

Diagnóstico molecular de las infecciones neurológicas por herpes virus en pacientes de la ciudad de Medellín

Molecular diagnosis of neurological herpes virus infection in patients from Medellín

Diagnóstico molecular das infecções neurológicas por herpes virus em pacientes da cidade de Medellín

Olga Lucía Rincón Caballero¹, Beatriz Helena Aristizabal Bernal¹

RESUMEN

Objetivo: describir la frecuencia, y el comportamiento clínico y de laboratorio de las infecciones por citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV) y virus herpes simplex 1 y 2 (HSV 1 y HSV 2) en el sistema nervioso central tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes.

Metodología: se analizaron 204 líquidos cefalorraquídeos con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de su sigla en inglés) en tiempo real como herramienta diagnóstica molecular para la detección de infección.

Resultados: un 16% de los líquidos cefalorraquídeos es positivo para alguno de los virus estudiados, el EBV se detectó en el 22.8% de los casos positivos y se ubica por encima de las infecciones ocasionadas por HSV y CMV. El 61.9% de los pacientes con resultado positivo tenía algún tipo de inmunocompromiso.

Conclusiones: la utilización de la PCR en tiempo real permite establecer el agente causal de infección en el sistema nervioso central y es de gran ayuda en los pacientes inmunocomprometidos en los que las variaciones clínicas y de laboratorio no son concluyentes. Esto permitiría la implementación de una terapia específica.

Palabras clave: meningitis aséptica; encefalitis viral; citomegalovirus; infecciones por virus de Epstein-Barr; simplexvirus; reacción en cadena de la polimerasa; líquido cefalorraquídeo.

ABSTRACT

Objective: To describe the frequency and the clinical and laboratory characteristics of infections with cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr (EBV) and herpes simplex virus 1 and 2 (HSV 1 and HSV 2) in central nervous system in both immunocompetent and immunocompromised patients.

Methods: A total of 204 cerebrospinal fluid samples were tested for CMV, EBV or HSV 1 and 2 using real time PCR as a molecular diagnostic tool for detection of infection.

Results: Sixteen percent of cerebrospinal fluid was positive for at least one of the viruses, and Epstein Barr virus was detected in 22.8% of cases, which is above the infections caused by HSV and CMV. 61.9% of positive patients had some form of immune compromise.

1 Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia

Dirección de correspondencia: Olga Lucía Rincón Caballero. Correo electrónico: olincon@hptu.org.co

Fecha de recibido: 8 de junio de 2012

Fecha de aprobación: 26 de noviembre de 2012

Conclusions: The use of real-time PCR identifies the causative agent of infection in the central nervous system and is of great help in immunocompromised patients where clinical and laboratory variations are inconclusive; this will also help to implement a specific therapy.

Keywords: meningitis, aseptic; encephalitis, viral; cytomegalovirus; Epstein-Barr virus infections; simplexvirus; polymerase chain reaction; cerebrospinal fluid.

RESUMO

Objetivo: descrever a frequência, e o comportamento clínico e de laboratório das infecções por citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV) e vírus herpes simplex 1 e 2 (HSV 1 e HSV 2) no sistema nervoso central tanto em pacientes imunocomprometidos como imuno-competentes.

Metodologia: analisaram-se 204 líquidos cefalorraquídeos utilizando a reação em corrente da polimerase (PCR, de sua sigla em virilhas) em tempo real como ferramenta diagnóstica molecular para a detecção de infecção.

Resultados: um 16% dos líquidos cefalorraquídeos foram positivos para algum dos vírus estudados, o EBV se detectou no 22.8% dos casos positivos localizando-se acima das infecções ocasionadas por HSV e CMV. O 61.9% dos pacientes com resultado positivo tinha algum tipo de imuno-compromisso.

Conclusões: a utilização da PCR em tempo real permite estabelecer o agente causal de infecção no sistema nervoso central sendo de grande ajuda nos pacientes imunocomprometidos onde as variações clínicas e de laboratório não são concludentes e isto permitiria a implementação de uma terapia específica.

Palavras chave: meningite asséptica; encefalite viral; citomegalovirus; infecções por vírus Epstein-Barr; simplexvirus; reação em cadeia da polimerase; líquido cefalorraquídeo.

INTRODUCCIÓN

Las meningitis y encefalitis virales son las enfermedades neurológicas de origen infeccioso más importantes por su frecuencia de aparición, pues representan el 58% de todas las meningitis¹. Estas dos enfermedades son consideradas emergencias médicas que se presentan comúnmente con fiebre, cefalea, alteración del estado mental y, en casos graves, ocasionan la muerte². En un primer acercamiento diagnóstico se tienen en cuenta los resultados del líquido cefalorraquídeo (LCR), en el que se observa pleocitosis con predominio mononuclear, concentración de proteínas normal o levemente elevada, concentración de glucosa normal o ligeramente disminuida, y en los resultados de microbiología, el Gram y el cultivo no detectan gérmenes³. La incidencia de estas enfermedades en el mundo varía de acuerdo con el grupo de edad, el estado previo de salud

y el nivel socioeconómico, pero son las más frecuentes en todos los grupos etarios⁴. Pese a esto, en Colombia no se tienen datos de la incidencia de las meningitis o encefalitis virales ya que no son de notificación obligatoria a menos que se presenten como brotes⁵.

