

PATRÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIDEO Y PLASMA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD  
CLINICA Y SECUELAS NEUROLOGICAS DE LOS PACIENTES CON  
MENINGITIS BACTERIANA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE NEIVA  
ENTRE FEBRERO DE 2011 Y FEBRERO DE 2012

JUAN MANUEL TORRES RESTREPO  
MIGUEL ANGEL TORRES RESTREPO

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA MEDICINA  
NEIVA - HUILA  
2012

PATRON DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN LIQUIDO  
CEFALORRAQUIDEO Y PLASMA Y SU ASOCIACION CON LA SEVERIDAD  
CLINICA Y SECUELAS NEUROLOGICAS DE LOS PACIENTES CON  
MENINGITIS BACTERIANA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE NEIVA  
ENTRE FEBRERO DE 2011 Y FEBRERO DE 2012

JUAN MANUEL TORRES RESTREPO  
MIGUEL ANGEL TORRES RESTREPO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico.

Asesor  
GILBERTO MAURICIO ASTAIZA  
Medico Especialista en Epidemiología Asesor

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA MEDICINA  
NEIVA – HUILA  
2012

Nota de aceptación:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

-----  
Firma del presidente del jurado

-----  
Firma del jurado

-----  
Firma del jurado

Neiva, Mayo del 2012

## DEDICATORIA

A Dios, por la vida.

A nuestro papá que desde el cielo nos ve, a nuestra mamá que en la tierra nos ama y a nuestra hermana *Sarita*.

JUAN MANUEL  
MIGUEL ANGEL

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos:

A los pacientes del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva que participaron voluntariamente en este estudio.

A los profesores, médicos residentes y médicos internos de los servicios de Medicina Interna y Anestesiología del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva por el apoyo en el estudio.

Al semillero de investigación SINEDIR por su crítica constructiva.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. ANTECEDENTES	15
2. DESCRIPCION Y FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	18
3. JUSTIFICACION	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GENERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
5. MARCO TEORICO	22
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MENINGITIS BACTERIANA	22
5.1.1 Diagnostico	24
5.1.2 Fisiopatología	25
5.1.3 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )	28
5.1.4 Interleucina – 1 beta (IL-1 $\beta$ )	28
5.1.5 Interleucina 12 (IL-12)	29
5.1.6 Interleucina 10 (IL-10)	29
5.1.7 Interleucina 6 (IL-6)	29
6. HIPOTESIS	31
7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	32
8. DISEÑO METODOLOGICO	34

		Pág.
8.1	TIPO DE ESTUDIO	34
8.2	UBICACIÓN DEL ESTUDIO	34
8.3	POBLACION, MUESTRA Y MUESTREO	34
8.3.1	Población	34
8.3.2	Muestra	34
8.3.3	Muestreo	35
8.4	TECNICAS	35
8.5	PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS	35
8.6	PLAN DE TABULACION Y ANALISIS DE DATOS	38
9.	CONSIDERACIONES ETICAS	39
10.	RESULTADOS	40
11.	DISCUSIÓN	51
12.	CONCLUSIONES	54
13.	RECOMENDACIONES	55
	BIBLIOGRAFIA	56
	ANEXOS	60

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Concentraciones en LCR y plasma de IL-6 en individuos con MB y controles sanos.	40
Figura 2	Concentraciones en LCR y plasma de IL-10 en individuos con MB y controles sanos	41
Figura 3	Concentraciones en LCR y plasma de IL-12p70 en individuos con MB y controles sanos	42
Figura 4	Concentraciones en LCR y plasma de IL-12p70 en individuos con MB y controles sanos	43
Figura 5	Concentraciones en LCR y plasma de IL-1 $\beta$ en individuos con MB y controles sanos	43
Figura 6	Concentraciones en LCR y plasma de TNF- $\alpha$ en individuos con MB y controles sanos	44
Figura 7	Correlación entre las concentraciones de IL-6 en LCR y plasma	45
Figura 8	Relación entre niveles de IL-6 con la severidad clínica de la MB	46
Figura 9	Relación entre niveles de IL-8 con la severidad clínica de la MB	47
Figura 10	Relación entre niveles de IL-10 con la severidad clínica de la MB	47
Figura 11	Relación entre niveles de IL-1 $\beta$ con la severidad clínica de la MB	48
Figura 12	Comparación de las concentraciones en LCR de IL-6 en casos de MB con desenlace clínico favorable y desfavorable	49



Figura 13 Comparación de las concentraciones en LCR de IL-8 en casos de MB con desenlace clínico favorable y desfavorable

## LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A	Ficha clínica de Meningitis Bacteriana	61
Anexo B	Definiciones de sepsis	62
Anexo C	Escala para medir secuelas neurológicas	63
Anexo D	Consentimiento informado	64

## RESUMEN

La meningitis bacteriana (MB) es una infección del espacio subaracnoideo con una alta mortalidad y morbilidad causada principalmente por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* los cuales desencadenan una respuesta inmune en el sistema nervioso central comandada por citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral – alfa TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 12p70 (IL-12p70).

El objetivo fue determinar la relación entre los niveles de estas citocinas proinflamatorias en liquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma con la severidad clínica y secuelas neurológicas de los pacientes con MB.

Para ello se realizó un estudio prospectivo de casos y controles en el que se tomaron muestras de LCR y plasma a 17 pacientes con MB y a 19 controles sanos para la detección de citocinas proinflamatorias mediante citometría de flujo por la técnica *cytometric bead array* (CBA) y se analizó su relación con parámetros clínicos de severidad y complicaciones neurológicas de individuos con MB.

Se evidenció una relación entre las altas concentraciones de citocinas proinflamatorias en LCR y plasma con cuadros clínicos más severos de MB además los altos niveles de citocinas proinflamatorias en LCR y plasma se asociaron con una mayor frecuencia de secuelas neurológicas, por lo tanto pueden ser útiles en la predicción temprana de estas complicaciones.

Palabras claves: Meningitis bacteriana, citocinas proinflamatorias, secuelas neurológicas.

## ABSTRACT

Is the bacterial meningitis (MB) an infection of the space subaracnoideo with a high mortality and morbidity caused principally by *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* which unleash an immune response in the nervous central system commanded for citocinas proinflamatorias as the factor of tumour necrosis - alpha TNF-?), interleucina 1 thread (IL-1?), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10) and interleucina 12p70 (IL-12p70).

The aim was the relation determined between the levels of these citocinas proinflamatorias in liquid cefalorraquídeo (LCR) and plasma with the clinical severity and neurological sequels of the patients with MB.

For it I realize a market study of cases and controls in which LCR's samples took and it forms 17 patients with MB and to 19 healthy controls for the detection of citocinas proinflamatorias by means of citometría of flow for the technology cytometric bead array (CBA) and his relation was analyzed by clinical parameters of severity and neurological complications of individuals by MB

A relation demonstrated between the high concentrations of citocinas proinflamatorias in LCR and plasma with MB's severer clinical pictures in addition the high levels of citocinas proinflamatorias in LCR and plasma they associated with a major frequency of neurological sequels, therefore they can be useful in the early prediction of these complications.

Keywords: Bacterial meningitis, citocinas proinflamatorias, neurological sequels.

## INTRODUCCION

La Meningitis Bacteriana (MB) es una infección supurativa del espacio subaracnoideo que causa una alta morbi-mortalidad en la población general. En adultos es una importante causa de muerte en los servicios de medicina interna debido a la severidad con la que suele ir acompañado el cuadro clínico.

La incidencia estimada para MB es de 10 casos por 100.000 habitantes adultos en países desarrollados y en países en vías de desarrollo puede ser del doble, con una mortalidad de hasta el 37% según la serie.

Las bacterias más frecuentemente encontradas son *S. pneumoniae* (47%), *N. meningitidis* (25%), Estreptococo del grupo B (12%) y *L. monocytogenes* (8%). La presencia de *H. influenzae* ha sido casi totalmente erradicada luego de la introducción de la vacunación. En Colombia se reportaron 455 casos de MB durante el 2011 con una etiología similar a la reportada en la literatura médica mundial.

La Meningitis Bacteriana- MB deja secuelas neurológicas permanentes de alto impacto social como sordera, déficit cognitivo y focalizaciones motoras hasta en el 60% de quienes han padecido esta enfermedad.

La gravedad de la MB hace que sea necesario conocer rápidamente qué patógeno se encuentra involucrado con el fin de dar tratamiento oportuno y adecuado al paciente. Si bien, ante un cuadro de MB la antibioterapia se inicia de manera empírica, el conocimiento del tipo de microorganismo presente puede llevar a la realización de tratamientos más efectivos.

La presentación de la enfermedad depende del medio-ambiente y de factores propios del huésped (bacteria) y del hospedero (ser humano).

Entre los últimos se encuentran los factores inmunológicos, grandes determinantes de la severidad del cuadro infeccioso.

El evento central de la fisiopatología de la MB es la colonización bacteriana del tracto nasofaríngeo y posterior migración de estas bacterias al espacio subaracnoideo, ya sea mediante diseminación hidatógica o por contigüidad

anat3mica, una vez en el liquido ceforraqu3deo (LCR), el microorganismo desencadena una respuesta inmune comandada por citocinas proinflamatorias.

Ahora, se tiene claro que las citocinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), interleucina 1 beta ( $IL-1\beta$ ), interleucina 6 ( $IL-6$ ), interleucina 8 ( $IL-8$ ), interleucina 10 ( $IL-10$ ) e interleucina 12 ( $IL-12p70$ ) son tempranamente liberadas en el SNC en la neuroinfecci3n bacteriana, entre las primeras 6 y 24 horas, y que su presencia se relaciona con reclutamiento de leucocitos en el LCR y aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencef3lica (BHE) que lleva a edema cerebral vasog3nico y citot3xico, vasculitis, hemorragia intracraneana, herniaci3n cerebral y muerte.

Por lo tanto, se hace necesario evaluar si la cantidad de citocinas proinflamatorias presentes en el SNC se asocia con una mayor severidad cl3nica y con mayor frecuencia de secuelas neurol3gicas en los pacientes con Meningitis Bacteriana.

Al identificar niveles de citocinas relacionados con estos par3metros cl3nicos de la enfermedad, se tienen herramientas para el diagn3stico m3s temprano de la MB, para hacer m3s objetiva la evaluaci3n pronostica de estos pacientes facilitando la toma de conductas terap3uticas que lleven a la prevenci3n de complicaciones y secuelas por MB.

## 1. ANTECEDENTES

En neuroinfección, la mayor cantidad de información que se tiene hasta el momento a nivel mundial se ha obtenido de modelos murinos y de investigaciones en población pediátrica debido a la mayor incidencia de estas infecciones en este grupo etéreo. Sin embargo, los conceptos fisiopatológicos moleculares inmunológicos que de estos se han extraído se pueden extrapolar al paciente adulto.

Actualmente se conocen un gran número de mediadores inflamatorios, siendo los más importantes el  $\text{TNF}\alpha$ , la  $\text{IL-1}\beta$  y la  $\text{IL-6}$ . Estas son producidas por células endoteliales y macrófagos (astrocitos y microglia) y secretadas en respuesta a bacterias en el LCR o debido a la lisis bacteriana inducida por antibióticos. Estos mediadores inflamatorios, dependiendo de su concentración y su interacción con otros mediadores, tienen efectos benéficos o deletéreos para el hospedero, tal es así, que la inyección intracisternal de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$  provocan una respuesta inflamatoria cualitativamente similar a la ejercida por microorganismos vivos o sus productos biológicamente activos<sup>1</sup>. En particular, la  $\text{IL-1}\beta$  es conocida por inducir la producción de otras citocinas y factores de crecimiento, además de cambios en el flujo sanguíneo cerebral<sup>2</sup>.

En un estudio en ratas en las que se indujo meningitis por *S. pneumoniae* se demostró el incremento de niveles  $\text{TNF-}\alpha$  en el hipocampo y corteza prefrontal seis horas después de la inducción de meningitis. Incrementos en  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  tienden a ser observados antes de la muerte neuronal significativa una hora después de la injuria, mientras otras son expresadas lentamente dentro de las primeras 24 horas. Para las citocinas  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$ , el incremento de sus niveles en la corteza prefrontal ocurrió a las veinticuatro horas después de la inducción, pero en el hipocampo no hubo alteración<sup>3</sup>.

Concordando, Grandgirard *et al* encontraron apoptosis en el giro dentado de ratones infectados con *S. pneumoniae* documentando un pico a treinta horas posinfección, seguido por una disminución de la apoptosis que retornaba a niveles

---

<sup>1</sup> BENVENISTE, E.N., 1992. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem. Immunol.* 52, 106–153.

<sup>2</sup> ALLAN, M.S., ROTHWELL, N.J., 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 734–744.

<sup>3</sup> BARICHELLO, T., 2010.  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ , and  $\text{cinc-1}$  levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Neuroimmunology* 221 (2010) 42-45.

normales a las cuarenta horas. Se encontró un incremento en la actividad de los niveles de citocinas después de las veinticuatro horas de la inducción de meningitis, cerca del pico de apoptosis, sin alteración significativa subsecuente<sup>4</sup>.

