

Diagnóstico Molecular de la Meningoencefalitis Viral. Utilidad Clínica de las Pruebas

Liliana Torres,¹ Yeimy Rojas,² Yuz Govia,² Mónica Sequera²

¹Departamento de Bioquímica. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia- Estado Carabobo. Venezuela. ²Laboratorio de Biología Molecular Centro Médico Valles de San Diego-Estado Carabobo. Venezuela
Correspondencia: lillianaemperatriz8@hotmail.com

Resumen

Las meningoencefalitis no bacterianas, son procesos inflamatorios frecuentes que afectan del SNC; las cuales cursan con síntomas en las vías respiratorias altas, cefalea, mialgias, fiebre, irritación meníngea, náuseas y convulsiones. Objetivo: determinar la utilidad clínica del diagnóstico molecular de la meningoencefalitis viral. Metodología: en el Laboratorio de Biología Molecular, Centro Médico Valle de San Diego, Estado Carabobo, Venezuela, se estudiaron 322 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), pertenecientes a un grupo de pacientes que ingresaron al Centro Médico, durante el período Marzo 2010-Diciembre 2012; a los cuales se les solicitó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para Meningitis Viral Múltiple y PCR para Enterovirus. Resultados: del total de pacientes, se detectaron 256 pruebas negativas (79,5%) y 66 positivas (20,5%). Conclusiones: el enterovirus humano fue el virus predominante en las muestras analizadas en este estudio, observándose 22 casos (27%) Positivos.

PALABRAS CLAVES: Meningoencefalitis Viral, PCR-MÚLTIPLE.

Abstract

MOLECULAR DIAGNOSTIC TESTS OF VIRAL MENINGOENCEPHALITIS. CLINICAL APPLICATIONS

Non-bacterial meningoencephalitis is a frequent inflammatory disease affecting central nervous system (CNS) function; often presenting with symptoms of the upper respiratory tract, headache, myalgia, fever, signs of meningeal sensitivity, nausea and convulsions. Objective: The objective of this work was to determine the usefulness of molecular diagnosis techniques of viral meningoencephalitis. Methodology: We studied 322 cerebrospinal fluid (CSF) samples obtained from patients admitted to the medical center and assayed at the "Laboratorio de Biología Molecular del Centro Médico Valle San Diego", Carabobo State, Venezuela, during the period March 2010-December 2012, search through Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and with PCR enterovirus meningitis assay. Results: 256 patients were found negative (79.5%) and 66 positive (20.5%). Conclusions: Human Enterovirus was the predominant virus (27%) diagnosed in the samples analyzed in this study.

KEY WORDS: Viral meningoencephalitis, PCR-MULTIPLE.

Introducción

La infección viral de las meninges forma parte de las llamadas meningitis asépticas (MA) o meningitis linfocitarias, es decir, aquellas en las cuales no es posible aislar un agente patógeno con las técnicas de cultivo bacteriano habitual y en las cuales se puede o no observar leucocitosis y pleocitosis; también se les conoce como meningitis a líquido claro, porque se observa un líquido cefalorraquídeo (LCR) que no es purulento o turbio como las de origen bacteriano.¹ La incidencia y manifestaciones clínicas de estas infecciones varían entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos y entre éstos últimos, la población más afectada es la positiva para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).^{2,8}

En cuanto al agente etiológico de las meningoencefalitis virales, los más frecuentes, son los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae, los cuales, tienen un claro tropismo por el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) produciendo diferentes cuadros clínicos que abarcan desde la encefalitis grave a la MA benigna, mielitis

transversa, radiculopatías y polineuropatías periféricas y craneales; también se han implicado en la patogenia de algunas enfermedades desmielinizantes. Otro de los virus importante de señalar, actualmente implicado en los casos de MA son los pertenecientes al género Enterovirus (EV), causando entre un 85-95% de los casos; pertenecen a la familia de los Picornavirus y se clasifican en 2 clases: el grupo Poliovirus (tipos 1, 2 y 3) y el grupo no Poliovirus (coxsackie, echovirus y enterovirus no clasificados). Se han identificado 71 serotipos de EV y el ser humano es el único reservorio.^{4,6,9}

El diagnóstico de las meningoencefalitis virales se ha podido facilitar gracias a la introducción del uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La rapidez en el diagnóstico, permite además instaurar el tratamiento adecuado precoz, mejorando el pronóstico de las enfermedades graves producidas por estos microorganismos, ya que la meningitis en general produce un gran impacto sanitario.^{3,5,6}

Esta investigación destaca la importancia del diagnóstico temprano y preciso de estas enfermedades (encefalitis

y meningitis), con el fin de evitar que se comprometa aún más la salud del paciente. La técnica PCR se está utilizando de forma rutinaria y los resultados se obtienen a las 24 h después de la recepción de la muestra, significando esto, una herramienta para el diagnóstico rápido de estas infecciones, con la finalidad de buscar los agentes etiológicos virales y poder evitar el uso de antibióticos en el tratamiento de estos pacientes.