Entre los virus más importantes que infectan el sistema nervioso central (SNC), después de los enterovirus, están el Epstein Barr (EBV)⁶, citomegalovirus (CMV) (7, 8) y virus herpes simplex 1 y 2 (HSV1 y HSV2)⁹⁻¹¹ que pertenecen a la familia *Herpesviridae*, cuya característica biológica más importante es su capacidad para establecer latencia. Son virus con tropismo neurológico, ubicuos geográficamente y tienen alta prevalencia en la población mundial. En Estados Unidos se estiman de 26.000 a 42.000 hospitalizaciones cada año por esta causa. De allí la importancia de hacer un diagnóstico correcto y oportuno⁴.

La identificación viral convencional está dada por la utilización de cultivos celulares, pero esta metodología, que tiene alta especificidad, resulta de difícil incorporación como análisis diagnóstico de rutina porque requiere de una área física especializada que incrementa los costos y el tiempo para la obtención de los resultados sobrepasa los tres días y tiene una baja sensibilidad^{12,13}; ahora, con el advenimiento de las pruebas moleculares, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés) en tiempo real, se da un gran avance y se logra de forma específica (95%), sensible (87%) y oportuna (3 a 4 horas), identificar de manera cualitativa o cuantitativa el agente causal de las meningitis y encefalitis virales¹⁴.

El uso de herramientas moleculares para la identificación del patógeno viral, junto al análisis de las características clínicas, mejoran la capacidad para diagnosticar, permiten establecer un tratamiento específico con el propósito de evitar el uso inadecuado de antiviricos y antibióticos, y prevenir la presentación de diversos síndromes y complicaciones como la meningitis recurrente por HSV2, reactivación de infecciones por CMV en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes e, incluso, en el caso de aparición de tumores por EBV¹⁵. Se aumentan las probabilidades de recuperación del paciente y disminuyen los costos asociados con la atención e invalidez que puedan dejar como secuela estas infecciones. Además, se aportan datos epidemiológicos importantes porque se identifica el agente responsable de la enfermedad¹⁶.

Con el interés de dilucidar cuál es la dinámica de aparición de estas enfermedades y cuál es la frecuencia de presentación de EBV, CMV y HSV1 y 2 como agentes etiológicos de meningitis viral, se revisó de forma retrospectiva la experiencia con PCR en tiempo real en un hospital de cuarto nivel. Los resultados obtenidos de esta revisión permitirán establecer protocolos diagnósticos y fomentar la utilización de pruebas moleculares que ayuden en la correcta y oportuna identificación de las meningitis y encefalitis virales.

METODOLOGÍA

Pacientes y muestras: se hicieron pruebas a 204 pacientes, entre las que se mencionan: citoquímico, microbiología y PCR en tiempo real para la detección de CMV, EBV o HSV 1 y 2 en LCR, que consultaron durante mayo de 2005 a octubre de 2010 al laboratorio clínico del Hospital Pablo Tobón Uribe en Medellín, Colombia, que presta servicios de tercer y cuarto nivel, a población pediátrica y adulta. De estos 204, 131 pacientes tenían resultados de laboratorio y datos de historia clínica, los 73 pacientes restantes sólo tenían información del sexo y resultado de la PCR en tiempo real.

La extracción del ácido desoxiribonucleico (ADN) de los LCR fue realizada en las primeras horas (máximo 10 horas) posterior a la toma de la muestra por el método de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) y con las recomendaciones de manufacturación.

Las pruebas de PCR en tiempo real se hicieron en el equipo LightCycler 2.0.

Análisis e interpretación de los resultados de PCR: las muestras de ADN de los LCR fueron estudiadas para los virus solicitados por el médico. Una muestra de LCR pudo ser enviada para la detección de los cuatro virus incluidos en el estudio (HSV 1 y 2, CMV y EBV) o cualquiera de los virus del estudio. La detección del virus estudiado junto con la amplificación del control interno de la prueba, se consideró como un resultado positivo. La no detección del virus y un resultado positivo en el control interno de la prueba se asumió como negativo. Así, se clasificaron los pacientes como positivos o negativos para cada uno de los virus estudiados.

Recolección de los datos: del sistema de laboratorio se tomaron los datos de número de la historia clínica y resultados de laboratorio en LCR: citoquímico, cultivo para aerobios, hongos y micobacterias, actividad de la adenosin deaminasa (ADA), tinta china, coloración de Ziehl-Neelsen, VDRL y detección de CMV, EBV y HSV 1 y 2 por PCR en tiempo real. Con el número

de la historia clínica se realizó la búsqueda en la historia clínica electrónica de cada uno de los pacientes, se seleccionó el episodio o ingreso correspondiente a la fecha del examen de PCR y se escribió la información requerida por las variables de la base de datos creada: edad, sexo, estado inmunológico, síntomas, resultados de imágenes y presentación de secuelas o no al alta.