Barichello y su grupo de investigación en Santa Catarina - Brasil han demostrado en modelos murinos que la administración temprana de antibióticos, es decir, ocho horas post – inoculación intratecal de *S. pneumoniae* en comparación con la administración tardía, dieciséis horas, previene el daño cognitivo inducido por meningitis evaluado a los de 10 días de la infección<sup>5</sup>.

El estudio de Vera Lucia Jornada *et al*, es crítico como modelo del estudio de las citocinas proinflamatorias, específicamente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, en neonatos con MB, en este tomaron LCR y suero de 30 pacientes con MB y 24 controles, encontrando que aquellos con MB tenían niveles de significativamente más altos de estas citocinas en LCR que los controles ( $p < 0.05$ ), así mismo, la IL-1 $\beta$  y la IL-6 se relacionaban con alteraciones citoquímicas del LCR como pleocitocis e hiperproteíorraquia. En cuanto a las complicaciones neurológicas, no hubo una relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de estas últimas y los niveles de estas citocinas en LCR o suero<sup>6</sup>.

Las secuelas neurológicas en pacientes adultos con MB, ya han sido estudiadas, pero nunca relacionadas con los niveles de citocinas proinflamatorias ni en LCR ni en circulación sistémica. Van de Beek *et al* realizaron un estudio prospectivo durante 4 años incluyendo 696 pacientes con MB de toda Holanda, y han encontrado que hasta el 34% de los pacientes adultos con MB quedan con secuelas neurológicas permanentes como sordera, déficit cognitivo y otras focalizaciones motoras<sup>7</sup>.

Apoyados en evidencia experimental y observacional, vemos que las citocinas proinflamatorias puedan ser un biomarcador para infección en las primeras horas

---

<sup>4</sup> GRANDGIRARD, D., STEINER, O., TÄUBER, M.G., Leib, S.L., 2007b. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. Acta Neuropathol. 114, 609–617.

<sup>5</sup> BARICHELO, T., SILVA, G.Z., BATISTA, A.L., SAVI, G.D. 2009. Early antibiotic administration prevents cognitive impairment induced by meningitis in rats. Neurosci. Lett. 465, 71–73

<sup>6</sup> JORNADA VL; OKAY TS; OKAY Y. 2005. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of newborn with meningitis. Arq Neuropsiquiatr 2005; 63(1):7-13.

<sup>7</sup> VAN DE BEEK D; DE GANS J; SPANJAARD L. 2004. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. N Engl J Med 2004; 351:1849.59.



de instauración de la MB y también podrían ser útiles a los médicos tratantes en la determinación objetiva del pronóstico de sus pacientes.

## 2. DESCRIPCION Y FORMULACION DEL PROBLEMA

La Meningitis Bacteriana es una infección supurativa del sistema nervioso central (SNC) específicamente del espacio subaracnoideo, causada por microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* en el 51% de los casos, *Neisseria meningitidis* (37%), *Streptococcus* del grupo B (12%), *Listeria monocytogenes* (8%) y *Haemophilus influenzae* (2%), La presencia de *H. influenzae* ha sido casi totalmente erradicada luego de la introducción de la vacunación. Igualmente la vacuna contra el neumococo ha disminuido la incidencia de la enfermedad por *S. pneumoniae* en 90%, pero aun continúa siendo la causa más usual de MB, con secuelas hasta en 60% de los casos, la *N. meningitidis* se caracteriza por producir brotes y epidemias de gran importancia y por su patrón fulminante<sup>8</sup>.

En Colombia fueron reportados 455 casos de MB durante el 2011, de los cuales 106 se debieron a pneumococo, 68 al meningococo, 31 a *Haemophilus influenzae* y 250 por *Mycobacterium tuberculosis*. Hay que tener en cuenta el alto subregistro al sistema de vigilancia que existe en este país<sup>9</sup>. En Colombia la MB causada por estos tres microorganismos es de vigilancia obligatoria, los casos deben ser reportados al Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA y los aislamientos recuperados deben ser enviados al Instituto Nacional de Salud (INS) para su confirmación y serotipificación.

Antes del descubrimiento de los antibióticos, la mortalidad correspondía al 90% con graves secuelas entre los sobrevivientes. Actualmente, a pesar de los avances, la mortalidad de MB continua siendo muy alta (20 a 40% según el germen)<sup>10</sup>.

A parte de la mortalidad, el curso clínico de la MB tiene complicaciones medicas que aumentan la estancia hospitalaria y por ende la carga económica de la atención como déficit neurológico hasta en el 50% de los casos, convulsiones en el 15%, falla cardiorrespiratoria en el 29%, y el 23% de los pacientes requieren ventilación mecánica.

---

<sup>8</sup> BROUWER MC, TUNKEL AR, VAN DE BEEK D. 2010. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July 2010, p. 467-492.

<sup>9</sup> INSTITUTO NACIONAL DE SALUD – Sistema de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA. Enero 2012

<sup>10</sup> Des PORTES, V., [Long-term follow-up of bacterial meningitis - sequels in children and adults: incidence, type, and assessment issues]. Med Mal Infect, 2009. 39(7-8): p. 572-80.

Los pacientes que han padecido esta enfermedad quedan con secuelas neurológicas permanentes de alto impacto social hasta en un 50% para MB por pneumococo. Las secuelas neurológicas más comunes son la sordera, parálisis del tercer, sexto y séptimo nervios craneales, afasia, hemiparesis y cuadriparesis<sup>11</sup>.

En los últimos años, se ha intentado entender los eventos que hacen de la MB una entidad tan severa clínicamente.

Está claro que en esta instancia intervienen factores tanto del agente causal como del hospedero y dentro de los últimos, los inmunológicos son los que más claramente explican la fisiopatología de la enfermedad.

La respuesta inmune que se desencadena en el espacio subaracnoideo esta comandada por citocinas proinflamatorias como el  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-10$  e  $IL-12p70$ . Estas moléculas se han visto involucradas en respuestas inmunes exageradas que son deletéreas para el individuo, inducen muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica produciendo edema cerebral vasogénico y citotóxico que llevan a la herniación cerebral y a la muerte. Además son factores quimiotácticos para leucocitos, específicamente la  $IL-8$  para los neutrofilos generando daño adicional con la descarga de especies reactivas oxígeno, peroxinitrina y con la activación de metaloproteinasas de matriz<sup>12,13</sup>.

De lo anterior surge la pregunta.

¿Están relacionados los niveles de citocinas proinflamatorias en LCR y plasma con la severidad clínica y secuelas neurológicas de los pacientes con Meningitis Bacteriana?

---

<sup>11</sup> VAN DE BEEK *et al.* Op., cit. p., 1855: 1849-59.

<sup>12</sup> KOEDEL U, SCHELD WM, PFISTER HW. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infect Dis* 2002; 2: 721-36.

<sup>13</sup> VAN DE BEEK, de GANS J, TUNKEL AR. 2006. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 2006; 354:44-53.

### 3. JUSTIFICACION

En primer lugar, se debe tener en cuenta la alta incidencia de esta enfermedad en los países en vías de desarrollo como Colombia, su elevada mortalidad y frecuencia de complicaciones neurológicas de alto impacto familiar y social como sordera, déficit cognitivo, hemiparesis y otras focalizaciones motoras.

En segunda instancia, los aspectos clínicos y fisiopatológicos de la MB han sido ampliamente estudiados en población pediátrica, la literatura publicada mundialmente al respecto es abundante, no siendo así para los pacientes adultos.

De igual forma, aunque se ha evidenciado que las citocinas proinflamatorias son un punto central en la patogénesis de la MB, no se han correlacionado estas citocinas con las características clínicas de la enfermedad como severidad y complicaciones neurológicas.

Entonces esta situación hace de las citocinas proinflamatorias unas candidatas a ser tanto blancos terapéuticos como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la MB, para la identificación de formas clínicas más severas y para la ser herramientas objetivas a la hora de evaluar el pronóstico de los pacientes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación que existe entre el nivel de citocinas proinflamatorias en LCR y plasma con la severidad clínica y secuelas neurológicas en pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de MB que asisten al Hospital Universitario de Neiva entre febrero de 2011 y febrero de 2012.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la diferencia en la concentración en LCR y plasma de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 entre los individuos con MB y sanos.

Hallar la relación entre los niveles de citocinas proinflamatorias presentes en un compartimiento tejido específico (espacio subaracnoideo) con los encontrados en la circulación general.

Establecer la asociación entre los niveles de citocinas proinflamatorias en LCR y plasma con la severidad clínica de la MB.

Determinar la asociación entre los niveles de estas citocinas proinflamatorias con la frecuencia de secuelas neurológicas en pacientes con MB.

## 5. MARCO TEORICO

La Meningitis Bacteriana es definida como infección supurativa del espacio subaracnoideo o como la inflamación de las membranas del cerebro o cordón espinal y es también conocida como aracnoiditis o leptomeningitis<sup>14</sup>. La MB presenta una incidencia anual de 2 a 10 casos por 100000 habitantes adultos (mayores de 16 años) en países desarrollados, siendo 10 veces mayor en países en vía de desarrollo con una mortalidad del 20 – 40%<sup>15</sup>.

En Colombia fueron reportados 455 casos de MB durante el 2011, de los cuales 106 se debieron a pneumococo, 68 al meningococo, 31 a *Haemophilus influenzae* y 250 por *Mycobacterium tuberculosis*. Hay que tener en cuenta el alto subregistro al sistema de vigilancia que existe en este país<sup>16</sup>.

Las bacterias más frecuentemente encontradas son *S. pneumoniae* (47%), *N. meningitidis* (25%), Estreptococo del grupo B (12%) y *L. monocytogenes* (8%). La presencia de *H. influenzae* ha sido casi totalmente erradicada luego de la introducción de la vacunación. Igualmente la vacuna contra el neumococo ha disminuido la incidencia de la enfermedad por *S. pneumoniae* en 90%, pero aun continúa siendo la causa más usual de MB, con secuelas hasta en 60% de los casos. La *N. meningitidis* se caracteriza por producir brotes y epidemias de gran importancia por su patrón fulminante.

Antes del descubrimiento de los antibióticos, la mortalidad correspondía al 90% con graves secuelas entre los sobrevivientes. Actualmente, a pesar de los avances, la mortalidad de MB continua siendo muy alta (20 a 40% según el germen)<sup>17</sup>.

### 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MENINGITIS BACTERIANA

Puede presentarse con un pródromo inespecífico de fiebre y cefalea, el cual en un sujeto que había estado sano puede considerarse en un principio benigno hasta

---

<sup>14</sup> VAN DE BEEK. Op., cit. p., 354:44-53.

<sup>15</sup> BROUWER MC. Op.,cit. p., 468: 467-492.

<sup>16</sup> INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Op., cit. p.

<sup>17</sup> SOMAND, D. and W. MEURER, *Central nervous system infections*. Emerg Med Clin North Am, 2009. 27(1): p. 89-100, ix.

que aparecen alteraciones de la conciencia, signos neurológicos focales o convulsiones.

La rigidez de la nuca ("cuello rígido") es el signo patognomónico de la irritación meníngea y aparece cuando el cuello resiste la flexión pasiva. Los signos de Kernig y Brudzinski son manifestaciones clásicas de irritación meníngea. El *signo de Kernig* se busca con el individuo en decúbito dorsal.

El operador flexiona el muslo sobre el abdomen con la rodilla en flexión; los intentos de extensión pasiva de la rodilla desencadenan dolor en caso de haber irritación meníngea. El *signo de Brudzinski* se identifica con el paciente en decúbito dorsal; es positivo cuando la flexión pasiva del cuello origina flexión espontánea de las caderas y la rodilla.

La sensibilidad y la especificidad de ambos signos no son seguras, si bien se les busca frecuentemente en la exploración física. Los dos pueden estar ausentes o ser mínimos en sujetos de muy corta edad o muy ancianos, en individuos inmunodeficientes o con depresión mental profunda. La elevada prevalencia de espondilopatía cervical en ancianos puede originar un resultado positivo falso en lo que toca a la rigidez de la nuca.

La meningitis puede presentarse como una enfermedad aguda fulminante que avanza rápidamente en pocas horas, o como una infección subaguda que empeora progresivamente a lo largo de varios días. La tríada clínica clásica consta de fiebre, cefalea y rigidez de nuca. En más de 75% de los pacientes ocurre una disminución del nivel de conciencia que puede variar desde letargo hasta el coma. Síntomas comunes también incluye náusea, vómito y fotofobia.

Hasta en 20 a 40% de los pacientes las convulsiones forman parte del cuadro clínico inicial de una meningitis bacteriana. Las convulsiones focales suelen deberse a isquemia o infarto arterial focal, a trombosis hemorrágica de las venas corticales o a edema focal. La actividad convulsiva generalizada y el estado epiléptico pueden ser causados por hiponatremia, anoxia cerebral y, con menor frecuencia, los efectos tóxicos de antimicrobianos como la penicilina en dosis altas.

