paramètric informa que les diferències en les medianes per la població d'infecció bacteriana respecte la població de no infecció no són significatives per la PCT en plasma, mentre que la corba ROC, tenint en compte l'AUC i l'interval de confiança 95% que no inclou el valor 0,5, indiquen que aquest mateix biomarcador té una gran capacitat discriminatòria a l'hora de diferenciar entre malalts amb infecció bacteriana respecte els sans, és a dir, que és possible afirmar que l'AUC de la concentració de la PCT en plasma és diferent a la no discriminació entre les dos poblacions analitzades³⁹ (*Fig.5*).

Globalment, si es compara la capacitat discriminatòria dels diferents indicadors diagnòstic, s'obté que el lactat i la PCT sèrica tenen una alta sensibilitat i especificitat per a diferenciar entre infecció bacteriana i no infecció, suggerint que el lactat és millor tenint en compte que el seu valor de l'AUC és superior. En canvi, la PCT en LCR té baixa propietat discriminatòria, suggerint

que en comparació, és un mal biomarcador per a diferenciar entre infecció bacteriana i no infecció. Encara que els resultats del test Mann Whitney i la corba ROC de la PCT en sèrum no concordin, s’han pogut trobar diferències significatives entre el grup bacterià i no infecció².

Taula 5: Resultats de la corba ROC de la PCT en plasma, PCT en LCR i lactat en LCR entre el grup bacterià i el no infecció. Es té en compte: àrea ROC, error estàndard i l’interval de confiança (95%) amb el mètode de DeLong *et al* (1988) i el de Hanley & McNeil (1983)

		PCT en plasma	PCT en LCR	Lactat en LCR
Àrea ROC		0,9063	0,5336	0,9167
Error Estàndard	DeLong	0,0751	0,1256	0,0768
	Hanley & McNeil	0,1449	0,1227	0,0980
Nivell de confiança		95%	95%	95%
Interval de confiança (IC)	DeLong	0,7591 – 1,0534	0,2875 - 07797	0,7661 – 1,0672
	Hanley & McNeil	0,6222 – 1,1903	0,2932 – 0,7740	0,7245 – 1,1088

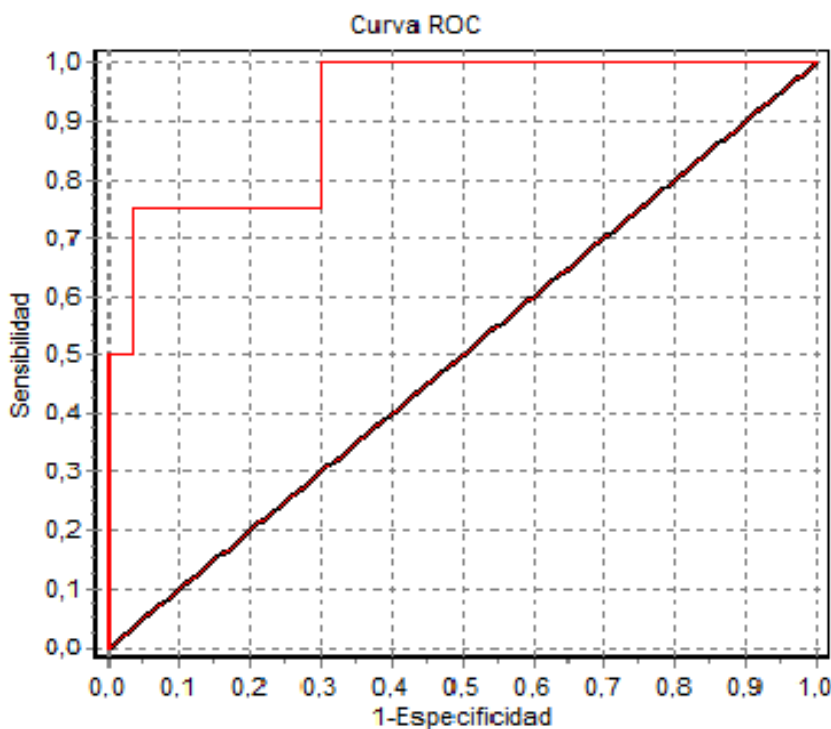


Figura 3: Corba ROC del lactat en LCR per el grup bacterià respecte el no infecció