Análisis estadístico: para variables categóricas, el análisis fue expresado en tablas a manera de frecuencias absolutas y relativas. Para variables numéricas, en las que puede haber un gran número de valores y cuya distribución no fue normal, como en el caso de las variables; edad, glucosa y proteínas en LCR, recuento de glóbulos blancos, se optó por el uso de medidas de tendencia central como la mediana aritmética y rango, que permiten, junto con la combinación de otras variables, hacer un análisis más profundo del evento observado. Se usó el sistema estadístico SPSS® Statistics 13.0 (2004).

Aspectos éticos: el estudio contó con el aval institucional y del Comité de ética e investigación de la institución.

RESULTADOS

Frecuencia de las infecciones virales del SNC detectadas por PCR en tiempo real: para obtener la frecuencia de infección para cada uno de los virus incluidos en el estudio, se tuvieron en cuenta todos los LCR procesados en el laboratorio de Biología molecular del HPTU durante mayo de 2005 a octubre de 2010, para

un total de 204 muestras pertenecientes a 204 pacientes procesadas para uno o más de los virus incluidos en el estudio; EBV, CMV y HSV 1 y 2 (Tabla 1). Sólo el 25.5% de los LCR (52 muestras) fueron evaluados para los cuatro virus del estudio. En ninguno de los LCR evaluados se detectó más de un virus.

Características sociodemográficas y estado inmunológico de los pacientes: la información detallada de las historias clínicas y los resultados de laboratorio sólo estaban disponibles en 131 (64%) de 204 pacientes. En este grupo de 131 pacientes la edad promedio fue de 37 años (3 meses a 89 años), con una desviación típica de 22.5 años, y un 55% de pacientes correspondía al sexo masculino (72 individuos). El 69.5% inmunocompetentes y el resto de individuos presentaba algún tipo de inmunocompromiso.

De los 131 pacientes incluidos en el estudio, 21 fueron positivos por PCR en tiempo real para alguno de los virus estudiados. Aquí se ubicaron seis pacientes HIV, cuatro de transplante, dos con linfoma no Hodgkin y uno con lupus eritematoso sistémico. Lo que equivale a un 61.9% de pacientes afectados con alguna inmunosupresión de base y un 38.1% de inmunocompetentes a los que se les detectó infección viral neurológica. La tabla 2 muestra el estado inmunológico de los pacientes que tuvieron un resultado positivo para los virus estudiados por PCR.

Características clínicas de los pacientes estudiados: la frecuencia de los síntomas por los que se consultó al servicio hospitalario y que se relacionan con una infección del sistema

Tabla 1. Resultados de la PCR en tiempo real para HSV1, HSV2, CMV y EBV (n=204).

Prueba PCR	HSV 1	HSV 2	CMV	EBV
Positivos	5	2	8	18
Negativos	175	178	86	61
Total	180	180	94	79
Porcentaje de positivos	2.8	1.1	8.5	22.8

Tabla 2. Resultado de la PCR y estado inmunológico (n=21).

Estado inmunológico	PCR positiva para:			
	HSV 1	HSV 2	CMV	EBV
Inmunocompetente Nº de pacientes (%)	2 (9.5)	0	3 (14.3)	3 (14.3)
Inmunosuprimido Nº de pacientes (%)	0	1 (4.8)	1 (4.8)	11 (52.4)
Total pacientes	2	1	4	14

Tabla 3. Comparativo de los síntomas presentados según resultado viral por PCR.

Síntomas	Negativo por PCR para los virus estudiados 110 pacientes, %	Positivo por PCR para los virus estudiados 21 pacientes, %
Cefalea	59.1	61.9
Fiebre	33.6	33.3
Convulsiones	21.8	14.3
Vómito	21.8	4.8
Alteración del estado de conciencia	21.8	28.6
Défit focal	13.6	33.3
Dolor cráneo facial	1.8	0.0

nervioso central se especifican teniendo en cuenta el resultado de la prueba molecular (Tabla 3).

Resultados de laboratorio de los pacientes estudiados: con el número de la historia clínica y la fecha de ingreso del paciente se hizo la búsqueda en el sistema de laboratorio de los resultados de los exámenes, tanto en suero como en LCR. Estos datos se especifican para cada uno de los grupos de pacientes, clasificados como positivos y negativos para cada uno de los virus estudiados (Tabla 4).

Debido a que un LCR sea estudiado para varios virus, hace que un paciente negativo pueda estar ubicado en más de un grupo de negativos. Pero un paciente positivo sólo puede ubicarse en un grupo de positivos ya que no se detectaron pacientes con infección por más de un virus.

La prueba de adenosina deaminasa utilizada como marcador de inmunidad celular, se consideró como positiva en LCR, cuando sus resultados fueron mayores a 5 U/L.