El aumento de la presión intracraneana (ICP) es una complicación esperada de las meningitis bacterianas y es, en esta enfermedad, la causa principal de obnubilación y coma. En más de 90% de los pacientes la presión de abertura del

LCR es  $>180$  mmH<sub>2</sub>O y en 20% es  $>400$  mmH<sub>2</sub>O. Los signos de aumento de la ICP son disminución o deterioro del nivel de conciencia, edema de papila, pupilas dilatadas que reaccionan poco a la luz, parálisis del sexto par craneal, posturas de descerebración y reflejo de Cushing (bradicardia, hipertensión y respiraciones irregulares). La complicación más fatídica de la hipertensión intracraneal es la herniación cerebral. La incidencia de herniación en los pacientes con meningitis bacteriana se estima en 1 a 8% de los casos.

Algunos signos clínicos específicos pueden orientar el diagnóstico de microorganismos individuales y se exponen con mayor detalle en capítulos específicos dedicados a dichos agentes patógenos. El más importante de estos signos es la erupción de la meningococemia, que comienza en la forma de maculopápulas eritematosas difusas que se asemejan al exantema vírico, pero las lesiones cutáneas de la meningococemia rápidamente se transforman en petequias. Estas últimas aparecen en tronco y extremidades pélvicas, en las membranas mucosas y las conjuntivas, y a veces en las palmas y las plantas<sup>18</sup>.

5.1.1 Diagnóstico. Si se sospecha meningitis bacteriana hay que obtener inmediatamente sangre para cultivo y emprender sin tardanza la antibioticoterapia sobre bases empíricas. El diagnóstico de meningitis bacteriana se hace por estudio del LCR. La decisión de practicar estudios neuroimagenológicos (tomografía computadorizada o resonancia magnética) antes de la punción lumbar exige buen juicio clínico y ha sido motivo de controversia.

En la persona inmunocompetente sin antecedentes recientes de traumatismo craneoencefálico, que tiene un nivel normal de conciencia y ningún signo de papiledema o de déficit neurológicos focales, una maniobra segura es la punción lumbar sin practicar previamente estudios neuroimagenológicos.

Si se retrasa la punción para la práctica de los estudios mencionados habrá que emprender antibioticoterapia sobre bases empíricas después de haber practicado los cultivos de sangre. La antibioticoterapia inicial unas pocas horas antes de la punción lumbar no altera de manera significativa el recuento de leucocitos en líquido cefalorraquídeo o la concentración de glucosa en el mismo y es probable que no impida la visualización de microorganismos en la tinción de *Gram* o la detección de ácido nucleico bacteriano por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

---

<sup>18</sup> FAUCI, BRAUNWALD, KASPER. Harrison Principios de medicina interna 17 Ed, capítulo 376.



Las alteraciones típicas del LCR en la meningitis bacteriana son:

- Leucocitosis polimorfonuclear (PMN) (>100 células/ml en 90% de los casos); decremento de la concentración de glucosa <2.2 mmol/L (<40 mg/100 ml), una tasa de LCR/glucosa sérica <0.4, o ambas cosas, en casi 60% de los pacientes; aumento de la concentración de proteínas >0.45 g/L (>45 mg/100 ml) en 90% de los casos, y aumento de la presión de apertura >180 mmH<sub>2</sub>O en 90% de los casos.
- Los cultivos bacterianos del LCR son positivos en más de 80% de los pacientes, y la tinción de *Gram* del LCR demuestra la presencia de microorganismos en más de 60% de los casos.
- Las concentraciones de glucosa en el LCR <2.2 mmol/L (<40 mg/100 ml) son anormales, y pueden llegar a verse valores de cero en la meningitis bacteriana<sup>19</sup>.

5.1.2 Fisiopatología. En el desarrollo de la Meningitis Bacteriana, generalmente la mucosa nasofaríngea es el sitio de colonización inicial de las bacterias. Estas se adhieren al epitelio respiratorio por medio de receptores específicos de membrana y son transportados a través de células especializadas dentro de vacuolas fagocíticas hasta llegar al torrente sanguíneo.

En este punto, la subsistencia de los microorganismos depende de la estructura capsular, lo cual les permitirán eludir la actividad fagocítica de los neutrófilos y el efecto bactericida de la vía clásica del complemento.

El balance entre los mecanismos de defensa del huésped y el número de bacterias circulantes determinará si la bacteremia se acompañará o no de meningitis, sin embargo este hecho no parece ser el único y actualmente se postula que en las células del plexo coroideo y los capilares cerebrales existen receptores mediadores de adherencia a patógenos meníngeos que permiten el paso al espacio subaracnoideo<sup>20</sup>.

---

<sup>19</sup> TUNKEL AR et al. 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39:1267-84.

<sup>20</sup> NUDELMAN, Y. AND A.R. TUNKEL, Bacterial meningitis: epidemiology, pathogenesis and management update. *Drugs*, 2009. 69(18): p. 2577-96.

Desde el punto de vista inmunológico, el espacio subaracnoideo presenta aspectos que lo hacen particular, como la falta de drenaje linfático y la ausencia de receptores de reconocimiento de patrones solubles (RRP), que ayudan en el reconocimiento bacteriano e incrementan su eliminación por fagocitosis.

Sin embargo, en los tejidos que conforman las leptomeninges se encuentran macrófagos que actúan como centinelas ante la posible infección bacteriana, llevando a cabo su actividad por medio de los RRP. Dentro de la súper familia de los RRP se encuentran receptores de manosa y de complemento principalmente. Sin embargo, también se encuentran RRP que actúan como señalizadores, este es el caso de TLR que se encuentran en células inmunocompetentes intracerebrales<sup>21</sup>.

De los tres componentes de la bacteria, la pared celular y los lipopolisacaridos constituyen los elementos más importantes en la inducción de la cascada inflamatoria, no así la capsula, cuyo efecto principal consiste en contribuir a la mayor invasividad, facilitando la evasión de los mecanismos de defensa del huésped así como de su eliminación.

La inoculación intracisternal de lipopolisacáridos en animales de experimentación desencadena respuesta inflamatoria en el LCR e incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Tal situación también es observada durante el tratamiento de la MB, ya que la administración de antimicrobianos provoca lisis bacteriana e incremento de la concentración de endotoxina con un aumento de la respuesta inflamatoria en el LCR<sup>22</sup>.

**Citocinas Proinflamatorias:** Las citocinas son polipéptidos sintetizados y secretados por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a microorganismos y otros antígenos que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. En medicina clínica, las citocinas son importantes como sustancias terapéuticas y como objetivos de antagonistas específicos en numerosas enfermedades inmunitarias e inflamatorias.

---

<sup>21</sup> PFISTER HW *et al.* 2002. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanisms(s) neuronal injury. The Journal of Infectious Diseases 2002; 186:S225-33.

<sup>22</sup> KOEDEL, UM KLEIN, and H.W. PFISTER, *New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis.* Curr Opin Infect Dis. 2004 (3): p. 217-23.

El nombre genérico citocinas se usa en su nomenclatura, pero como muchas citocinas son sintetizadas por leucocitos (macrófagos o linfocitos T) y actúan sobre otros leucocitos, también se denominan interleucinas, aunque este término es imperfecto, ha sido útil, por que a medida que se van caracterizando molecularmente nuevas citocinas, se les asigna un número de interleucina (IL), por ejemplo, IL-1, IL-2, y así sucesivamente para mantener una nomenclatura estándar.

Aunque las citocinas son variadas desde el punto de vista estructural, comparten varias propiedades, a saber:

La secreción de citocinas es un fenómeno breve y autolimitado. No se almacenan habitualmente como moléculas preformadas y su síntesis se inicia por la transcripción génica nueva como consecuencia de la activación celular. Esta activación de la transcripción es transitoria, y los ARN mensajeros que codifican la mayoría de las citocinas son inestables, por lo que la síntesis de citocinas también es transitoria. Además, la síntesis de algunas citocinas puede ser controlada por el procesamiento del ARN y por mecanismos postraduccionales. Una vez sintetizadas las citocinas se secretan rápidamente, lo que da lugar a un estallido de liberación cuando es necesario.

Las acciones de las citocinas son con frecuencia pleiotrópicas y redundantes. Esto permite que una citocina medie diversos efectos biológicos y a su vez múltiples citocinas tienen los mismos efectos funcionales.

Las citocinas influyen con frecuencia en la síntesis y las acciones de otras citocinas. Esta propiedad da lugar a cadenas en las que una segunda o tercera citocinas puede mediar los efectos biológicos de la primera. Se pueden antagonizar, producir efectos aditivos o sinérgicos.

Ahora, los efectos de las citocinas pueden ser sistémicos o locales. Pueden actuar de forma tanto autocrina, paracrina o endocrina. Cuando se producen en grandes cantidades, las citocinas pueden entrar en la circulación general y actuar a distancia, el TNF- $\alpha$  es un ejemplo bien definido.

Las citocinas inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos en las células diana. Estos receptores tienen dominios citoplasmáticos que activan vías de transducción de señales como la vía Jak-STAT, vía del

dominio TIR/IRAK, cinasas asociadas a receptores, transducción de señales a través de la proteína G, entre otras.

5.1.3 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a bacterias gramnegativas y otros microorganismos infecciosos, y es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves. Inicialmente se identificó como un factor sérico que producía necrosis de los tumores.

Su principal origen son los fagocitos mononucleares activados. El estímulo más potente para su síntesis es el lipopolisacárido (LPS), se sintetiza en forma de proteína de membrana no glucosilada, la cual se escinde por una metaloproteínasa liberando un polipéptido de 17 kD y tres de estas cadenas polipeptídicas se polimerizan para formar la proteína del TNF circulante de 57 kD.

La función del TNF- $\alpha$  en la célula varía dependiendo del receptor al que se una, puede activar el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la proteína de activación-1 (AP-1) o producir la activación de caspasas y desencadenar apoptosis, o ambas cosas.

La principal función fisiológica del TNF es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar a estas células para que erradiquen los microorganismos. Esto lo logra mediante la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, la estimulación de la secreción de quimiocinas, IL-1, estimula la actividad microbicida de los macrófagos. En las infecciones graves, el TNF se sintetiza en grandes cantidades y produce alteraciones clínicas y anatomopatológicas sistémicas como la inducción de fiebre, emaciación, inhibición de la contractilidad miocárdica y relajación del músculo liso llevando al *shock*, trombosis intravascular e hipoglucemia severa.

5.1.4 Interleucina – 1 beta (IL-1 $\beta$ ). La función de la IL-1 $\beta$  es similar a la del TNF- $\alpha$ . Su principal origen son los fagocitos mononucleares activados, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales.

Media sus efectos biológicos a través de un receptor de membrana denominado receptor de la IL-1 de tipo 1, que participa en vías de transducción de señales que activan los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1. Si se secreta en pocas cantidades sus efectos serán locales a través de la expresión de moléculas de

adhesión. Cuando se secreta en cantidades mayores, la IL-1 $\beta$  ejerce efectos endocrinos induciendo fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda hepáticas a través de la IL-6 y producción de plaquetas y neutrófilos por la médula ósea.

5.1.5 Interleucina 12 (IL-12). Es un importante mediador de la respuesta innata temprana frente a microorganismos intracelulares y es un inductor fundamental de la inmunidad celular, que es la respuesta inmunitaria adaptativa frente a estos microorganismos. Sus acciones más importantes son estimular la síntesis del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por los linfocitos T (LT) y los *natural killer* (NK), además de favorecer la diferenciación de los LT cooperadores CD4+ vírgenes en la subpoblación productora de IFN- $\gamma$ . Sus principales orígenes son las células dendríticas activadas y los macrófagos y es esencial para iniciar una secuencia de respuestas en las que participan los macrófagos, linfocitos NK y LT, y da lugar a la erradicación de los microorganismos intracelulares. Potencia las funciones citotóxicas de los linfocitos NK activados y de los LT citotóxicos CD8+, acciones importantes en la inmunidad celular.

5.1.6 Interleucina 10 (IL-10). Es un inhibidor de los macrófagos y células dendríticas activadas y, de esta forma, participa en el control de las reacciones inmunitarias innatas y de la inmunidad celular. Se sintetiza principalmente por macrófagos activados y por los LT reguladores. También puede sintetizarse por queratinocitos. Actúa sobre los macrófagos activados para finalizar su secreción de citocinas y expresión de coestimuladores que potencian la activación de la inmunidad celular, así devuelve al sistema su estado de reposo cuando se ha erradicado la infección microbiana.

Inhibe la síntesis de IL-12 por los macrófagos y las células dendríticas activadas, así se inhibe indirectamente la síntesis de IFN- $\gamma$ .

Inhibe la expresión de coestimuladores de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II sobre los macrófagos y las células dendríticas, debido a esto, la IL-10 actúa inhibiendo la activación de los LT y finalizando las reacciones inmunitarias celulares.

5.1.7 Interleucina 6 (IL-6). Es una citocina que participa en la inmunidad innata y adaptativa. Se sintetiza por fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y otras células en respuesta a los microorganismos y otras citocinas, sobre todo IL-1 y TNF- $\alpha$ .

En la inmunidad innata estimula la síntesis de proteínas de la fase aguda por los hepatocitos y así contribuye a la respuesta de fase aguda. Estimula la producción de neutrófilos a partir de progenitores de la medula ósea.