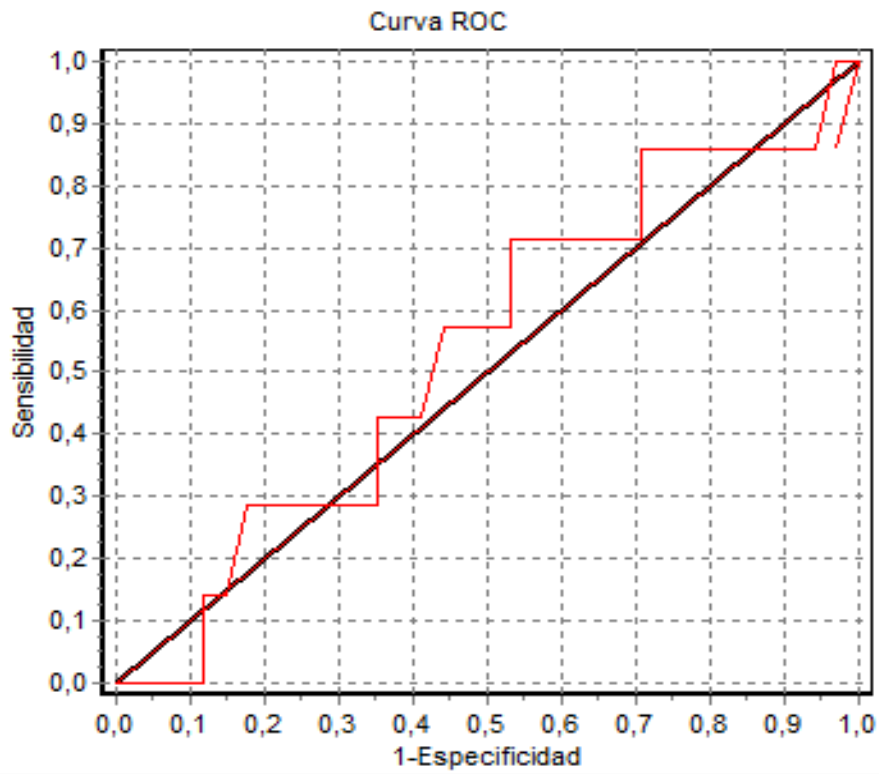


Figura 4: Corba ROC de la PCT en LCR per el grup bacterià respecte el no infecció

