

Diagnóstico rápido de la meningoencefalitis herpética mediante PCR

Carmen Muñoz-Almagro, Araceli González-Cuevas, Francisco José Cambra^a, Teresa Juncosa, Aurea Mira y Cristina Latorre

Servicios de Microbiología y ^aPediatría. Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat. Barcelona. España.

OBJETIVO. Evaluar la utilidad de un método de PCR rápido y sencillo aplicado al diagnóstico de la meningoencefalitis herpética en la población pediátrica.

PACIENTES Y MÉTODO. Se procesaron 123 muestras de líquido cefalorraquídeo de 114 pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona con sospecha clínica de meningoencefalitis vírica o interés en descartar la etiología herpética. Se utilizó como técnica diagnóstica la amplificación por PCR de una región altamente conservada del gen ADN polimerasa común a herpes 1 y 2, además de los métodos clásicos. En todos los pacientes se instauró tratamiento en el momento del ingreso con aciclovir en espera de los resultados de la PCR. Si el resultado era negativo, tras una adecuada reevaluación clínica se consideraba la retirada del tratamiento con aciclovir; si era positivo se continuaba el tratamiento durante 20 días.

RESULTADOS. El ADN de herpes simple se detectó en 4 pacientes. La evolución clínica de los enfermos confirmó los resultados de la PCR en todos los casos, tanto en los negativos como en los positivos. La entrega de los resultados de PCR se realizó en un rango de tiempo de 6,30 a 72 h (media, 18 h).

CONCLUSIÓN. La aplicación de esta técnica de PCR, con un formato sencillo y rápido, adecuado a la rutina diaria de un laboratorio de microbiología contribuye a realizar un diagnóstico precoz o, en su defecto, exclusión de la etiología por herpes simple de la meningoencefalitis.

Palabras clave: PCR. Meningoencefalitis. Herpes simple. Pediatría.

Rapid diagnosis of herpetic meningoencephalitis by PCR

OBJECTIVE. To evaluate the usefulness of a rapid and simple PCR method in the diagnosis of herpetic meningoencephalitis in a pediatric population.

PATIENTS AND METHODS. One hundred twenty-three cerebrospinal fluid samples from 114 pediatric patients attending the Hospital Sant Joan de Déu in Barcelona for

clinical suspicion of viral meningoencephalitis or to rule out a possible herpetic etiology were evaluated. In addition to classical methods, the diagnostic technique used was PCR amplification of a highly preserved region of the DNA polymerase gene common to herpes virus 1 and 2. All patients were administered acyclovir on admission and until the results of PCR were known. If the result was negative, withdrawal of acyclovir was considered after clinical reexamination. If the result was positive, the therapy was continued for 20 days.

RESULTS. *Herpes simplex* DNA was detected in four patients. In all patients, clinical outcome confirmed the results of PCR, whether positive or negative. PCR results were available within 6.30 and 72 hours (mean: 18 hours).

CONCLUSION. This simple and rapid PCR technique can be applied in the daily routine of the microbiology laboratory. It allows early diagnosis of herpetic meningocephalitis or, when lacking, exclusion of *Herpes simplex* etiology.

Key words: PCR. Meningoencephalitis. Herpes simplex. Pediatrics.

Introducción

La meningoencefalitis herpética es una enfermedad poco frecuente en nuestro medio pero con una elevada morbimortalidad¹. Debido a su gravedad y al beneficio que puede obtenerse mediante un tratamiento temprano, ante la sospecha clínica de esta enfermedad se recomienda iniciar el tratamiento precoz con aciclovir. Esta medida es cara y no está exenta de efectos secundarios, por lo que es de gran interés disponer de una técnica de diagnóstico rápida, sensible y específica que ayude al clínico en la toma de decisiones según el resultado.

En el presente estudio evaluamos la utilidad de un método de PCR rápido y sencillo aplicado al diagnóstico de la meningoencefalitis herpética en la población pediátrica.

Pacientes y método

Durante el período de estudio, comprendido entre el 1 de marzo de 1996 y el 31 de abril de 2000 se procesaron 123 muestras de líquido cefalorraquídeo de 114 pacientes pediátricos, que fueron todos los atendidos en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona por sospecha clínica de meningoencefalitis vírica o interés en descartar la etiología herpética. En este hospital existe una unidad de microbiología molecular que aplica la tecnología PCR en más de 4.000 muestras al año por diferentes enfermedades (principalmente infección por el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH]). En los 114 pacientes se instauró tratamiento en el momento del ingreso con 20 mg/kg cada

Correspondencia: Dra. C. Muñoz-Almagro.
Servicio de Microbiología. Hospital Sant Joan de Déu.
P.^o Sant Joan de Déu, 2. 08950 Esplugues de Llobregat. Barcelona.
Correo electrónico: cma@hsjdbcn.org

Manuscrito recibido el 15-06-2001; aceptado el 5-09-2001.