En la inmunidad adaptativa la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos, de forma similar, la IL-6 actúa como factor de crecimiento para las células plasmáticas neoplásicas (mieloma) y muchas células mielomatosas que crecen autónomamente secretan IL-6 como factor de crecimiento autocrino. También favorece las relaciones inmunitarias celulares estimulando la síntesis de algunas citocinas proinflamatorias e inhibiendo la generación y acciones de los LT reguladores<sup>23</sup>.

---

<sup>23</sup> ABBAS *et al.* Inmunología celular y molecular. Sexta edición. 2006. Elsevier Saunders.

## 6. HIPOTESIS

Las concentraciones elevadas de citocinas proinflamatorias en líquido cefalorraquídeo y plasma se relacionan con una mayor severidad clínica y con una mayor frecuencia de secuelas neurológicas en pacientes con meningitis bacteriana.

## 7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN SUBVARIABLE	CATEGORÍAS	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Características Sociodemográficas	Características que condicionan la neuroinfección	Edad	Edad en años	Años	De razón
		Sexo	Masculino Femenino	Proporción de genero	nominal
Concentraciones de citocinas proinflamatorias	Concentraciones de citocinas proinflamatorias solubles en LCR y plasma de adultos con MB y sanos	Concentraciones en LCR de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 de pacientes con MB	pg/ml	Proporción de concentraciones	De razón
		Concentraciones en LCR de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 de pacientes sanos	pg/ml		De razón
		Concentraciones en plasma de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 de pacientes con MB	pg/ml		De razón
		Concentraciones en plasma de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 de pacientes sanos	pg/ml		De razón
Severidad	Grado de compromiso clínico	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica	SRIS	Grado de severidad	Nominal
		Sepsis	Sepsis		Nominal
Severidad		Sepsis Grave	Sepsis Grave		Grado de



	Grado de compromiso clínico	Shock Séptico	Shock Séptico	severidad	Nominal
Secuelas Neurológicas	Grado de secuelas neurológicas	Muerte Estado vegetativo Incapacidad severa Incapacidad moderada Recuperación buena	1 2 3 4 5	Grado de Secuelas neurológicas	Nominal

## 8. DISEÑO METODOLOGICO

### 8.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional descriptivo de tipo prospectivo.

### 8.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizo en el servicio de urgencias de medicina interna del hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, centro de tercer nivel de atención y referencia para la zona sur de Colombia.

Laboratorio de inmunidad e infección de la facultad de salud de la Universidad Surcolombiana.

### 8.3 POBLACION, MUESTRA Y MUESTREO

8.3.1 Población. Muestras de LCR y sangre de tomadas de pacientes adultos mayores de 18 años que con diagnostico de MB que acudieron al hospital universitario de Neiva entre febrero de 2011 y febrero de 2012.

Muestras de LCR y sangre de pacientes adultos mayores de 18 años a quienes se les practico un procedimiento quirúrgico ambulatorio por causas no infecciosas en el hospital universitario de Neiva.

8.3.2 Muestra. Se utilizo una muestra de tipo no probabilística, de sujetos voluntarios, donde se ingresaron 17 muestras de LCR y plasma de sujetos mayores de 18 años de edad con diagnostico de MB según alteraciones citoquímicas del LCR como ha sido descrito por la *Infectious Diseases Society of America* IDSA 2004<sup>24</sup>, y 19 muestras de LCR y plasma de sujetos sanos sin patología infecciosa.

---

<sup>24</sup> TUNKEL AR. Op., cit. 1267-84

8.3.3 Muestreo. Se realizó un muestreo de tipo no probabilístico de sujetos voluntarios, por conveniencia, de 17 adultos mayores de 18 años de edad; con diagnóstico de MB según alteraciones citoquímicas del LCR como ha sido descrito por la *Infectious Diseases Society of America* IDSA 2004, 19 adultos clínicamente sanos sin evidencia de enfermedad infecciosa.

## 8.4 TECNICAS

En el estudio se utilizaron técnicas de investigación de campo, realizando mediciones biofisiológicas *in vitro* de muestras de LCR y plasma de los sujetos del estudio, de las cuales fueron detectadas las citocinas proinflamatorias por técnica de cartometría de flujo, registrándolas en picogramos por mililitro (pg/ml).

Y las técnicas de investigación documental, a partir de la historia clínica de estos individuos.

## 8.5 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

Diariamente se visitaba el servicio de urgencias de medicina interna del hospital universitario de Neiva para incluir los pacientes mayores de 18 años con sospecha clínica de meningitis bacteriana según las guías para el manejo y tratamiento de la meningitis bacteriana de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) <sup>25</sup>, de estos individuos, previo consentimiento informado del familiar se tomaron 2 mL de LCR en tubos falcon estériles durante la punción lumbar que se les practica a estos pacientes dentro de sus estudios diagnósticos y 10 mL de sangre venosa en tubo con el anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para la obtención de plasma.

Se registraron los datos clínicos y paraclínicos de estos pacientes en la ficha de meningitis con los cuales se clasificaba al individuo según su severidad en síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave y shock séptico según los criterios del consenso internacional sobre definiciones de sepsis <sup>26</sup> (ver anexo A y B).

---

<sup>25</sup> TUNKEL AR *et al.* Op., cit., p.1267: 1267-84

<sup>26</sup> LEVY M, FINK M, MARSHALL J *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. Crit Care Med 2003 vol.31, No 4.

Los controles fueron individuos que ingresaron al hospital universitario para que se les realizara un procedimiento quirúrgico ambulatorio por causas no infecciosas que requería anestesia raquídea, de igual forma, previo consentimiento informado del individuo se tomaron 2 mL de LCR en tubos falcon estériles durante la punción lumbar antes de la administración del anestésico local y 10 mL de sangre en tubos con el anticoagulante EDTA para la obtención del plasma.

Luego de obtenidas, las muestras se trasladaban refrigeradas en neveras portátiles al laboratorio de inmunidad e infección de la facultad de salud de la universidad surcolombiana, aquí se centrifugaron a diez mil revoluciones por minuto durante 10 minutos en centrifuga de rotor con ángulo fijo, se alicuotaron y tanto el LCR como el plasma se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 mL rotulados con la fecha y código del paciente: dd/mm/aa/000 y así sucesivamente. Todas las muestras estuvieron a -70°C hasta el día de su procesamiento para la cuantificación de citocinas proinflamatorias.

Para la cuantificación de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 se uso la técnica “*cytometric bead array*” (CBA) (cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit Catalog No. 551811, Becton Dickinson and company 2010) siguiendo las recomendaciones del fabricante<sup>27</sup>.

- Primero: Preparación de las diluciones estándar de citocinas inflamatorias humanas: se abre una ampolla de 0.2ml con liofilizado de las citocinas inflamatorias humanas IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12p70 que provee el *BD CBA kit # 551811* y se transfieren a un tubo de polipropileno de 15 ml para reconstituirlo con 2ml de la solución buffer para proteínas (*Assay Diluent*) que provee el kit.

Esta solución se deja equilibrar por 15 minutos a temperatura ambiente.

Este tubo se rotula como “*Top Estándar*” del cual se toman 300 $\mu$ l para hacer diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256 en otros tubos con 300 $\mu$ l del *Assay Diluent* que se rotulan como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

Se prepara un tubo con 300 $\mu$ l del *Assay Diluent* que servirá como control negativo, (0pg/ml), se rotula como “CN”.

---

<sup>27</sup> BECTON, Dickinson and company. Cytometric bead array human inflammatory cytokines kit. Instruction manual 2010.

- Segundo: Mezcla de las esferas de captura para citocinas inflamatorias humanas: las seis ampollas de 0.8ml con las esferas de captura específicas para IL-8; IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12p70 se llevan individualmente al vórtex por 5 segundos.

Se adiciona el total de cada una a un tubo de polipropileno de 15 ml rotulado como "*Mezcla Esferas de Captura*", esta mezcla se centrifuga a 200xg por 5 minutos, se aspira y se desecha el sobrenadante, se adiciona el *Serum Enhancement Buffer* que provee el *BD CBA* kit en una cantidad igual a la del sobrenadante que se desechó. Esta mezcla se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente.

- Tercero: Las muestras séricas de los pacientes se diluyen a razón de 1:4.
- Cuarto: Procedimiento para el análisis: el tubo "*Mezcla Esferas de Captura*" se lleva a vórtex por 5 segundos, se adicionan 50 $\mu$ l de este tubo cada uno de 82 tubos para el análisis, a 10 de estos se les adiciona 50 $\mu$ l del *Top Estándar*, 50 $\mu$ l del CN y 50 $\mu$ l de los tubos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

A los tubos restantes (72) se les adiciona 50 $\mu$ l de las preparaciones el LCR y plasmáticas a analizar. Se incuban estos tubos por 1.5 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz con papel aluminio, luego se adiciona 1ml del *Wash Buffer* que provee el *BC CBA* kit a cada uno de los 82 tubos del análisis, se centrifugan a 200g por 5 minutos y se retira el sobrenadante de cada uno.

El sedimento se resuspende adicionando 50 $\mu$ l del agente detector con ficoeritrina (PE) para citocinas inflamatorias humanas a cada tubo (82 en total) para el análisis, se incuban por 1.5 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz con papel aluminio. Luego se agrego a cada tubo 1ml del Wash Buffer y se centrifugan a 200xg por 5 minutos, se aspira y se desecha el sobrenadante de cada uno.

- Quinto: análisis por cartometría de flujo: se calibraron en el citometro de flujo los "*gates*" de fluorescencia usando los controles positivos. Los 82 tubos se llevaron al vortex por 5 segundos antes de su análisis en el citometro.

NOTA: El límite de detección de la prueba en plasma y LCR es: 3.7 pg/ml para el TNF $\alpha$ ; 7,2 pg/ml para la IL-1 $\beta$ ; 2,5 pg/ml para la IL-6; 3.9pg/ml para la IL-8; 3.3pg/ml para la IL-10 y 1.9pg/ml para la IL-12 p70.

Las secuelas neurológicas se evaluaron aplicando a los individuos con meningitis bacteriana la *Glasgow Outcome Scale* <sup>28</sup>, la cual mide funcionalidad del paciente a los seis meses del alta hospitalaria. Clasifica a los pacientes en cinco categorías siendo 1 la muerte, 2 un estado vegetativo (incapaz de actuar recíprocamente con el medio ambiente), 3 incapacidad severa (capaz de seguir ordenes, incapaz de vivir de forma independiente), 4 incapacidad moderada (capaz de vivir independientemente, incapaz de volver al trabajo o escuela), 5 recuperación buena (capaz de volver a trabajar o estudiar sin/con déficit neurológico mínimo) (ver anexo C)

## 8.6 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS DE DATOS

Los datos obtenidos a partir de las técnicas de recolección de información se almacenaron en hojas de cálculo del programa Microsoft office Excel 2010; las cuales representaron la base de datos del estudio y fueron la referencia de información a evaluar en esta investigación.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizo el programa *GraphPad Prism 5*, usando pruebas de estadística no paramétricas para la realización de comparaciones entre los grupos a evaluar, para el análisis de grupos independientes, se utilizo la prueba de *Mann-Whitney* y para determinar el grado de correlación entre las variables se usara el coeficiente de correlación de *Spearman*.

En todos los casos una  $P < 0.05$  se considero significativa para todos los casos.

---

<sup>28</sup> HOOGMAN M, VAN DE BEEK D, WEISFELT M *et al.* Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1092-1096.

## 9. CONSIDERACIONES ETICAS

Esta investigación se realizó según las disposiciones generales consagradas en la resolución 8430 de 1993, por las cuales se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y la cual según el artículo 11 de la misma, clasifica esta investigación como de riesgo mínimo.

Para el desarrollo de la investigación se tendrán en cuenta los principios bioéticos de respeto a la dignidad humana, libertad de expresión y sentimientos, confidencialidad y reciprocidad. A los participantes se les dará a conocer los objetivos y los procedimientos a realizar. Los individuos que en plena libertad y por voluntad propia deseen participar en el proyecto deberán firmar un consentimiento informado donde se especifiquen los principios éticos ya descritos. Se explicará que se realizará una toma de muestra de sangre por medio de venopunción, con riesgos mínimos para su salud. Adicionalmente, se le comunicará que se le preguntará acerca de información sociodemográfica que está en libertad de aportar.

Conforme a la ley 911 de 2004 se salvaguardará la dignidad, la integridad y los derechos de los sujetos del estudio, como principio ético fundamental. Los datos aportados por los participantes tendrán total confidencialidad y por ninguna razón serán divulgados como información individual. Ninguna entrevista o toma de muestra se llevará a cabo sin el respectivo consentimiento informado.

Esta investigación clasificada como *de riesgo mínimo* cumple las disposiciones explícitas en los artículos 14, 15 y 16 de la resolución 8430 de 1993, con lo referente a la aplicación de un consentimiento informado a la población de estudio, que fue sometido a evaluación por parte del comité de bioética de la facultad de salud de la Universidad Surcolombiana, según la normatividad establecida. (Ver anexo D).

Este estudio no presenta conflicto de intereses.