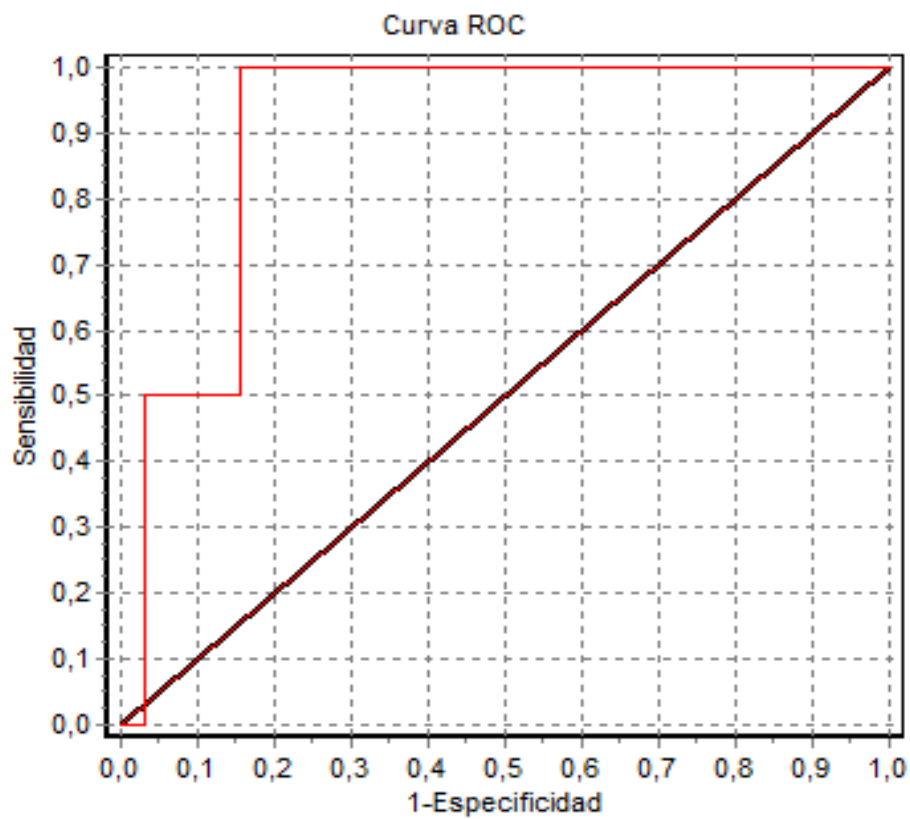


Figura 5: Corba ROC de la PCT en plasma per el grup bacterià respecte el no infecció

6. CONCLUSIONS

In accordance with the objectives we exposed earlier, the results are:

- We have compared the PCT levels in CSF samples between patient groups. We expected a higher value in those groups with infection (either bacterial or viral), but the results showed a higher mean value of PCT levels in CSF in the non-infectious group.
- We have compared the PCT levels in CSF samples and the PCT levels in serum samples between bacterial and non-infectious groups. Although we expected a significant difference between groups for both PCT levels in serum and CSF and high specificity and sensibility for the two biomarkers, the statistical results showed a non-significant difference between patient groups for either serum and CSF samples, and low specificity and sensibility for the PCT in CSF.
- We have compared the PCT levels in CSF and the lactate level in CSF between bacterial and non-infectious groups. The results showed a significant difference between patient groups and high specificity and sensibility for the lactate, unlike PCT in CSF.

The results suggest that PCT in serum is a better biomarker for the diagnosis of meningitis compared to PCT in CSF, and at the same time, PCT in CSF compared to lactate in CSF is not a good option as a biomarker. So, the results of this study suggest that lactate in CSF can be used as a specific and sensitive biomarker for meningitis diagnosis, and that PCT in serum is a good biomarker for the diagnosis as we expected.

It is important to mention that the study has limitations. First, the study size is small, causing the elimination of one of the study groups. At the same time, the small number of patients limits the power of the study², for example the results for the PCT in serum are not conclusive in the statistical analysis.

Second, we may have included patients in the wrong group², due to only 57,1% of the patients of the bacterial meningitis group are positive for bacterial culture, meaning that the final diagnosis for some bacterial and non-bacterial patients must be based on the clinical symptoms or signs, CSF laboratory findings and antibiotic treatment responses¹⁵.

Third, we only measured PCT in CSF at one point in time, we do not know at what moment after infection peak levels are reached or when PCT levels start to decrease².

To improve the study and get concluding results, we could have included the leukocyte count in the comparison for the statistical study².

Concluding, compared to previous studies, this one do not show the same results for the PCT in CSF.

7. AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria agrair a la Patricia Tejerina Fontaiña, que m'oferís realitzar aquest projecte amb les dades del laboratori clínic de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta sota la seva tutela. El seu guiatge gràcies a la seva experiència ha estat fonamental per l'elaboració d'aquest treball.

En segon lloc, m'agradaria agrair a la tutora de la Universitat de Girona, la Doctora Anna Massaguer Vall-llovera, per la seva disposició i consell sempre que m'ha estat necessari.

També dono les gràcies a la Doctora Maria Buxó de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI), per el suport i el guiatge que em va proporcionar des del punt de vista estadístic, que ha estat de gran valor per a poder realitzar el projecte amb èxit.

Per últim vull donar les gràcies als amics i familiars, especialment als meus pares i la meva germana, que m'han donat suport en cada pas, no només durant la realització d'aquest projecte sinó al llarg de tot el camí per la Universitat, ja que la seva motivació i confiança en tot moment han fet possible que arribés al final d'aquesta bonica etapa.

8. BIBLIOGRAFIA

¹ Jin, M., Khan, A.I. (2010). Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis. *Laboratory Medicine*, 41, 173-177.

² Alons, I. M. E., Verheul, R. J., Kuipers, I., Jellema, K., Wermer, M. J. H., Algra, A. and Ponjee, G. (2016). Procalcitonin in cerebrospinal fluid in meningitis: a prospective diagnostic study. *Brain and Behavior*, 6, 1–7.