Los cuatro cultivos de LCR positivos para aerobios correspondieron a un aislamiento de *Listeria monocytogenes*, uno de *Staphylococcus warneri*, uno de *Morganella morganii* y uno de *Cryptococcus neoformans*. Este último aislamiento está reportado dentro de los cultivos de aerobios porque en este paciente no se solicitó cultivo para hongos.

Los dos cultivos de LCR positivos para hongos correspondieron a dos aislamientos de *Cryptococcus neoformans*.

El único cultivo positivo para micobacterias correspondió a un *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla 4. Comparación de los resultados de laboratorio en los pacientes positivos y negativos por PCR en tiempo real para cada uno de los virus (n=131).

Resultados de laboratorio	HSV 1 y 2		CMV		EBV	
	n=3	n=108	n=4	n=73	n=14	n=54
	+	-	+	-	+	-
GB en LCR cel/mm3. Mediana (rango)	88 (1-160)	7 (0-1300)	7 (0-15)	8 (0-675)	20,5 (0-125)	13,5 (0-2950)
Glucosa en LCR mg/dL. Mediana (Rango)	61.0 (52-85)	58.5 (5-154)	63.5 (17-80)	56 (13-154)	46 (13-99)	57.5 (17-121)
Proteínas en LCR mg/dL. Mediana (Rango)	96 (19.4-305)	48,7 (0-824.1)	50,7 (29-174.7)	48 (0-393.7)	138,1 (48.4-824.1)	41,8 (16.6-506.2)
VDRL en suero +/analizados	1/2	0/62	0/3	1/52	0/10	0/40
Tinta china en LCR +/analizados	0/2	0/85	0/4	0/64	0/13	0/49
VDRL en LCR +/analizados	0/2	0/71	0/4	0/56	0/10	0/43
BK en LCR +/analizados	0/1	0/57	0/3	0/43	0/7	0/37
ADA en LCR. > 5 U/L +/analizados	1/1	10/28	1/2	10/32	5/11	4/19
Cultivo para aerobios en LCR. +/analizados	0/3	4/100	0/4	2/66	0/13	1/50
Cultivo para hongos en LCR. +/analizados	0/0	0/34	0/2	2/25	2/4	0/23
Cultivo para micobacterias en LCR. +/analizados	0/3	1/84	0/4	1/59	0/14	0/41

+: positivos; GB: glóbulos blancos; LCR: líquido cefalorraquídeo; BK: baciloscopia; ADA: adenosina deaminasa.

Conducta terapéutica: el cambio en la conducta terapéutica se muestra en la Tabla 5.

Estado neurológico al alta: En la Tabla 6 se expone el estado neurológico al alta categorizado como normal, con alteraciones neurológicas o muerte en los individuos con resultado negativo y positivo por PCR para cada uno de los virus estudiados.

En los tres pacientes con PCR positiva para HSV 1 y 2, se presentaron secuelas a pesar de iniciarse el uso de antivirales, pero ninguno falleció por esta causa.

En los pacientes negativos para HSV 1 y 2 que presentaron secuelas, encontramos un

paciente positivo para *M. tuberculosis*, uno para *Cryptococcus neoformans*, uno para CMV y seis para EBV. En los otros pacientes que presentaron secuelas, éstas pueden ser el resultado de otras enfermedades neurológicas como enfermedad desmielinizante, síndrome retroviral por el virus de la inmunodeficiencia humana, meningitis asépticas con etiología no clara, entre otras.

Al cruzar la información de los pacientes con PCR positiva para CMV, cambio en la conducta terapéutica y estado neurológico al alta, encontramos que en los dos pacientes que se inició tratamiento su estado neurológico al alta fue normal, mientras que, en los que no hubo cambio en la conducta terapéutica, se presentaron secuelas.

Tabla 5. Cambio en la conducta terapéutica según resultado de la PCR.

	HSV 1 y 2		CMV		EBV	
	+	-	+	-	+	-
	n=3	n=108	n=4	n=73	n=14	n=54
Cambio en la conducta terapéutica	Sí: 3 No: 0	Sí: 14 No: 94	Sí: 2 No: 2	Sí: 13 No: 60	Sí: 6 No: 8	Sí: 3 No: 51
Retirar medicamento	1	5	0	2	0	2
Adicionar medicamento	3	9 ^a	2	11 [§]	6	1*

^a De estos nueve pacientes negativos para HSV 1 y 2, cinco eran positivos para otros virus, tres positivos para *M. tuberculosis* y uno positivo para bacterias.

[§] De estos 11 pacientes negativos para CMV, tres eran positivos para *M. tuberculosis* y ocho para otros virus.

* En este paciente negativo para EBV, se adicionó medicamento porque fue positivo para CMV.

Tabla 6. Resultado de la PCR frente a estado neurológico al alta.