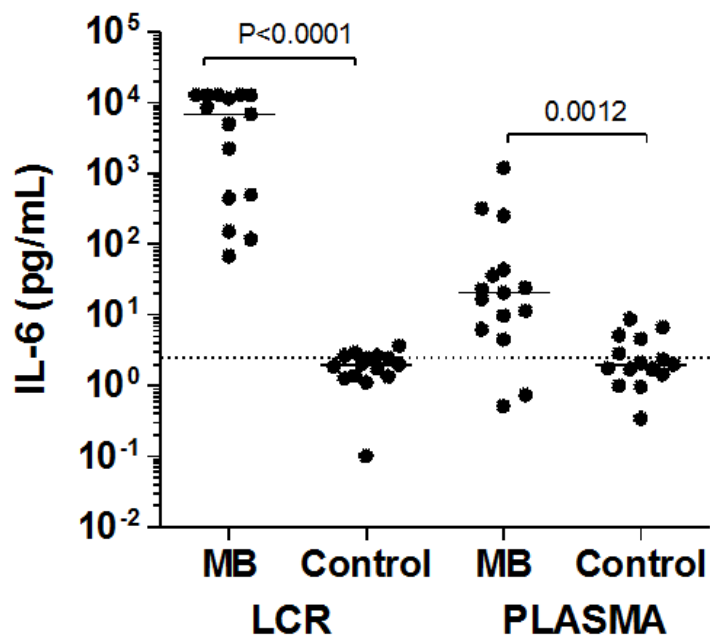
## 10. RESULTADOS

Primero detectamos la diferencia en la concentración en LCR y plasma de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12P70 entre los individuos con MB y sanos.

Ingresaron al estudio 17 individuos con diagnóstico de MB y 19 individuos sin patología infecciosa.

En los individuos con MB, los niveles de IL-6 se encontraron significativamente más altos tanto en LCR como en plasma cuando se compararon con los del grupo control. En el LCR de los casos la IL-6 tuvo una concentración máxima de 12693.2 pg/ml con una mediana de 6865 pg/ml, en plasma, la concentración máxima fue de 1191.65 pg/ml con una mediana de 20.40 pg/ml. En los controles sanos, la concentración de IL-6 en LCR tuvo una concentración máxima de 4.65 pg/ml con una mediana de 1.970 pg/ml y en plasma el valor máximo fue 35.8 con una mediana de 2.080 pg/ml (ver figura 1).

Figura 1. Concentraciones en LCR y plasma de IL-6 en individuos con MB y controles sanos.

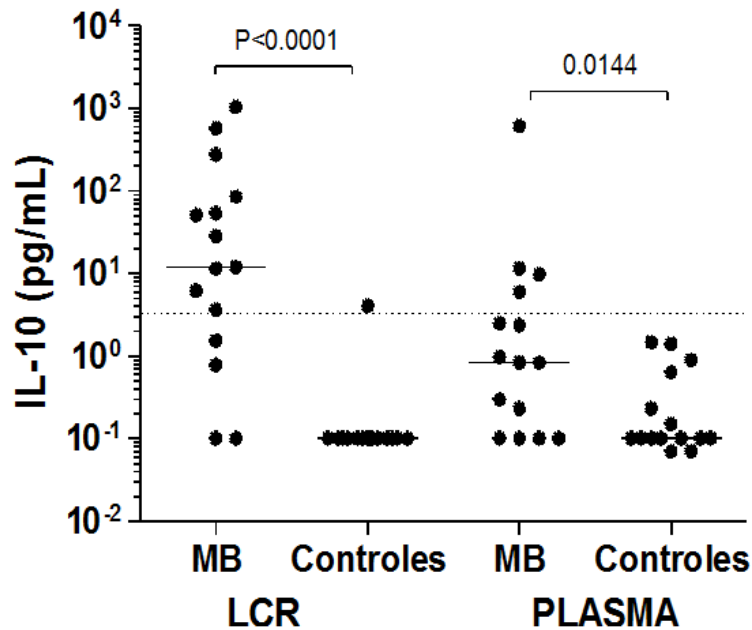


Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.



La concentración de IL-10 en LCR y plasma de los pacientes con MB fue más alta que la encontrada en los controles sanos. La concentración de IL-10 en el LCR de los casos tuvo un valor máximo de 1037.98 pg/ml con una mediana de 11.92 pg/ml, en plasma el valor máximo fue de 612.33 pg/ml con una mediana de 0.8400 pg/ml. En los controles la IL-10 fue indetectable en el LCR y en el plasma el valor máximo fue de 1.47 pg/ml. (ver figura 2).

Figura 2. Concentraciones en LCR y plasma de IL-10 en individuos con MB y controles sanos.



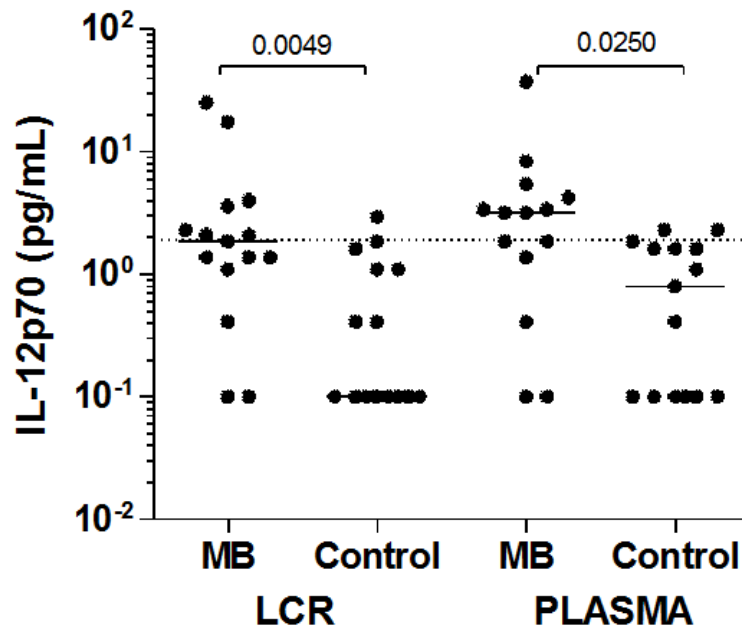
Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Las concentraciones de IL-12p70 estuvieron significativamente más altas tanto en LCR como en el plasma de los individuos con MB cuando se compararon con los controles sanos. En el LCR de los casos, la IL-12p70 tuvo una concentración máxima de 25.2 pg/ml con una mediana de 1.85 pg/ml, en plasma el valor máximo fue de 37.22 pg/ml con una mediana de 3.170 pg/ml. En el LCR de los controles se encontró una concentración máxima de 2.95 de IL-12p70, en plasma el valor máximo fue de 2.74 pg/ml (ver figura 3).

Cuando se compararon las concentraciones de IL-8 de casos y controles, se evidenció que en LCR esta citocina tenía una concentración máxima de 43300.98 pg/ml con una mediana de 1304 pg/ml y en plasma el valor máximo fue 863.93 pg/ml con una mediana de 13.31 pg/ml. Mientras que en el LCR de los controles

sanos, el valor máximo fue 113.46 pg/ml con una mediana de 38.08 pg/ml, en plasma la concentración máxima fue 103.04 pg/ml con un mediana de 7.050 pg/ml. Por lo tanto, las concentraciones de IL-8 fueron significativamente más altas en el LCR los pacientes con MB con respecto al grupo control, en plasma no hubo diferencia, como se aprecia en la figura 4 (ver figura 4).

Figura 3. Concentraciones en LCR y plasma de IL-12p70 en individuos con MB y controles sanos.

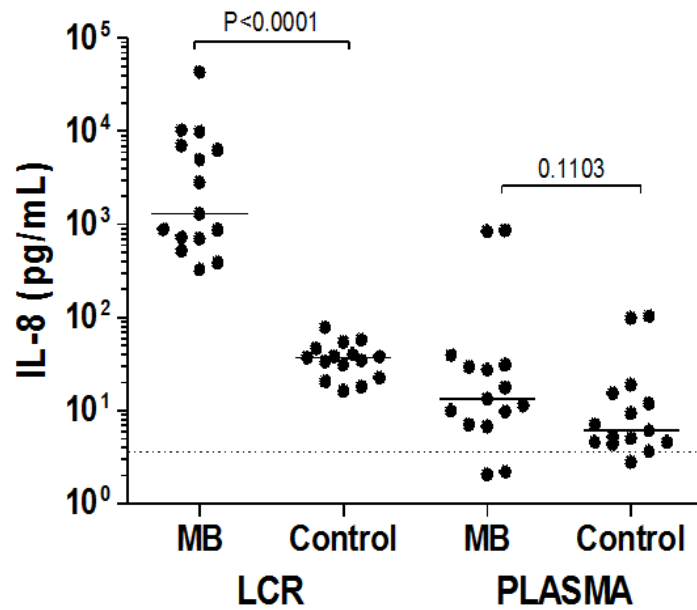


Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

En las concentraciones de IL-1 $\beta$  no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores de esta citocina en LCR y plasma de casos y controles. En el LCR de casos el valor máximo fue de 1039.16 pg/ml con una mediana de 3.550 pg/ml; en plasma la máxima concentración encontrada fue de 3.55 pg/ml con una mediana de 1.310 pg/ml. En los controles, el LCR tuvo una concentración máxima de 2.72 pg/ml con una mediana de 1.170 pg/ml y en plasma de 49.32 pg/ml con una mediana de 0.87 pg/ml (ver figura 5).

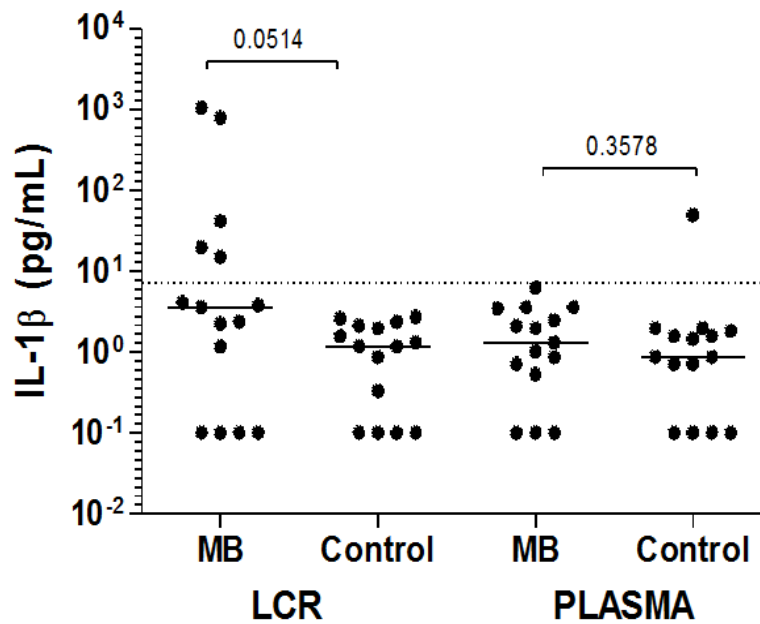
En cuanto a los niveles de TNF- $\alpha$ , encontramos que tanto en casos como en controles las concentraciones estas citocinas estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo usado para medirla (ver figura 6).

Figura 4. Concentraciones en LCR y plasma de IL-12p70 en individuos con MB y controles sanos.



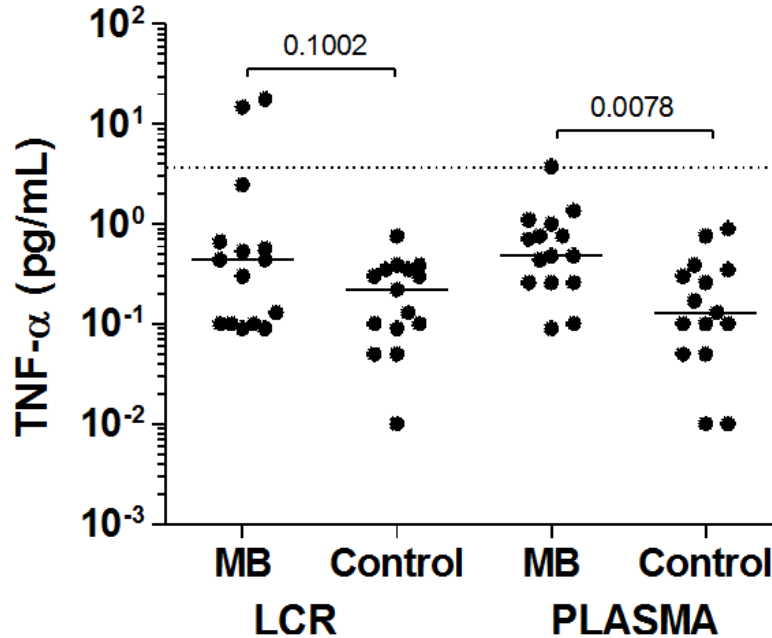
Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Figura 5. Concentraciones en LCR y plasma de IL-1β en individuos con MB y controles sanos.



Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Figura 6. Concentraciones en LCR y plasma de TNF- $\alpha$  en individuos con MB y controles sanos.