³ Lazarov, S., Balutsov, M., lanev, E. (2000). The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutreshni Bolesti*, 32(4), 33-40.

⁴ Parikh, V., Tucci, V., Galwankar, S. (2012). Infections of the nervous system. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, 2(2), 82–97.

⁵ Bailey, R. (26 d'Octubre de 2017). *Brain Anatomy: Meninges*. Recuperat 15 d'Abril de 2018, des de <https://www.thoughtco.com/brain-anatomy-meninges-4018883>

⁶ National Center for Immunization and Respiratory Diseases. (20 d'Abril de 2016). *Chapter 2: Epidemiology of Meningitis Caused by Neisseria meningitides, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae*. Recuperat 15 d'Abril de 2018, des de <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt02-epi.html>

⁷ Agència de Salut Pública de Catalunya. (4 d'Abril de 2017). *Comunicat sobre els darrers casos de meningitis a Catalunya*. Recuperat 26 d'Abril de 2018, des de <http://salutpublica.gencat.cat/ca/detalls/Article/Comunicat-sobre-els-darrers-casos-de-meningitis-a-Catalunya-00001>

⁸ Cassady, K. A. (2010). Viral infections of the central nervous system. *Antibiotic and Chemotherapy*, 9, 650-658.

⁹ Nordqvist, C. (30 Novembre de 2017). *All about bacterial meningitis*. Recuperat 10 de Maig de 2018, des de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/9276.php>

¹⁰ biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. (1 de Maig de 2018). *Meningitis*. Recuperat 10 de Maig de 2018, des de <https://medlineplus.gov/spanish/meningitis.html>

¹¹ González Naranjo, L. A., Molina Restrepo, J. F. (2010). Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Revista colombiana de reumatología*, 17(1), 35-47.

¹² Simon, L., Gauvin, F., Amre, D. K., Saint-Louis, P., Lacroix, J. (2004). Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 206-217.

¹³ Memar, M. Y., Varshochi, M., Shokouhi, B., Asgharzadeh, M., Kafil, H. S. (2017). Procalcitonin: The marker of pediatric bacterial infection. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 96, 936-943.

¹⁴ Teunissen, C. E., Petzold, A., Bennet, J. L., Berven, F. S., Brundin, L., Comabella, M., Franciotta, D., Frederiksen, J. L., Fleming, J. O., Furlan, R., Hintzen, R. Q., Hughes, S. G., Johnson, M. H., Krasulova, E., Kuhle, J., Magnone, M. C., Rajda, C., Rejdak, K., Schmidt, H. K., van Pesch, V., Waubant, E., Wolf, C., Giovannoni, G., Hemmer, B., Tumani, H., Deisenhammer, F. (2009). A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*, 73(22), 1914-1922.

¹⁵ Shen, H. Y., Gao, W., Cheng, J. J., Zhao, S. D., Sun, Y., Han, Z. J., Hu, J. (2015). Direct comparison of the diagnostic accuracy between blood and cerebrospinal fluid procalcitonin levels in patients

with meningitis. *Clinical Biochemistry*, 48, 1079-1082.

¹⁶Yadhav MI, K. (2014). Study of bacterial meningitis in children below 5 years with comparative evaluation of gram staining, culture and bacterial antigen detection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8, 4–6.

¹⁷Dorresteijn, K. R. I. S., Jemella, K., Ponjee, G. A. E., Verheul, R. J. (2017). Stability of procalcitonin in cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine*, 55(10), 230-232.

¹⁸Li, Y., Zhang, G., Ma, R., Du, Y., Zhang, L., Li, F., Fang, F., Lv, H., Wang, Q., Zhang, Y., Kang, X. (2015). The diagnostic value of cerebrospinal fluids procalcitonin and lactate for the differential diagnosis of post-neurosurgical bacterial meningitis and aseptic meningitis. *Clinical Biochemistry*, 48, 50-54.