Estado neurológico al alta	HSV 1 y 2		CMV		EBV	
	Nº de pacientes (%)	Nº de pacientes (%)	Nº de pacientes (%)	Nº de pacientes (%)	Nº de pacientes (%)	Nº de pacientes (%)
	3	108	4	73	14	54
	+	-	+	-	+	-
Normal	0	64 (59.3)	2 (50)	45 (61.6)	7 (50)	40 (74.1)
Alteraciones neurológicas	3 (100)	36 (33.3)	2(50)	22 (20.4)	7 (50)	12 (22.2)
Fallecido	0	7 (6.5)	0	5 (4.6)	0	2 (3.7)
Sin dato	0	1 (0.9)	0	1 (1.4)	0	0

Tabla 7. Alteraciones neurológicas al alta presentadas según el virus detectado por PCR.

Virus (Nº de pacientes)	Alteraciones neurológicas al alta
HSV 1 ²	Síndrome convulsivo, parafasias, anomia, hipoexpontaneidad verbal, hipoprosexia marcada.
HSV 2 ¹	Movimientos de sacudidas de extremidades de mediana amplitud.
CMV ²	Distonía facial, parálisis facial periférica.
EBV ⁷	Parálisis del sexto par, parálisis facial periférica, movimientos involuntarios no convulsivos, no obedece a órdenes, "bobbing" ocular, desviación tónica de la mirada, marcha mínimamente tambaleante, alteración en el patrón de la marcha.

De los seis pacientes positivos para EBV y en los que se dio un cambio en la conducta terapéutica, tres fueron dados de alta con un estado neurológico normal, de éstos uno presentó un tumor en SNC. De los tres pacientes que presentaron secuelas, uno fue positivo

para *Cryptococcus neoformans* y otro para *Toxoplasma gondii*, y los tres eran pacientes inmunosuprimidos. De los ocho pacientes positivos para EBV y en los que no hubo cambio en la conducta terapéutica cuatro presentaron secuelas.

Las alteraciones neurológicas al alta presentadas en los pacientes con PCR positiva se describen en la Tabla 7.

Al cruzar la información correspondiente a: cambio en la conducta terapéutica y la presentación de secuelas, encontramos que el 66.67% de los pacientes positivos para alguno de los virus estudiados, en los que no se hizo ningún cambio en la conducta terapéutica, presentó alguna secuela o déficit. Y el 41.7% (5 individuos) en los que se hizo cambio en la conducta terapéutica presentó alguna secuela, éstos correspondieron a dos pacientes por infección por EBV, dos por HSV 1 y uno por HSV 2.

DISCUSIÓN

Las infecciones del sistema nervioso central reconocidas como meningitis, encefalitis o meningoencefalitis son verdaderos retos médicos debido a la urgencia de establecer el agente causal de infección (virus, parásitos, bacterias, hongos) para tomar una conducta terapéutica adecuada y prevenir la presentación de secuelas y, en casos específicos, disminuir el riesgo de muerte.

En este estudio encontramos que la sospecha clínica de infección viral del SNC se presentó en todas las edades con un rango similar al hallado en el estudio realizado por Davies *et al.*, entre abril de 1996 y mayo de 2000, en el que se analizaron 735 pacientes con un rango de edad de recién nacido hasta los 89 años. Igualmente, no hubo predominio en una edad determinada y el 55% de individuos afectados estaba conformado por hombres¹⁷, igual porcentaje al encontrado en este estudio. Ahora bien, si analizamos los rangos de edades de los individuos infectados por cada uno de los virus del estudio, se evidencia que las infecciones por EBV y HSV 2 estuvieron limitadas a pacientes adultos (26 a 72 años y 68 años, respectivamente), mientras que las infecciones por CMV y HSV 1 incluían tanto niños como personas adultas.

Las infecciones neurológicas virales confirmadas por PCR en este estudio, se presentaron en un 38.1% de pacientes inmunocompetentes. A diferencia de lo descrito por García-Moncó, donde se dice que la encefalitis por CMV es más frecuente en individuos inmunocomprometidos, especialmente VIH¹⁸. En este estudio, de los cuatro pacientes positivos para CMV sólo un paciente tenía dicho inmunocompromiso y los tres pacientes restantes eran aparentemente inmunocompetentes (75%). Dos de los pacientes inmunocompetentes, no recibieron tratamiento y al egreso hospitalario se reportaron alteraciones neurológicas. Rafailidis *et al.*, en el 2008, hacen una revisión de las complicaciones por CMV que se presentan en individuos inmunocompetentes, donde se incluye la infección del SNC como la segunda más frecuente manifestación de infección en estos pacientes¹⁹. Sin embargo, se encuentran pocos estudios actuales que hagan referencia a estos hallazgos y, en consecuencia, se hace necesaria la realización de más estudios que involucren un mayor número de pacientes inmunocompetentes con infección por CMV en SNC para lograr datos concluyentes y promover la homogenización de los tratamientos de soporte y el uso de antivirales que ofrezcan una verdadera alternativa de mejora.