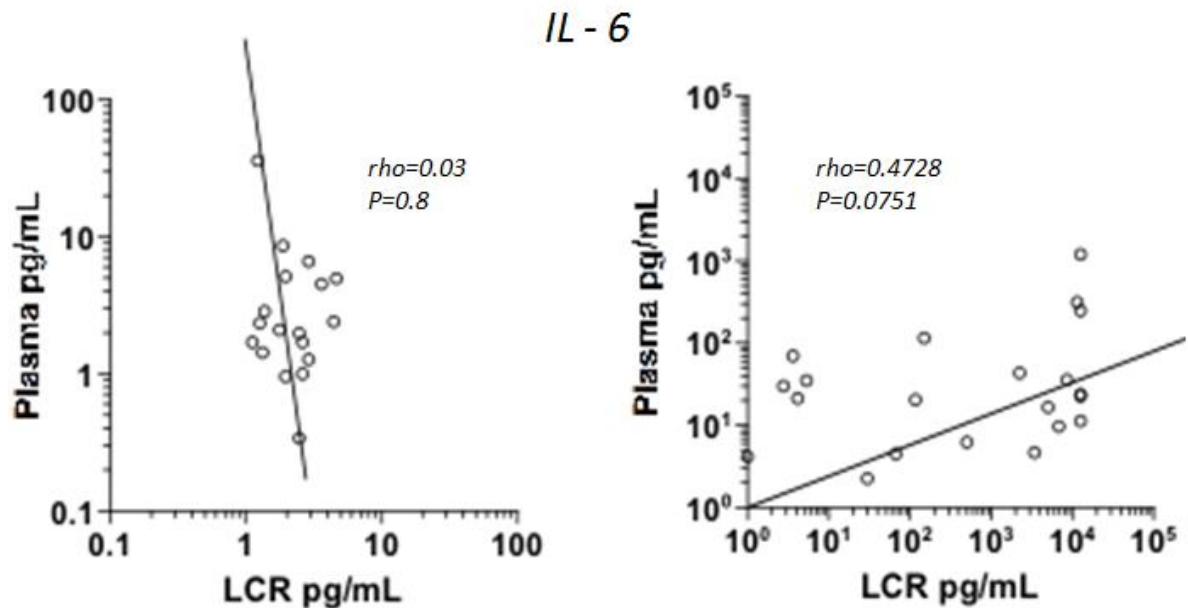
Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Se evaluó la relación que hay entre los niveles de cada citocina proinflamatoria en el LCR con las concentraciones de estas en el plasma de los individuos con MB hallando el coeficiente de correlación de *Spearman*. Se encontró que las concentraciones de citocinas proinflamatorias en LCR no se correlacionan con las encontradas en el plasma.

Sin embargo, con la IL-6, aunque el coeficiente de *Spearman* no muestra una correlación significativa con un  $\rho = 0.4728$  y una  $P = 0.075$ , la tendencia que se aprecia en la figura 7 es clara, creemos que haciendo las diluciones pertinentes y aumentando el número de casos la correlación será significativa indicándonos que el origen de las citocinas es el espacio subaracnoideo (ver figura 7).

Se analizó la asociación entre los niveles de citocinas proinflamatorias en LCR con la severidad clínica de la MB, encontramos que los individuos con cuadros clínicos más severos como sepsis y sepsis grave, tuvieron concentraciones más altas de IL-6, IL-8, IL10 e IL-1 $\beta$  que aquellos con presentaciones clínicas menos severas como SIRS.

Figura 7. Correlación entre las concentraciones de IL-6 en LCR y plasma.



Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

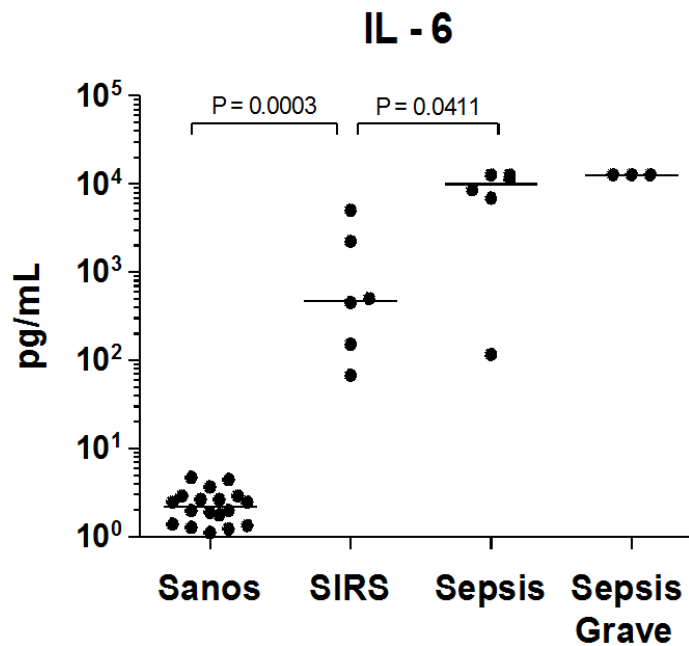
En los individuos sanos la concentración de IL-6 tuvo un valor máximo en LCR de 4.65 pg/ml con una mediana de 1.970 pg/ml, en cambio los individuos con SIRS tuvieron una mediana de 472.7 pg/ml, aquellos con sepsis tuvieron una concentración máxima en LCR de IL-6 de 12693.2 pg/ml con una mediana de 9991 pg/ml y en los individuos con sepsis grave la mediana fue de 12693 pg/ml. Al analizar estos datos mediante el test de *Kruskal - Wallis* obtuvimos una  $P = <0.0001$  lo que nos indica unas medianas significativamente diferentes, como se aprecia en la figura 8 (ver figura 8).

De igual forma, la IL-8 se encuentra en concentraciones significativamente más altas en el LCR de los pacientes con sepsis grave (valor máximo de 43300.98 pg/ml con mediana de 10370 pg/ml) y sepsis (valor máximo de 6253.15 pg/ml con mediana de 2072 pg/ml) cuando se compara con los niveles encontrados en los pacientes con SIRS para los que la mediana fue de 785.2 pg/ml y controles sanos con una mediana de 38.08 pg/ml, de igual forma, al aplicar el test de *Mann - Whitney* entre los grupos con SIRS y sepsis grave obtuvimos una  $P = 0.0238$  demostrando una diferencia significativa en las concentraciones de esta citocina, tal como se ilustra en la figura 9 (ver figura 9).

La IL-10 también se postula como un marcador relacionado con la severidad clínica, pues evidenciamos que los individuos con sepsis grave tenían una concentración máxima de esta citocina en LCR de 1037.98 pg/ml con una mediana de 572.8 pg/ml, en los casos con SIRS la concentración máxima fue de 85.75 pg/ml con una mediana de 2.570 pg/ml, mientras que en los sanos encontramos una concentración máxima en solo un individuo de 4.05, el resto de individuos sanos no mostro niveles de IL-10 detectables en el LCR (ver figura 10).

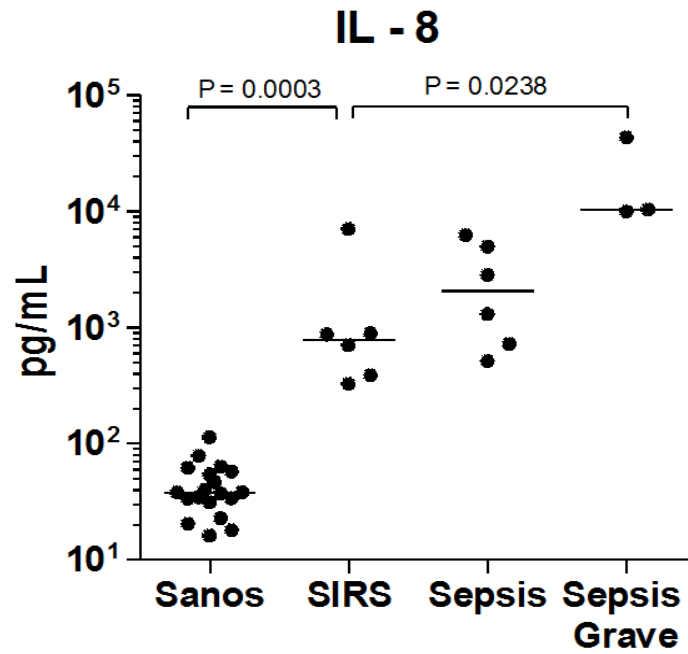
La IL-1 $\beta$  también se asocia con cuadros clínicos más severos. Encontramos que los pacientes con SIRS tenían una concentración máxima de IL-1 $\beta$  en LCR de 4.61 pg/ml con una mediana de 1.610 pg/ml y que los individuos con sepsis grave tenían niveles máximos en 1039.16 pg/ml con una mediana de 778.1 pg/ml, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.0256$  pg/ml) así lo evidencia la figura 11 (ver figura 11).

Figura 8. Relación entre niveles de IL-6 con la severidad clínica de la MB.



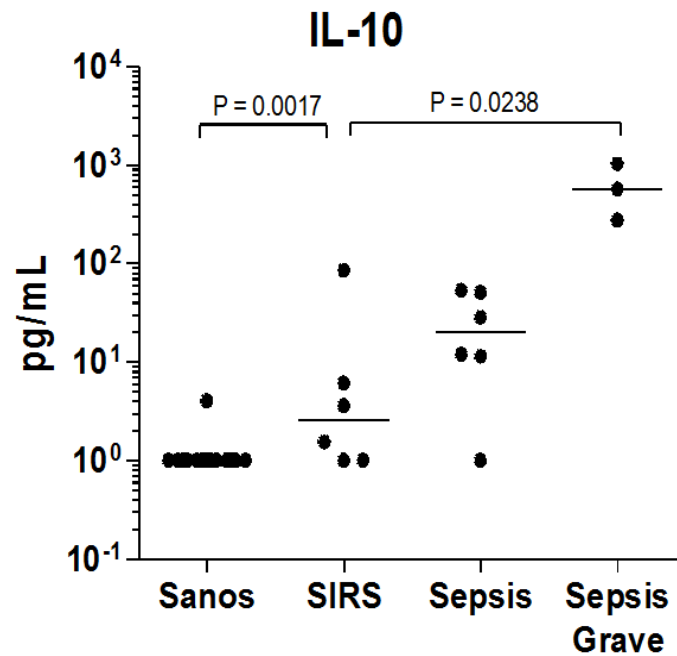
Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Figura 9. Relación entre niveles de IL-8 con la severidad clínica de la MB.



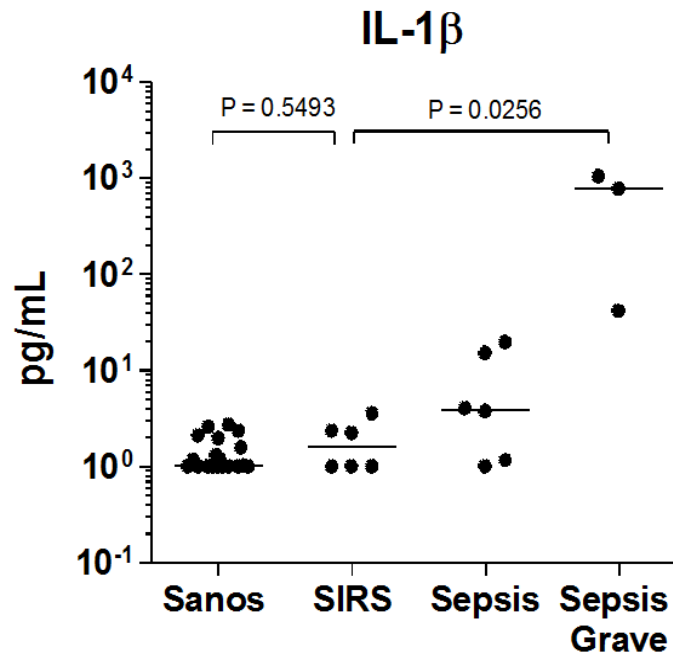
Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Figura 10. Relación entre niveles de IL-10 con la severidad clínica de la MB.



Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Figura 11. Relación entre niveles de IL-1 $\beta$  con la severidad clínica de la MB.



Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Por último se evaluó la asociación entre los niveles de estas citocinas proinflamatorias con la frecuencia de secuelas neurológicas en pacientes con MB, para ello aplicamos como se ha descrito, la *Glasgow Outcome Scale* a 13 de los 17 casos de MB después de un periodo de 3 a 11 meses del alta hospitalaria. De estos 13 pacientes, 9 tuvieron un desenlace clínico desfavorable, es decir un puntaje en esta escala igual o menor a 4, entre los cuales se incluyeron 2 casos de mortalidad.

Encontramos que los individuos que tuvieron un desenlace clínico desfavorable, es decir un puntaje en la *Glasgow Outcome Scale* igual o menor de 4, tenían concentraciones en LCR de IL-6 e IL-8 significativamente más altas que aquellos con un desenlace clínico favorable (un puntaje de 5 en esta escala de funcionalidad neurológica). Las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12p70 no se encontraron asociadas con secuelas neurológicas.