8 h por vía intravenosa de aciclovir en espera de los resultados de la PCR y de la evolución clínica.

El diagnóstico de los pacientes se basaba en datos clínicos, características del líquido cefalorraquídeo (LCR) y del electroencefalograma, estudios de neuroimagen y estudio microbiológico mediante PCR herpes virus 1 y 2.

Si el resultado de la PCR era negativo, se consideraba la retirada del tratamiento con aciclovir tras efectuar una reevaluación clínica por pediatras intensivistas, que valoraban la evolución clínica de estas primeras horas del paciente, el resultado negativo de la PCR y los resultados del resto de las pruebas realizadas. En los pacientes positivos se continuaba el tratamiento durante 20 días.

Técnica de PCR

Transporte y conservación de las muestras

Las muestras de LCR se procesaron inmediatamente después de la extracción o se conservaron a 4 °C durante un máximo de 3 días.

Extracción y amplificación del ADN

Se añadieron 50 µl de LCR a 150 µl de una solución de resina Chelex 100 al 20% (ADN extracción Reagent® Laboratorios Perkin Elmer).

Los ADN extraídos fueron amplificados según el método descrito por Kessler et al², seleccionando los *primers* marcados con digoxigenina 5' -ATCACCGACCCGGAGAGGGAAC y 5'-GGGCCAGGCGCTTGGTGTA que amplifican un producto de 91 pares de bases de una región altamente conservada del gen ADN polimerasa común a herpes 1 y 2.

Se añadieron 20 µl del extracto de ADN a 80 µl de mezcla maestra (PCR ELISA DIG labeling R, Boehringer Mannheim) que contenía 10 mmol/l de Tris-HCL (pH 8,3), 50 mmol/l de KCL, 1,5 mmol/l de MgCl₂, 0,2 mmol/l de dATP, 0,2 mmol/l de dCTP, 0,2 mmol/l de dGTP, 0,19 mmol/l de dTTP y 0,01 mmol/l de DIG-dUTP, 0,5 µmol/l de cada *primer* y una unidad de Taq polimerasa. La amplificación consistió en 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, anillamiento de los *primers* a 50 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 15 s. El ciclo final incluía una extensión a 72° durante 7 min.

Detección por hibridación colorimétrica

Se utilizó el equipo de PCR ELISA DIG detection®, Boehringer Mannheim, empleando la sonda biotinilada: 5'-GAGTTTGCTCCTCACCGCCGAACGTGAGCAG. Se consideró como resultado positivo absorbancias superiores a 0,500 OD, negativo absorbancias inferiores a 0,200 OD y resultado indeterminado absorbancias entre 0,200 y 0,500 OD.

Controles positivos y negativos

En cada serie se incluyó un control negativo (50 µl de suero fisiológico) y un control positivo. Para el control positivo se procesaron 50 µl de una solución cuantificada de un cultivo positivo para virus herpes simple [VHS]-1 (TCDD/50/0,1 ml = 21).

Duración de la técnica

La extracción duró 25 min, la amplificación 90 min y la detección 180 min.

Resultados

El ADN del herpes simple se detectó en cuatro de los 114 pacientes estudiados. En los 4 casos el resultado se confirmó con una segunda muestra. En los 110 pacientes restantes todas las muestras procesadas resultaron negativas. La evolución clínica de los enfermos confirmó los resultados de la PCR en todos los casos, tanto en los que se excluyó la etiología por herpes simple como en los

cuatro positivos. La entrega de los resultados de PCR se realizó en un rango de tiempo de 6,30 h a 72 h (media, 18 horas).