DeBiasi *et al.*, estudiaron la apoptosis como un mecanismo de respuesta celular inducida por HSV y CMV, implicados en el daño y muerte neuronal; en su trabajo, DeBiasi demostró, en las biopsias de tejido del sistema nervioso de pacientes inmunocompetentes, la inducción de apoptosis por estos virus, y propone el estudio de nuevas estrategias terapéuticas que disminuyan o bloqueen el daño ocasionado por los mismos²⁰. Por su parte, en el presente estudio, se presentó algún tipo de secuela neurológica en los tres pacientes con neuroinfección por HSV a pesar de iniciarse el uso de antivirales. Esto hace pensar que la terapia antiviral presenta limitantes y debe trabajarse en la búsqueda de tratamientos que ofrezcan mayor efectividad.

El EBV está implicado en el desarrollo de una gran variedad de enfermedades benignas y malignas. Okano describió la susceptibilidad a la infección por EBV en individuos con

enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple o lupus eritematoso sistémico, pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y pacientes trasplantados²¹, así mismo, en el presente estudio se observó que el 78,6% de las infecciones en SNC por EBV se da en estos pacientes, uno de ellos con lupus eritematoso sistémico. Por otro lado, se reportaron alteraciones neurológicas al alta en siete pacientes positivos para EBV, incluidos tres pacientes que recibieron tratamiento.

En este estudio se encontró que de los 21 pacientes positivos por PCR en tiempo real para los virus estudiados, el 57% (12 pacientes) presentó algún déficit neurológico al alta, a pesar de que en seis de ellos (dos positivos para HSV1, uno para HSV2 y tres para EBV) se inició tratamiento después del diagnóstico molecular. Esto puede explicarse por lo agresivo de los HVS, y en el caso de los EBV por no disponer con medicamentos específicos para la infección por este virus.

De las 204 muestras de LCR analizadas para uno o más de los virus estudiados, se encontraron 33 positivas que corresponden al 16,2%, comparado con el 12% reportado en el estudio de Luiz Fernando Jobim *et al.*, en el que trabajaron con una PCR para detectar 17 microorganismos infecciosos en 383 LCR, y obtuvieron una prevalencia de 11 EBV, ocho CMV, siete HSV y un caso para enterovirus²². En el presente estudio no se hizo la detección de enterovirus que, según García-Moncó, son los mayores agentes de encefalitis aséptica y que sólo se identifican en un 10-20% de los casos¹⁸, pero se obtuvo el mismo orden de frecuencia de los virus anteriormente mencionados, además, el número de pruebas positivas para EBV fue más alto en un tamaño de muestra más pequeño, lo que hace sospechar que estamos frente a un escenario epidemiológico que requiere un análisis completo para la correcta identificación de los agentes causales de las neuroinfecciones virales^{3,23}. Es de anotar que Davies *et al.*, en 787 muestras analizadas también obtuvieron una frecuencia más alta por EBV seguida por la infección causada por enterovirus.

Bulakbasi & Kocaoglu, refirieron que del 10 al 20% de las encefalitis virales están dadas por HSV 1 y 2²⁴, porcentaje superior al observado en este estudio donde la sumatoria de las frecuencias de las encefalitis causadas por estos virus en 180 muestras analizadas corresponde a un 3,9%, lo que revela un comportamiento diferente a lo reportado también en otros estudios como en el de Read *et al.*, donde los agentes principales de encefalitis viral, después del los enterovirus, son los HSV²⁵.

A diferencia de los estudios de Davies *et al.*, y Quereda *et al.*, en los que se obtuvieron resultados positivos en LCR por PCR para más de un virus en la misma muestra^{14,17}, en este estudio no se detectó ningún paciente con una infección múltiple. Se debe tener en cuenta que en los estudios de Davies *et al.*, y Quereda *et al.*, se utilizó una PCR múltiple, que permite hacer una detección simultánea de varios microorganismos, mientras que la detección de los cuatro virus en este estudio no se les realizó a todas las muestras, por tal motivo existe la posibilidad de que alguna muestra presente más de un virus y no sea detectada. Para una mejor cobertura en la detección de neuroinfección por PCR, se deben utilizar PCR múltiples que incluyan diferentes microorganismos, además resulta útil diseñar y aplicar algoritmos¹⁷ para el estudio de muestras sospechosas.

En este estudio, entre los síntomas presentados por los pacientes con sospecha de neuroinfección viral, resultan ser más frecuentes la cefalea, la fiebre, la alteración en el estado de conciencia y el déficit focal, pero el bajo número de pacientes positivos no admite establecer diferencias específicas entre los agentes causales. Esta problemática para el establecimiento de un diagnóstico del agente infeccioso que permita escoger la terapia y cuidados convenientes para el paciente, exige cada vez más que se haga uso de herramientas diagnósticas moleculares de amplia cobertura, sensibles, específicas y rápidas, que detecten el agente etiológico viral y orienten al clínico en su decisión^{22,25-27}. A su vez, en los pacientes inmunosuprimidos con PCR positiva para virus, se observó que la

sintomatología fue leve, lo que podría sugerir que en este tipo de pacientes se amerite el uso de pruebas moleculares que permitan definir la existencia o no de infección viral.