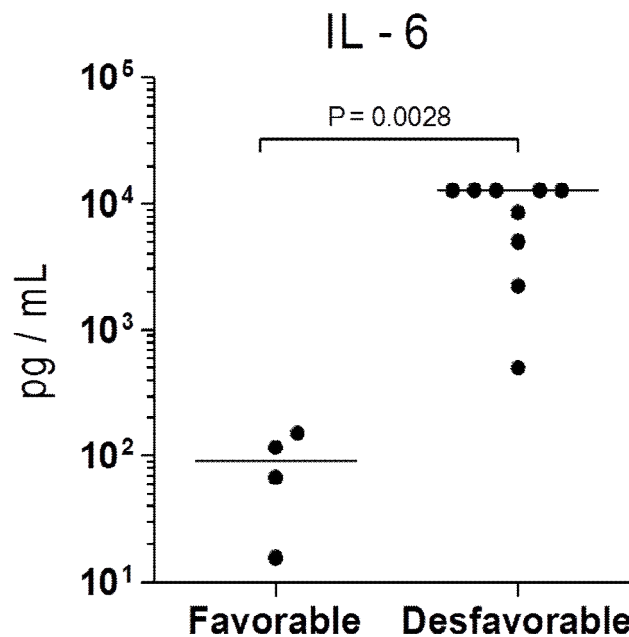
Como se aprecia en la figura 12, los pacientes con un desenlace clínico favorable tuvieron una concentración máxima de IL-6 de 150.6 pg/ml con una mediana de 91.89 pg/ml, mientras que en aquellos con un desenlace clínico desfavorable se



encontró una mediana de 12693 pg/ml. Al aplicar el test de *Mann – Whitney* vemos que hay una diferencia estadísticamente significativa entre sus medianas ( $p = 0.0028$ ), indicándonos que los niveles más altos de IL-6 se relacionan con una mayor frecuencia de secuelas neurológicas (ver figura 12).

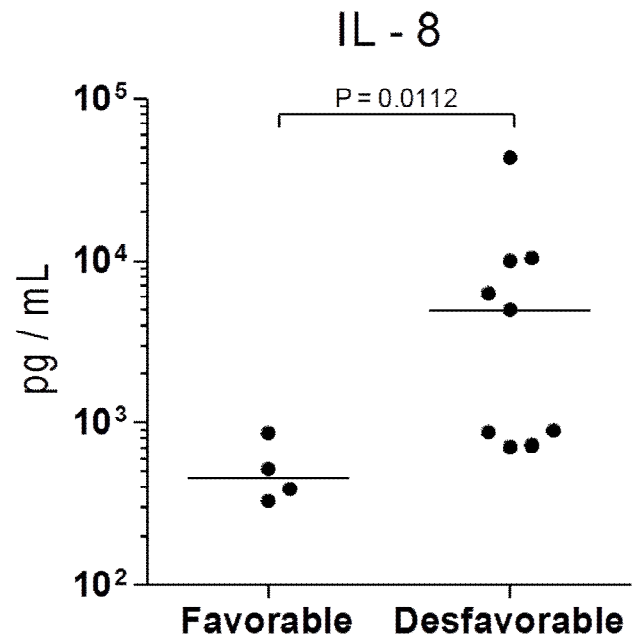
En cuanto a la IL-8, los individuos con un desenlace clínico favorable tuvieron una concentración máxima en LCR de 858.0 pg/ml con una mediana de 452.0 pg/ml. Del otro lado, en los casos con un desenlace clínico desfavorable encontramos una concentración máxima de 43301 pg/ml con una mediana de 4949 pg/ml. Al aplicar el test de *Mann – Whitney* evidenciamos que los pacientes con un desenlace clínico desfavorable tenían concentraciones significativamente más altas de esta citocina en el LCR ( $p = 0.0112$ ), tal como ilustra la figura 13 (ver figura 13).

Figura 12. Comparación de las concentraciones en LCR de IL-6 en casos de MB con desenlace clínico favorable y desfavorable.



Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

Figura 13. Comparación de las concentraciones en LCR de IL-8 en casos de MB con desenlace clínico favorable y desfavorable.



Fuente: Base de datos con concentraciones de citocinas proinflamatorias.

## 11. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la concentración de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12P70 en el LCR y plasma de individuos con MB y se comparó con la de individuos sin patología infecciosa.

Se evidenció que hay un aumento significativo de las concentraciones tanto en LCR como en plasma de IL-6 en el grupo con MB; la IL-8 solo se encontró significativamente más alta en el LCR de los pacientes con MB; la IL-10 se encontró elevada solo en el LCR de los individuos con MB y aunque las concentraciones plasmáticas de estos era significativamente diferente de los individuos sanos, no podemos concluir nada debido a que sus medianas se encontraron por debajo del límite de detección del kit que se usó para cuantificar las citocinas. La IL-12p70 estaba elevada en el plasma de los pacientes con MB con respecto al grupo control. Para la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  se encontró que sus concentraciones estaban por debajo del límite de detección del kit tanto en LCR como en plasma en ambos grupos de individuos.

Nuestros hallazgos concuerdan parcialmente con lo que se ha reportado en la literatura médica. Jornada VL *et al*<sup>29</sup> reportaron en el 2005 que los neonatos con MB tenían concentraciones elevadas en LCR de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 con medianas de 24.8pg/ml, 22.4pg/ml y de 135pg/ml, respectivamente; en el grupo control estas citocinas fueron indetectables en LCR. En nuestro estudio el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  se encontraron por debajo del límite de detección del kit tanto en enfermos como en sanos, no siendo así para la IL-6, en donde tuvimos una mediana de 6865 pg/ml en el LCR de los pacientes adultos con MB y de 1.970 pg/ml para el grupo control ( $p < 0.001$ ).

Esta situación puede ser explicada por la cinética de estas citocinas en el SNC, en el año 2010, Barichello T *et al*<sup>30</sup> publicaron un trabajo en donde tras la inoculación intratecal de pneumococo a ratones medían TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 a las 0, 6, 12, 24, 48 y 96 horas postinoculación. Reportaron que el pico para el TNF- $\alpha$  era a las 6 horas, para la IL-1 $\beta$  fue a las 24 horas, después del cual se hicieron indetectables; para la IL-6 se mantuvieron niveles constantes a lo largo del tiempo.

---

<sup>29</sup> JORNADA VL *et al*. 2005. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of newborn with meningitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(1):7-13.

<sup>30</sup> BARICHELO, T *et al*. 2010. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Neuroimmunology* 2010(42-45).

Ahora, si ponemos estos hallazgos en contexto con el cuadro clínico de la meningitis bacteriana, en donde tras la llegada de la bacteria al espacio subaracnoideo hay un pródromo subagudo de hasta una semana de fiebre, cefalea, fotofobia y malestar general, podemos concluir que al momento de la sospecha clínica y de la punción lumbar para el diagnóstico de MB los niveles del TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  ya han regresado a sus niveles basales. No siendo así para la IL-6 para la que no se detectaron picos en su concentración a lo largo del tiempo.

La IL-6 es la citocina proinflamatoria que más se ha asociado con inflamación infecciosa. Matsuzono *et al*<sup>31</sup> reportaron que los pacientes con MB sin alteraciones citoquímicas del LCR pero con cultivo positivo del mismo, tenían altas concentraciones de IL-6, comparables con aquellos con LCR francamente patológicos. Por lo tanto la detección de IL-6 puede ser de gran valor en la identificación de neuroinfección incluso antes de que haya alteraciones inflamatorias en el LCR.

La IL-6 es tradicionalmente considerada un regulador de la respuesta inflamatoria de fase aguda y un factor estimulador de linfocitos. Sin embargo esta citocina también controla funciones homeostáticas como el metabolismo glucídico o el eje hipotálamo – hipófisis - suprarrenal. Así, durante un episodio inflamatorio, la IL-6 es altamente expresada y los niveles circulantes de esta citocina pueden alcanzar niveles dramáticos. Como una citocina proinflamatoria, la IL-6 orquesta la quimiotaxis de leucocitos y dirige la transición desde la inmunidad innata a la adaptativa a través de la activación, diferenciación y proliferación de leucocitos<sup>32</sup>.

Desde el punto de vista clínico, encontramos que los pacientes con cuadros clínicos más severos como sepsis y shock séptico tenían concentraciones en plasma y LCR más altos que aquellos con SIRS o los individuos sanos. Estos hallazgos, como los de Mokard D *et al*<sup>33</sup> que tras medir procalcitonina e IL-6 a pacientes quirúrgicos encontró que concentraciones séricas de IL-6 mayores o iguales a 310 pg/ml tenían una sensibilidad del 100% y una especificidad del 79% para diferenciar aquellos pacientes que iban a hacer una complicación séptica en el posoperatorio; postulan a la IL-6 como un biomarcador temprano de infección y como un blanco terapéutico, aspecto en el cual se adelantan investigaciones

---

<sup>31</sup> MATSUZONO Y *et al*. Interleukin-6 in cerebrospinal fluid of patients with central nervous system infections. *Acta Paediatr* 1995;84:879-883.

<sup>32</sup> KISHIMOTO T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010. 22(5):347-52

<sup>33</sup> MOKART D *et al*. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth*. 2005.94(6):767-73.

usando antagonistas del receptor de la IL-6 (tocilizumab) en enfermedades inflamatorias crónicas<sup>34</sup>.

Nuestro estudio evidenció que los pacientes con un desenlace clínico desfavorable tenían concentraciones más altas de IL-6 e IL-8 en el LCR que aquellos con un desenlace clínico favorable al medir secuelas neurológicas aplicando la “*Glasgow Outcome Scale*” (GOS) la cual mide funcionalidad del paciente a un periodo fijo después del alta hospitalaria en una escala de 1 a 5, siendo 5 un desenlace clínico favorable y 4 o menos, uno desfavorable. Hoogman M *et al*<sup>35</sup>, evaluaron el resultado cognitivo en los pacientes sobrevivientes con meningitis bacteriana en Holanda. Ellos evaluaron a 155 pacientes encontrando una GOS de 5 en 129 pacientes (82%), GOS de 4 en 25 pacientes (16%) y GOS de 3 en 1 paciente. Sin embargo al aplicar pruebas especiales para evaluar memoria, atención / funciones ejecutivas, funciones psicomotoras, inteligencia y un perfil afectivo encontraron un deterioro cognitivo en el 32%.

Van de Beek *et al*<sup>36</sup>, reportó que el 66% de 696 pacientes con MB tuvieron un desenlace clínico favorable dado por una GOS de 5, 10% una discapacidad moderada dada por una GOS de 4, el 3% con discapacidad severa dada por una GOS de 3, tres pacientes en estado vegetal dada por GOS de 2 y el 21% murieron, es decir una GOS de 1. Concluyendo que el 44% de los pacientes tenían un desenlace clínico desfavorable a los 6 meses del alta hospitalaria.

Aunque esta es una escala bien validada mundialmente, encontramos que del total de 17 pacientes con MB que se incluyeron en nuestro estudio, se pudo aplicar la GOS a 13, de los cuales 9 tuvieron una GOS de 4 o menor, incluyendo dos casos de mortalidad. Además, la GOS se aplicó en un periodo de tiempo heterogéneo después del alta hospitalaria, que fue de 4 a 11 meses. Creemos que para obtener resultados concluyentes en lo referente a secuelas neurológicas es necesario ampliar el número de pacientes de nuestro estudio y aplicar la GOS a todos los pacientes en un mismo lapso de tiempo después del alta hospitalaria, 6 o 12 meses, como esta descrito.

---

<sup>34</sup> JONES SA *et al*. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011. September 1; 121(9): 3375–3383.

<sup>35</sup> HOOGMAN M *et al*. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1092-1096.

<sup>36</sup> VAN DE BEEK D *et al*. 2004. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351:1849-59.

## 12. CONCLUSIONES

La Meningitis Bacteriana, (MB) induce un aumento significativo en las concentraciones de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-10 e IL12p70 tanto en LCR como en plasma.

La IL-8 se encuentra significativamente elevada en el LCR de los pacientes con MB, no siendo así para sus concentraciones plasmáticas.

No hay diferencia entre las concentraciones de IL-1 $\beta$  ni de TNF- $\alpha$  entre los casos con MB y el grupo control.

Las altas concentraciones de citocinas proinflamatorias en LCR se relacionan con un cuadro clínico más severos de la MB.

Los altos niveles IL-6 e IL-8 en el LCR se asocian con una mayor frecuencia de secuelas neurológicas, por lo tanto pueden ser útiles en la predicción temprana de estas complicaciones.

### 13. RECOMENDACIONES

Es necesario continuar el estudio como el objetivo de aumentar el número de individuos con MB e incluir en su ficha de datos inicial parámetros no solo hemodinámicos si no también de disfunción de órganos y tejidos con el fin de mejorar en cuanto a la clasificación de la severidad clínica.

Estudiar todas las muestras de LCR mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de formato múltiple con el objetivo de mejorar el rendimiento diagnóstico de la MB, pues vemos que hasta el 40% de los LCR infectados tienen un cultivo negativo, factor limitante a la hora de diagnosticar a estos pacientes.