¹⁹Institut Puig Castellar. *Realització de la TINCIÓ GRAM*. Recuperat 19 de Maig de 2018, des de https://elpuig.xeill.net/Members/rcodola/2n-batxillerat/microbiologia/tincio-de-gram-laboratori/at_download/file

²⁰Sánchez, J. (14 de Setembre de 2010). *Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas*. Recuperat 22 de Maig de 2018, des de <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html>

²¹National Center for Biotechnology Information. (11 de Setembre de 2017). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Recuperat 1 de Juny de 2018, des de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

²²BioMérieux Espanya. *FilmArray® Panel Meningitis/Encefalitis (ME)*. Recuperat 2 de Juny de 2018, des de <http://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/filmarrayr-panel-meningitisencefalitis-me>

²³BioFire Diagnostics, LLC. *Guía rápida del FilmArray® Meningitis/encephalitis Panel*. Recuperat 3 de Juny de 2018, des de <https://www.online-ifu.com/ITI0012/14484/ES>

²⁴Martínez Chamorro, MJ. (Febrer 2014). *Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad neumocócica: utilidad del test rápido de detección del antígeno neumocócico en orina en*

pediatria. Recuperat 25 de Juny de 2018, des de <https://www.aepap.org/sites/default/files/diag.nmc3.pdf>

²⁵ Alere Scarborough, Inc. *Alere BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae Antigen Card: Guia de procedimiento*. Recuperat 26 de Juny de 2018, des de <https://ensur.invmed.com/ensur/broker/ensurbroker.aspx?code=IN710101ES&cs=26627139>

²⁶ Líquidos de punción. (11 d'Agost de 2005). *Análisis del LCR*. Recuperat 26 de Juny de 2018, des de <https://liquidosdepuncion.blogia.com/2005/080801-analisis-del-lcr.php>

²⁷ Instituto de Salud Pública de Chile. (1 d'Abril de 2016). *Recomendaciones para el análisis de líquidos biológicos*. Recuperat 28 de Juny de 2018, des de <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20el%20Analisis%20Liquid os%20Biologicos.pdf>

²⁸ Laboratorio Médico las Américas Ltda. *Citoquímico de líquido cefalorraquídeo*. Recuperat 29 de Juny de 2018, des de https://www.lablasamericas.com.co/site/index.php/examen/citoquimico_de_liquido_cefalorraquideo/

²⁹ Farfán Pimentel, J. F. *Prueba de U Mann-Whitney para dos muestras independientes*. Recuperat 30 de Juny de 2018, des de <https://www.monografias.com/trabajos106/prueba-u-mann-whitney-dos-muestras-independientes/prueba-u-mann-whitney-dos-muestras-independientes.shtml>

³⁰ De Irala, J. (2008). *¿Qué son y cómo se interpretan las curvas ROC?* Recuperat 30 de Juny de 2018, des de <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1704/44/00440047-LR.pdf>

³¹ Bioestadística Para No Estadísticos. (9 de Maig de 2014). *Curva ROC*. Recuperat 3 de Juliol de 2018, des de <https://www.youtube.com/watch?v=pA4E2uVHiYo>

³² Organización Mundial de la Salud. (19 de Febrer de 2018). *Meningitis meningocócica*. Recuperat 3 de Juliol de 2018, des de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/meningococcal-meningitis>

³³ Jiménez, M. A. (20 d'Abril de 2018). *Meningitis*. Recuperat 5 de Juliol de 2018, des de <https://www.webconsultas.com/meningitis/tipos-de-meningitis-617>

³⁴ Clínica Universidad de Navarra. *Diccionario medico*. Recuperat 8 de Juliol de 2018, des de <https://www.cun.es/diccionario-medico/>

³⁵ Minitab Inc. *Interpretar todos los estadísticos y gráficas para mostrar estadísticos descriptivos: IQR*. Recuperat 10 de Juliol de 2018, des de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/how-to/display-descriptive-statistics/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/#iqr>

³⁶ Microsoft 2018. *Mediana (función MEDIANA)*. Recuperat 11 de Juliol de 2018, des de <https://support.office.com/es-es/article/mediana-funci%C3%B3n-mediana-d0916313-4753-414c-8537-ce85bdd967d2>

³⁷ Minitab Inc. *Interpretar todos los estadísticos para la Prueba de Mann-Whitney*. Recuperat 12 de Juliol de 2018, des de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/how-to/mann-whitney-test/interpret-the-results/all-statistics/>

³⁸ Gajowniczek, K., Zabkowski, T. (2014). Estimating the ROC curve and its significance for classification model's assessment. *Quantitative methods in economics*, 15(2), 382-391.

³⁹ Cerda, J., Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 138-141.