Discusión

Numerosos estudios avalan la utilidad de la PCR para el diagnóstico de la meningoencefalitis herpética, la cual es considerada como técnica de referencia por su sensibilidad y especificidad³⁻⁵. En este estudio retrospectivo hemos utilizado una técnica de PCR que ha contribuido a descartar la etiología por herpes simple en 110 pacientes a las pocas horas del ingreso. El diagnóstico precoz de los 4 niños con encefalitis herpética fue de evidente utilidad para el pediatra. Es de destacar que esta información precoz ha contribuido a racionalizar el uso de aciclovir completando el tratamiento sólo los pacientes en los que se confirmó la etiología herpética de la encefalitis, con lo que se evitaron los efectos secundarios inherentes al tratamiento con aciclovir en los enfermos con encefalitis no herpética y se contuvo el coste económico. El coste del tratamiento intravenoso con aciclovir es elevado; así, para un paciente de 30 kg, una dosis de aciclovir cuesta 19 euros, un día de tratamiento 57 euros y el tratamiento completo durante 20 días 1.141 euros, sin considerar gastos indirectos de personal de enfermería (administración del fármaco) o del control analítico del tratamiento. El coste de nuestra PCR, procesándose al momento o con la menor demora posible e incluyendo 2 controles por muestra, fue de 50 euros. Indudablemente, esta estrategia de retirada del tratamiento con aciclovir se debe realizar con prudencia, tras la adecuada evaluación por pediatras que valoran en conjunto la evolución clínica y los resultados de todas las pruebas realizadas. No hay que olvidar que esta PCR es una técnica muy sensible pero con sus lógicas limitaciones. Se han descrito en la bibliografía casos de falsos negativos^{6,7}, en especial por la presencia de posibles inhibidores. La detección de inhibidores en la mezcla de reacción podría realizarse utilizando controles internos de la amplificación, lo que aumentaría la seguridad del resultado de la técnica.

Debido a que la tecnología de PCR es muy similar para la mayoría de los agentes infecciosos, la incorporación de esta técnica para el diagnóstico de enfermedades menos frecuentes, como la encefalitis herpética, no implicó globalmente una mayor carga asistencial en la unidad de PCR de nuestro hospital. En general, la tecnología de PCR es relativamente rápida, pero existen variaciones importantes en la duración de la técnica según el método de extracción escogido y el sistema de detección del producto amplificado. El protocolo que hemos aplicado destaca por su sencillez y rapidez, la extracción con Chelex 100, con una duración de tan sólo 25 min y mínima manipulación. Resulta interesante porque reduce la posibilidad de falsos positivos, ya que la contaminación en este tipo de técnicas se relaciona con el número de veces y el tiempo en que se manipula la muestra⁸. Se seleccionó para la amplificación una secuencia del gen de la ADN polimerasa común a herpes simple 1 y 2 debido a que los dos virus pueden ser causa de encefalitis herpética, siendo similar el manejo clinicoterapéutico, y porque existe abundante información sobre la sensibilidad y

especificidad de la amplificación de esta zona del genoma del virus del herpes simple². Respecto al sistema de detección elegido, es de destacar el incremento de sensibilidad que ofrece la hibridación del material amplificado⁹ con sondas específicas y la lectura objetiva de los resultados. En nuestra serie, todos los resultados positivos presentaban absorbancias superiores a 2 OD y los negativos inferiores a 0,150 OD sin que se encontraran resultados indeterminados.

En resumen, la aplicación de esta técnica de PCR, con un formato sencillo y rápido, adecuado a la rutina diaria de un laboratorio de microbiología, contribuye a realizar un diagnóstico precoz o, en su defecto, la exclusión de la etiología por herpes simple de la meningoencefalitis, incrementando la calidad de la asistencia a estos pacientes.

Bibliografía

1. Witley RJ. Viral encephalitis. *N Engl J Med* 1990;323:242-50.
2. Kessler HH, Pierer K, Weber B, Sakrauski A, Santner B, Stuenzner D, et al. Detection of herpes simplex virus DNA from cerebrospinal fluid by PCR and a rapid, nonradiative hybridization technique. *J Clin Microbiol* 1994;32:1881-6.
3. Tang YW, Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Persing DH. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1999;37:2127-36.
4. Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Toal DR, Rys PN, Barbari EF, et al. Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 1997;35:2873-7.
5. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35:691-6.
6. Geffner D, Lago A, Moreno R, Pardo F. Negative polymerase chain reaction in 2 cases of herpetic encephalitis. *Med Clin (Barc)* 1995;105:155.
7. Atkins JT. HSV PCR for CNS infections: pearls and pitfalls. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:823-4.
8. Kwok S. Avoiding false positive with PCR. *Nature (London)* 1989;339:237-8.
9. Linde A, Klapper PE, Monteny P, Echevarria JM, Cinque P, Rozenberg F, et al. Specific diagnostic methods for herpesvirus infections of the central nervous system: a consensus review by the european union concerted action on virus meningitis and encephalitis. *Clin Diag Virol* 1997;8:17-29.