Socializar el estudio con otros hospitales a nivel Huila y Colombia para involucrar un mayor número de pacientes y controles sanos, y así hacer una propuesta de mayor magnitud a COLCIENCIAS para su financiamiento.

## BIBLIOGRAFIA

1. BENVENISTE, E.N., 1992. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem. Immunol.* 52, 106–153.
2. ALLAN, M.S., ROTHWELL, N.J., 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 734–744.
3. BARICHELLO, T., 2010. TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Neuroimmunology* 221 (2010) 42-45.
4. GRANDGIRARD, D., STEINER, O., TÄUBER, M.G., Leib, S.L., 2007b. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 114, 609–617.
5. BARICHELLO, T., SILVA, G.Z., BATISTA, A.L., SAVI, G.D. 2009. Early antibiotic administration prevents cognitive impairment induced by meningitis in rats. *Neurosci. Lett.* 465, 71–73
6. JORNADA VL; OKAY TS; OKAY Y. 2005. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of newborn with meningitis. *Arg Neuropsiquiatr* 2005; 63(1):7-13.
7. VAN DE BEEK D; DE GANS J; SPANJAARD L. 2004. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351:1849-59.
8. BROUWER MC, TUNKEL AR, VAN DE BEEK D. 2010. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, July 2010, p. 467-492.
9. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD – Sistema de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA. Enero 2012



10. DES PORTES, V., [Long-term follow-up of bacterial meningitis - sequels in children and adults: incidence, type, and assessment issues]. *Med Mal Infect*, 2009. 39(7-8): p. 572-80.
11. VAN DE BEEK *et al.* Op., cit. p., 1855: 1849-59.
12. KOEDEL U, SCHELD WM, PFISTER HW. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infect Dis* 2002; 2: 721-36
13. VAN DE BEEK, de GANS J, TUNKEL AR. 2006. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 2006; 354:44-53.
14. VAN DE BEEK. Op., cit. p., 354:44-53.
15. BROUWER MC. Op., cit. p., 468: 467-492.
16. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
17. SOMAND, D. and W. MEURER, *Central nervous system infections. Emerg Med Clin North Am*, 2009. 27(1): p. 89-100, ix.
18. FAUCI, BRAUNWALD, KASPER. Harrison Principios de medicina interna 17 Ed, capitulo 376.
19. TUNKEL AR *et al.* 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39:1267-84.
20. NUDELMAN, Y. AND A.R. TUNKEL, Bacterial meningitis: epidemiology, pathogenesis and management update. *Drugs*, 2009. 69(18): p. 2577-96.
21. PFISTER HW *et al.* 2002. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanisms(s) neuronal injury. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 186:S225-33.

22. KOEDEL, UM KLEIN, and H.W. PFISTER, *New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. Curr Opin Infect Dis.* 2004 (3): p. 217-23.
23. ABBAS A *et al.* Inmunología celular y molecular. Sexta edición. 2006. Elsevier saunders.
24. TUNKEL AR. Op., cit. 1267-84
25. TUNKEL AR *et al.* Op., cit., p.1267: 1267-84
26. LEVY M, FINK M, MARSHALL J *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003 vol.31, No 4.
27. BECTON, Dickinson and company. Cytometric bead array human inflammatory cytokines kit. *Instruction manual* 2010.
28. HOOGMAN M, VAN DE BEEK D, WEISFELT M *et al.* Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1092-1096.
29. JORNADA VL *et al.* Op., cit., p. 11: 7-13.
30. BARICHELLO T *et al.* OP., cit., p. 43: 42-45
31. MATSUZONO Y, NARITA M, AKUTSU Y, TOGASHI T. Interleukin-6 in cerebrospinal fluid of patients with central nervous system infections. *Acta Paediatr* 1995;84:879-883.
32. KISHIMOTO T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010. May; 22(5):347-52
33. MOKART D, MERLIN M, SANNINI A. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth.* 2005. 94(6):767-73.

34. JONES SA, SCHELLER J, ROSE-JHON S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011. 121(9): 3375–3383.
35. HOOGMAN M. Op., cit. p., 1094: 1092-1096
36. VAN DE BEEK. Op., cit. p., 351:44-53.

# ANEXOS

Anexo A. Ficha clínica de Meningitis Bacteriana.

<b>FICHA DE CASOS NEUROINFECCION</b>		<b>PACIENTE:</b> <table border="1" style="display: inline-table; width: 100px; height: 20px; vertical-align: middle;"><tr><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td></tr></table>																						
FECHA: _____																								
<b>1. DATOS PERSONALES:</b>																								
NOMBRE: _____ EDAD: _____ SEXO: M _____ F _____ CC: _____																								
HC: _____ CAMA: _____ TELEFONO: _____ ESTRATO SOCIOECONOMICO: _____																								
<b>2. PROCEDENCIA:</b>		<b>3. ANTECEDENTES:</b>																						
<b>PARENTESCO</b>	<b>PROCEDENCIA: (MUNICIPIO / DEPARTAMENTO)</b>	<b>PATOLOGICOS</b>																						
PACIENTE		FARMACOLOGICOS																						
PADRE		QUIRURGICOS/TRAUMA																						
MADRE		TOXICO / ALERGICOS																						
ABUELOS PATERNOS		HOSPITALARIOS																						
ABUELOS MATERNOS																								
<b>4. SIGNOS Y SINTOMAS DEL PACIENTE (MARQUE CON UNA X LOS DATOS POSITIVOS - ESPECIFIQUE):</b> TA: ____ / ____ , FC: ____ , FR: ____ , T°C: ____ ,																								
<b>GLASGOW</b>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">CEFALEA</td> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 15%;">SIGNOS MENINGEOS (KERNING – BRUDZINSKI)</td> <td style="width: 15%;"></td> </tr> <tr> <td>FIEBRE: °C</td> <td></td> <td>CONVULSION</td> <td></td> </tr> <tr> <td>FOCALIZACION</td> <td></td> <td>CAMBIOS CONSCIENCIA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>RIGIDEZ NUCCAL</td> <td></td> <td>CAMBIOS COMPORTAMIENTO</td> <td></td> </tr> </table>	CEFALEA		SIGNOS MENINGEOS (KERNING – BRUDZINSKI)		FIEBRE: °C		CONVULSION		FOCALIZACION		CAMBIOS CONSCIENCIA		RIGIDEZ NUCCAL		CAMBIOS COMPORTAMIENTO		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;"><b>IMAGEN</b></td> <td style="width: 85%;"><b>REPORTE</b></td> </tr> <tr> <td>TAC CEREBRAL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>RM</td> <td></td> </tr> </table>	<b>IMAGEN</b>	<b>REPORTE</b>	TAC CEREBRAL		RM	
CEFALEA		SIGNOS MENINGEOS (KERNING – BRUDZINSKI)																						
FIEBRE: °C		CONVULSION																						
FOCALIZACION		CAMBIOS CONSCIENCIA																						
RIGIDEZ NUCCAL		CAMBIOS COMPORTAMIENTO																						
<b>IMAGEN</b>	<b>REPORTE</b>																							
TAC CEREBRAL																								
RM																								
< 8																								
8 – 12																								
> 12																								
<b>5. CUADRO HEMATICO:</b> FECHA: _____																								
LEUCOCITOS	NEUTROFILOS	LINFOCITOS	EOSINOFILOS	PLAQUETAS	HEMOGLOBINA	HTOCRITO	PCR	GLICEMIA																
<b>6. TIEMPOS DE COAGULACION:</b>																								
TP: _____ [CONTROL: _____ ] TPT: _____ [CONTROL: _____ ]																								
<b>7. ESTUDIO CITOQUIMICO LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO:</b> FECHA: _____																								
PRESION DE APERTURA: _____ cmH <sub>2</sub> O.																								
LEUCOCITOS	NEUTROFILOS	LINFOCITOS	PROTEINAS	GLUCOSA	ERITROCITOS	GRAM	TINTA CHINA	LATEX	KOH	BK														
<b>8. HEMOCULTIVOS:</b> FECHA: _____ REPORTE: _____																								

## Anexo B. Definiciones de sepsis.

Sepsis: cualquier infección documentada o sospechada con dos o más de los siguientes criterios:

Fiebre (temperatura central  $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ) o hipotermia (temperatura central  $< 36^{\circ}\text{C}$ )

Taquicardia  $> 90$  latidos/minuto

Taquipnea  $> 30$  respiraciones/minuto

Alteración de la consciencia

Edema o balance positivo  $> 20$  ml/kg en 24 horas

Hiperglicemia (glucosa plasmática  $> 110$  mg/dl) en ausencia de diabetes

Leucocitosis ( $> 12.000/\text{mm}^3$ ) o leucopenia ( $< 4.000/\text{mm}^3$ ) o recuento normal con  $> 10\%$  formas inmaduras

Niveles plasmáticos altos de proteína C reactiva o procalcitonina

$\text{SvcO}_2 > 70\%$  o índice cardíaco  $> 3,5$  l/min/m<sup>2</sup>

Sepsis grave: episodio de sepsis asociado a disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión atribuible a la sepsis

Hipoxemia con  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$  mmHg

Oliguria (diuresis  $< 0,5$  ml/kg/hora durante al menos 2 horas)

Creatinina incremento  $> 0,5$  mg/dl o valor  $> 2$  mg/dl

Trastorno de la coagulación (INR  $> 1,5$  o TTPa  $> 60$  segundos)

Trombocitopenia  $< 100.000/\text{mm}^3$

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina  $> 2,0$  mg/dl)

Hiperlactacidemia ( $> 3$  mmol/l o 24 mg/dl)

Hipotensión arterial (TAS  $< 90$  mmHg, TAM  $< 70$  o descenso de la TAS  $> 40$  mmHg)

*Shock séptico*: hipotensión arterial persistente que no pueda ser explicada por otras causas diferentes a la sepsis, y que no se recupera a pesar de la resucitación con volumen adecuado

Anexo C. Escala para medir secuelas neurológicas

<b>GLASGOW OUTCOME SCALE</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>HC</b>	<b>FECHA</b>
<b>ESTADO</b>		<b>VALOR</b>
MUERTE		1
ESTADO VEGETATIVO: INCAPAZ DE ACTUAR RECIPROCAMENTE CON EL MEDIO AMBIENTE.		2
INCAPACIDAD SEVERA: CAPAZ DE SEGUIR ÓRDENES; INCAPAZ DE VIVIR DE FORMA INDEPENDIENTE.		3
INCAPACIDAD MODERADA: CAPAZ DE VIVIR INDEPENDIENTEMENTE; INCAPAZ DE VOLVER AL TRABAJO O ESCUELA.		4
RECUPERACION BUENA: CAPAZ DE VOLVER A TRABAJAR O ESTUDIAR SIN/CON DEFICIT NEUROLOGICO MINIMO.		5

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA

Anexo D. Consentimiento informado

“PATRON DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN LIQUIDO  
CEFALORRAQUIDEO Y PLASMA Y SU ASOCIACION CON LA SEVERIDAD  
CLINICA Y SECUELAS NEUROLOGICAS DE LOS PACIENTES CON  
MENINGITIS BACTERIANA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE NEIVA  
ENTRE FEBRERO DE 2011 Y FEBRERO DE 2012”

Yo, \_\_\_\_\_ con cédula de ciudadanía número \_\_\_\_\_ de constancia que en la fecha de hoy fui informado sobre el proyecto de investigación “Patrón de citocinas proinflamatorias en líquido cefalorraquídeo y plasma y su asociación con la severidad clínica y secuelas neurológicas de los pacientes con meningitis bacteriana en el hospital universitario de Neiva entre febrero de 2011 y febrero de 2012” y que después de conocer sus objetivos y procedimientos, he aceptado libremente participar, donando una muestra de sangre y de líquido cefalorraquídeo tomada por un experto que según la Resolución 8430 de 1993, se considera un estudio con riesgo mínimo, la cual será exclusivamente utilizada por los investigadores del proyecto para extraer ADN (Ácido Desoxiribonucleico), tipificar marcadores genéticos por medio de ensayos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y cuantificación de citocinas proinflamatorias asociadas.

Soy consciente de que los resultados de este estudio aportarán al mejor conocimiento tanto a nivel Genético, Inmunológico como Clínico de la Meningitis Bacteriana en Colombia y su relación con los diferentes grados de susceptibilidad genética para el desarrollo de esta enfermedad descritos a nivel mundial.

He sido informado que tengo derecho a:

- Recibir información y obtener respuesta a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación.



- Retirar mi consentimiento en el momento que los desee sin que se genere perjuicios en mi cuidado o tratamiento.

- La información recolectada se utilizara únicamente para los fines investigativos ya descritos.

- La seguridad de que no se me identificara por mi nombre y el compromiso de proporcionarme la información obtenida durante el estudio, respetándose el derecho a la intimidad.

- También me queda claro que este estudio no me traerá ningún beneficio personal.

Acepto participar en el estudio con el compromiso por parte de los investigadores de que la información que suministro y aquella obtenida en la investigación serán manejadas confidencialmente, y que no serán utilizados para fines distintos a los científicos.

\_\_\_\_\_  
FIRMA  
C.C

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo  
C.C

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Relación con el paciente

Fecha \_\_\_\_\_