Las concentraciones de glucosa y proteínas, en los LCR positivos para virus detectados en este estudio, a excepción de los LCR donde coexistía una infección por bacterias, hongos o micobacterias, mostraron valores propios de infección viral, datos similares a los observados en los estudios de Pinto Junior *et al*, y Laura Patricia Mendoza *et al*.^{26,28}. La pleocitosis en los LCR positivos para virus se observó en un 66.7% y el predominio ($\geq 80\%$) de los linfocitos en un 87.5%, porcentajes superiores a los encontrados en los dos estudios antes mencionados. Así mismo, un 53.6% de los LCR negativos para virus mostró pleocitosis, con leves variaciones de los valores normales para glucosa y proteínas. Los resultados del citoquímico de LCR en conjunto con otras pruebas de laboratorio, siguen siendo utilizados y son válidos para encaminar el diagnóstico de neuroinfección, pero no son determinantes en todos los pacientes, por lo que se requiere de la utilización de pruebas moleculares como la PCR en tiempo real para una identificación sensible, específica y oportuna del patógeno directamente involucrado²⁹.

La adenosin deaminasa (ADA) es una enzima relacionada con la proliferación y diferenciación de los linfocitos, por ello se encuentra elevada en procesos infecciosos mediados por una respuesta inmune celular^{30,31}. Los resultados del ADA de este estudio mostraron valores considerados como positivos (> 5 U/L) tanto en el grupo de pacientes positivos como negativos por PCR para virus. Se considera en el primer grupo como una evidencia más de una respuesta inmune celular a una infección viral. Sólo a uno de los pacientes negativos para virus por PCR y con un ADA de 26.7 U/L, se le confirmó por cultivo y PCR la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. Ello reafirma que dicho valor no es exclusivo de tuberculosis y que se debe profundizar en la identificación del agente causal de la infección.

Otros resultados de laboratorio en LCR, analizados en este estudio, como VDRL, tinta china y coloración de Ziehl-Neelsen, por su bajo número, no permitieron sacar conclusiones. Con respecto al resultado de los cultivos microbiológicos se encontraron dos pacientes a los que se les aisló *Cryptococcus neoformans*, estos pacientes eran positivos para VIH y tenían infección neurológica por EBV. Situación que refuerza la necesidad de estudios completos en inmunosuprimidos, población que incrementa día a día.

Vale la pena anotar que aunque en el estudio de Saddawi y Crawford, se muestra una relación entre la seropositividad para EBV, CMV y HSV 1 y 2, y la presencia de tumores en SNC, comparada con pacientes control que no presentaban tumores en cerebro³², en este estudio de los 21 pacientes positivos por PCR, sólo uno, positivo para EBV, reportó la presencia de tumor en SNC, lo que amerita mayores estudios para hacer un correcto análisis epidemiológico.

Conforme a las guías de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas³³ y *EFNS Task Force*, grupo de estudio europeo¹⁸, los resultados hallados en esta investigación refuerzan la utilidad de la PCR en tiempo real como herramienta diagnóstica para la detección de infección del SNC causada por CMV, EBV y HSV 1 y 2 en muestras de LCR.

Se debe tener en cuenta que este estudio fue realizado en pacientes atendidos en un hospital de tercer y cuarto nivel de complejidad, por lo que los resultados pueden mostrar características particulares de la población allí atendida; sin embargo, se debe tener en cuenta que los pacientes inmunosuprimidos fueron los más afectados, y esta es una población creciente, cada vez tendremos más pacientes con infección por VIH y trasplantados. De allí que sea menester conocer la epidemiología de las infecciones neurológicas a las que están expuestos.

Por el alto costo que significa la aplicación de estas pruebas se deben hacer estudios

comparativos frente a tecnologías que se adapten a nuestras necesidades y posibilidades, como la amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP, por su sigla del inglés) que permite la detección de diferentes microorganismos con alta sensibilidad y especificidad a partir de muestras biológicas³⁴. Se hace necesario establecer protocolos y guías diagnósticas moleculares para esclarecer el agente infeccioso y realizar el seguimiento estricto de los pacientes con infección del SNC para garantizar la intervención adecuada y oportuna de cada uno de los pacientes.

El uso de las diferentes herramientas moleculares como pruebas diagnósticas y la notificación obligatoria de dicha información permitirá la elaboración de registros públicos para conocer la epidemiología de las neuroinfecciones virales en nuestro medio.

APORTES DE CADA UNO DE LOS AUTORES

Olga Lucía Rincón C. Revisión de historias clínicas, realización de extracción de ácidos nucleicos y PCR, análisis de datos, escritura del artículo. Beatriz Helena Aristizabal B, análisis de datos, escritura del artículo.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses que puedan influir en la validez de la investigación.

FINANCIACIÓN

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Hospital Pablo Tobón Uribe de la ciudad de Medellín, Antioquia (Colombia).