Materiales Y Métodos

Se estudiaron un total de 322 muestras de LCR, provenientes de un grupo de pacientes que ingresaron al Centro Médico Valle de San Diego (66 de ambulatorios, 46 de servicios de emergencia y 210 de pacientes hospitalizados) durante el período Marzo 2010-Diciembre 2012, a los cuales se les solicitó el análisis por el sistema de laboratorio PCR Múltiple Meningitis Viral y PCR Enterovirus.

Las muestras fueron consideradas como positivas dependiendo de la detección de las secuencias de genoma específicas para cada agente infeccioso estudiado. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento. El reporte individual de los resultados para cada paciente fue emitido en un lapso de 24 a 48 horas posterior a la recepción de las muestras.

Extracción de los Ácidos Nucleicos (ADN y ARN). Se utilizó el Kit Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences). Se tomaron 200 µL de LCR y se colocaron en un tubo de 1,5 mL, a los cuales se les añadió 200 µL de Buffer V-L (Lisis Viral) mezclándose vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente (T.A.) por 5 min. Luego se añadieron 75 µL de Buffer V-N (Precipitación de Proteínas), se mezcló con vórtex y se centrifugó por 5 min a 12.000 rpm. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo de 2,0 mL al cual se agregó 250 µL de una mezcla que contenía isopropanol + ácido acético al 1%, mezclándose suavemente. Todo este contenido se colocó en una columna Miniprep, que fue centrifugada a 6.000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante filtrado por la columna, esta se colocó nuevamente en el tubo, al cual se añadieron 500 µL de Buffer W1A incubándose por 1 min a temperatura ambiente; luego se centrifugó a 12.000 rpm por 1 min y se añadieron 800 µL de Buffer W2, centrifugándose a 12.000 rpm por 1 min. El filtrado se descartó y se colocó la columna en el tubo para hacer una última centrifugación en lo que respecta a lavados, a 12.000 rpm por 1 min, con el fin de remover el buffer residual que contiene etanol, el cual es un inhibidor de la PCR.

En el paso final, la columna fue colocada en un tubo limpio de 1.5 mL y se le añadieron 40 µL de Buffer TE (5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM EDTA) en el centro de la membrana, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 12.000 rpm por 1 min para la elusión final de los ácidos nucleicos.

El producto eluido final se utilizó inmediatamente para PCR múltiple y RT-PCR. En caso de que no se pudiera procesar inmediatamente se almacenó a -20°C.

PCR- Múltiple y RT-PCR. Para lograr amplificar múltiples secuencias del genoma de diferentes agentes virales causantes de meningoencefalitis, se procedió a realizar una PCR Múltiple con Kit comercial denominado Meningitis-V1 ACE Detection Seeplex® (Seegene) y Meningitis-V2 ACE Detection Seeplex® (Seegene), acorde con el protocolo del fabricante. En esta PCR-Múltiple se usó la tecnología DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide) de Seegene, un control interno presente en la mezcla de PCR que permitió detectar inhibiciones; un control negativo fue practicado con agua desionizada y un control positivo DNA y RNA para evaluar la presencia de todos los iniciadores (primers); así como también, una solución denominada 8-MOP para reducir el riesgo de contaminación ambiental. El kit de MV1 contiene primers que fueron específicamente diseñados de regiones altamente conservadas de la secuencia genética de 6 agentes patógenos: Virus Herpes Simple 1 y 2 (VHS 1 y 2), Virus Varicela Zoster (VVZ), Virus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV) y Virus Herpes Humano 6 (VHH6).

El kit de MV2 fue diseñado para determinar Enterovirus Humano (especialmente RT-PCR Poliovirus, Echovirus, and Coxsackievirus), partiendo de una RT-PCR previa, donde se utilizó el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas) según el protocolo del fabricante; este kit utiliza como enzima de transcriptasa reversa la M-MuLV, la cual tiene más baja actividad RNasa que la enzima AMV Transcriptasa Reversa.

Las amplificaciones de todos los ensayos se realizaron en un termociclador modelo Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando para la reacción tubos de ensayo de pared delgada de 0,2 mL (Axygen). Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% que contenía 0,8 µL de SYBR® SAFE DNA (Life Technologies™) a una concentración de 10.000x DMSO. Se utilizó el marcador de peso molecular que provee el kit tanto de MV1 y MV2, las corridas se realizaron utilizando una corriente eléctrica de 100 voltios por 20 min, posteriormente, las bandas fueron visualizadas mediante luz ultravioleta en un transiluminador BioDoc-It™ (Benchtop UVP), siendo identificados cada uno de los patógenos por el tamaño de la banda obtenida.

Resultados

Del total de 322 muestras de LCR procesadas, 256 pacientes resultaron negativas (79,5%) y las provenientes de 66 pacientes resultaron positivas (20,5%), para algunos de los virus estudiados en los perfiles MV1 y MV2.

Un total de 75 Virus fueron identificados mediante la

realización de los PCR múltiples y detección por electroforesis en gel de agarosa (Figuras 1 y 2).

El Enterovirus Humano fue el virus más encontrado en este estudio, observándose 22 casos (29,5%), seguido de 16 casos (21,5%) de Virus Epstein-Barr (EBV), 14 casos (19%) de Herpes Virus Humano 6 (HHV 6), 12 casos (16%) de Virus Herpes Simple 1 (VHS 1), 8 casos (11%) de Virus Varicela Zoster (VVZ) y 2 casos (3%) de Citomegalovirus (CMV). Se presentaron 8 casos de coinfección viral.^{1,3,6,8}

Figura 1

RESULTADOS DE PCR MÚLTIPLE USANDO MENINGITIS-V1 ACE DETECTION (SEEPLEX®). ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1,5%, TENIDO CON SYBR® SAFE DNA EN EL QUE SE OBSERVA EL CONJUNTO DE BANDAS PRODUCTOS DE LA PCR MÚLTIPLE MENINGITIS VIRAL, (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 PB (SEEGENE).¹⁻⁶

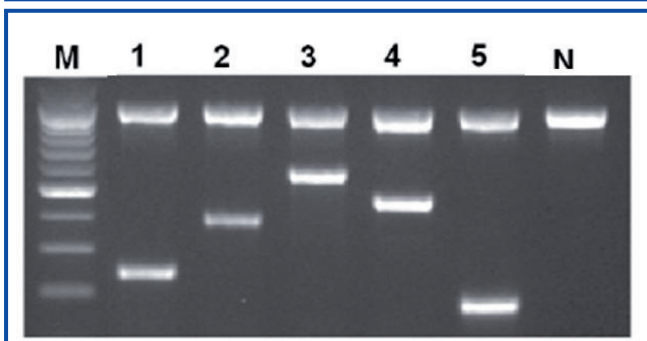
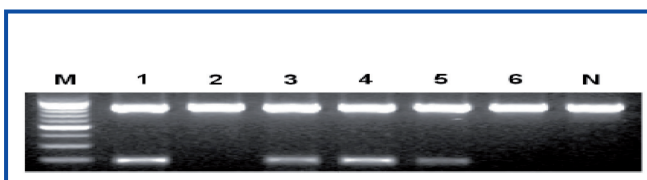


Figura 2

RESULTADOS DE PCR MÚLTIPLE USANDO MENINGITIS-V2 ACE DETECTION (SEEPLEX®). ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1,5%, TENIDO CON SYBR® SAFE DNA, EN EL QUE SE OBSERVA EL CONJUNTO DE BANDAS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA ENTEROVIRUS HUMANO, (M) MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 PB (SEEGENE), (1-6) MUESTRAS CLÍNICAS Y (N) CONTROL NEGATIVO.



Discusión

La determinación de la etiología de la meningoencefalitis viral, enfermedad grave del SNC, dejó de ser un problema en la mayoría de los casos, ya que

ahora se cuenta con métodos moleculares como la PCR para establecer un diagnóstico rápido y preciso, poder así instaurar a tiempo una terapéutica adecuada y eficaz. El escenario actual de las afecciones del SNC es complejo debido al creciente número de pacientes con diversas formas de inmunosupresión, al aumento de la sobrevivencia de los pacientes oncológicos, el fácil transporte de agentes patógenos de una a otra región mundial (emergencia y reemergencia), incorrectas campañas de vacunación y grave problema de la resistencia bacteriana. Las meningoencefalitis virales, plantean siempre grandes dilemas, los que abarcan todos los aspectos de la enfermedad: la presentación inicial, las manifestaciones clínicas, el diagnóstico, el tratamiento, la evolución y el pronóstico. En este contexto el médico clínico se ve enfrentado a un paciente con un conjunto de signos y síntomas de compromiso del SNC, habitualmente con una corta evolución, y entonces surge una interrogante: ¿Estoy frente a un cuadro bacteriano o ante una meningoencefalitis viral aguda?^{2,12}