REFERENCIAS

1. Freire MC, Cisterna DM, Rivero K, Palacios GF, Casas I, Tenorio A, *et al.* Analysis of an outbreak of viral meningitis in the province of Tucuman, Argentina. *Rev Panam Salud Publica.* 2003 Jul;14(1):24.
2. Debiasi R, Tyler K. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct;17(4):903-25.
3. Irani D. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol Clin.* 2008 Aug;26(3):635-55, vii-viii.
4. Davis L, Tyler K. Molecular diagnosis of CNS viral infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Jan;76(1):10.
5. Morales Bedoya A, Alonso Palacio LM. Epidemiología de la meningitis. *Salud Uninorte.* 2006;22(2):105-20.
6. Doja A, Bitnun A, Ford Jones E, Richardson S, Tellier R, Petric M, *et al.* Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neurol.* 2006 May;21(5):384-91.
7. Weber B, Berger A, Rabenau H. Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant antigens for cytomegalovirus antibody detection. *J Virol Methods.* 2001 Aug;96(2):157-70.
8. Busse C, Strubel A, Schnitzler P. Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies. *J Clin Virol.* 2008 Oct;43(2):137-41.
9. Kimura H, Ihira M, Enomoto Y, Kawada J, Ito Y, Morishima T, *et al.* Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. *Med Microbiol Immunol.* 2005 Aug;194(4):181-5.
10. Sauerbrei A, Wutzler P. Novel recombinant ELISA assays for determination of type-specific IgG antibodies against HSV-1 and HSV-2. *J Virol Methods.* 2007 Sep;144(1-2):138-42.
11. Bowles R, Yedowitz J, Blaho J. Reconsideration of viral protein immunoblotting for differentiation of human herpes simplex viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Oct;62(2):167-76.
12. Soler-CH M, Vergara-F R, Silva-V M, Collao-F X, Navarrete-B E. Detección de enterovirus mediante transcripción reversa y reacción de polimerasa en cadena en líquido cefalorraquídeo de niños con meningitis aséptica. *Rev Chil Infectol.* 2001;18(3):175-181.
13. Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Dec;123(12):1161-9.

14. Quereda C, Corral I, Laguna F, Valencia M, Tenorio A, Echeverria J, *et al*. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol*. 2000 Aug;38(8):3061-7.
15. Glaser C, Gilliam S, Schnurr D, Forghani B, Honarmand S, Khetsuriani N, *et al*. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar;36(6):731-42.
16. Pérez-Ruiz M, Vicente D, Navarro-Marí J. [Autochthonous acute viral and bacterial infections of the central nervous system (meningitis and encephalitis)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 Jul;26 Suppl 9:8-14.
17. Davies NW, Brown LJ, Gonde J, Irish D, Robinson RO, Swan AV, *et al*. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Jan;76(1):82-7.
18. García Moncó JC. Encefalitis agudas. *Neurología*. 2010;25:11-7.
19. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology*. 2008;5:47
20. DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Richardson-Burns S, Tyler KL. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis*. 2002 Dec;186(11):1547-57.
21. Okano M. Epstein-Barr virus in patients with immunodeficiency disorders. *Biomed Pharmacother*. 2001;55: 353-61.
22. Chesky M, Scalco R, Failace L, Read S, Jobim LF. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000 Sep;58(3B):836-42
23. Chadwick DR. Viral meningitis. *Br Med Bull*. 2006 Feb 10;75-76:1-14.
24. Bulakbasi N, Kocaoglu M. Central nervous system infections of herpesvirus family. *Neuroimaging Clin N Am*. 2008 Feb;18(1):53-84; viii.
25. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol*. 1997 Mar;35(3):691-6.
26. Mendoza LP, Bronzoni RV, Takayanagui OM, Aquino VH, Figueiredo LT. Viral infections of the central nervous system in Brazil. *J Infect*. 2007 Jun;54(6):589-96.
27. Big C, Reineck LA, Aronoff DM. Viral infections of the central nervous system: a case-based review. *Clin Med Res*. 2009 Dec;7(4):142-6.
28. Pinto Junior VL, Rebelo MC, Costa EV, Silva EE, Bóia MN. Description of a widespread outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in Rio de Janeiro state, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2009 Oct;13(5):367-70.
29. DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Weinberg A, Tyler KL. Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol*. 2002 Jul;25 Suppl 1:S5-11.
30. Kashyap RS, Kainthla RP, Mudaliar AV, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity: a complimentary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2006;3:5.
31. Moghtaderi A, Niazi A, Alavi-Naini R, Yaghoobi S, Narouie B. Comparative analysis of cerebrospinal fluid adenosine deaminase in tuberculous and non-tuberculous meningitis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010 Jul;112(6):459-62.
32. Saddawi-Konefka R, Crawford JR. Chronic viral infection and primary central nervous system malignancy. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010 Sep;5(3):387-403.
33. Tunkel A, Glaser C, Bloch K, Sejvar J, Marra C, Roos K, *et al*. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008 Aug;47(3):303-27.
34. Rincón Caballero OL, Aristizábal Bernal BH. Utilidad diagnóstica de la amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP) para la detección de ADN de citomegalovirus, Epstein Barr y herpes simple 1 y 2 en muestras biológicas: revisión sistemática. *Hechos Microbiológicos*. 2010;1(1):41-8.