En el presente trabajo se aplicaron ensayos de PCR para la detección de diferentes agentes infecciosos neurotrópicos (EV y Herpesvirus humanos) en muestras de LCR provenientes de un grupo de pacientes con sospecha clínica de meningoencefalitis de posible etiología viral, encontrándose un total de 20,5% de positividad, siendo el EV, Virus EBV, Virus HH6 y VHS 1 los patógenos más detectados en orden de frecuencia, correlacionándose con otros estudios.^{3,7} Tanto los EV como los Herpesvirus son considerados los patógenos neurotrópicos de mayor importancia médica, diferenciar entre uno y otro es sumamente importante, ya que permite instaurar la terapia antiviral específica para los Herpesvirus y medidas de soporte en el caso de los EV.

Los cuadros de meningoencefalitis afectan principalmente a la población lactante, es por ello, que un diagnóstico oportuno garantizaría la vida de estos pacientes con sistema inmunológico tan débil. En segundo lugar, se encuentra el grupo de mayores de 15 años, que abarca la población joven activa y los pacientes de la tercera edad que al igual que los lactantes tienen su sistema inmunológico comprometido fisiológicamente.^{10,11,13}

Aun cuando la PCR teóricamente tiene una alta sensibilidad, solo se pudieron detectar patógenos aproximadamente en un cuarto de los LCR que llegaron al laboratorio para estos estudios; las causas pueden ser múltiples y combinadas, por ejemplo; la toma tardía de la muestra o el envío de la muestra a temperatura no controlada (en el caso de pacientes ambulatorios). Sin embargo, los resultados obtenidos permiten sustentar que la implementación de técnicas de diagnóstico molecular (como la PCR) en los laboratorio clínicos es factible y mejora el diagnóstico etiológico en el caso de las MA en nuestra comunidad, debido a la rapidez de entrega de resultados entre 24 a 48 horas.⁵

Este método puede tener un impacto beneficioso en el manejo terapéutico de los pacientes, pudiéndose evitar el uso indiscriminado de antibióticos en casos no necesarios, teniendo en cuenta que para algunos grupos virales (como los Herpesvirus) existen medicamentos específicos.

La utilización de las técnicas de Biología Molecular representan una alternativa de elección para los sistemas de salud, los médicos pueden hacer uso de esta herramienta de diagnóstico y los laboratorios clínicos pueden implementarla, perfeccionando el diagnóstico y aportando información valiosa para estudios epidemiológicos de las infecciones del SNC.

Referencias

1. Abarca K, Meningitis Viral, El niño Hospitalizado: Problemas Frecuentes. Universidad Católica de Chile; [09 de Abril de 2012]. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/pediatriaHosp/MeningitisViral.html>
2. Banfi A. Encephalitis: Which are and how to treat? Revista chilena de infectología. 2003;20 (Supl 1):S28-S33.
3. Zambrano Y, Chiarello A, Soca A, Villalobos I, Marrero M, Soler M, et al. Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de infecciones del Sistema Nervioso Central. Invest. Clin. 2006;47:337-347.
4. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: A search for entero-and herpesviruses in a prospective study. J Med Virol 1999;57:145-151.
5. Chesky M, Scalco R, Afilase L, Read S, Jobim LF. Polymerase Chain Reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. Arq Neuropsiquiatr 2000;58(3-B):836-842.
6. Sarmiento L, Mas P, Goyenechea A, Palomera R, Morier L, Capó V, et al. First epidemic of Echovirus 16 meningitis in Cuba. Emerg Infect Dis 2001;7:887-889.
7. Davies NWS, Brown LJ, Gonde J, Irish D, Robinson RO, Swan AV, Banatvala J, Howard RS, Sharief MK, Muir P. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005;76:82-87.
8. Jeffery KMJ, Banghan CRM. Recent advances in the laboratory diagnosis of central nervous system infections. Curr Opin Infect Dis 1996; 9:132-137.
9. Briese T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Zhiqianq L, Neil R, et al. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. Emerg Infect Dis 2005;11:310-313.
10. Dupuis M, Hull R, Wang H, Nattanmai S, Glasheen B, Fusco H, et al. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. J Med Virol. 2011;23:2172-81.
11. Costa I, Estudio Clínico Y Microbiológico De Las Meningitis En La Edad Pediátrica En El Hospital Clínico Universitario De Valencia [TESIS DOCTORAL] Hospital Clínico Universitario de Valencia. 2005.
12. Navarro JM, Pérez M, Anza D. Diagnóstico de laboratorio de las meningitis linfocitarias Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(Supl 1):56-61.
13. de Ory F, Avellón A, Echevarría JE, Sánchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. J Med Virol. 2013;85:554-62.