

# Infecciones agudas del sistema nervioso central (meningitis y encefalitis) virales y bacterianas de origen autóctono

Mercedes Pérez-Ruiz<sup>a</sup>, Diego Vicente<sup>b</sup> y José María Navarro-Marí<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. Centro de Referencia de Meningitis y Encefalitis Viricas de CCAA Andalucía. España.

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. Guipúzcoa. CIBER Enfermedad Respiratoria (CIBERES) y Centro de Referencia de Enfermedad Meningocócica del País Vasco. España.

**El diagnóstico rápido de las infecciones agudas del sistema nervioso central (meningitis y encefalitis), tanto virales como bacterianas, tiene gran trascendencia en el tratamiento clínico del paciente, lo cual ayuda a plantear de forma temprana tratamientos que pueden resolver situaciones con afectación vital, evitar tratamientos empíricos innecesarios, disminuir la estancia hospitalaria y facilitar las actuaciones pertinentes en el ámbito de la salud pública.**

**Las técnicas moleculares, sobre todo la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, se han convertido en nuestro medio en el procedimiento diagnóstico más rápido y sensible en el caso de meningitis y encefalitis virales autóctonas, y cada día tienen más protagonismo en el diagnóstico y el control de las meningitis bacterianas agudas más frecuentes.**

**La automatización y la utilización de sistemas cerrados pueden facilitar la generalización del uso de las técnicas moleculares a la mayoría de los laboratorios para el diagnóstico de estos procesos neurológicos.**

**Palabras clave:** Meningitis aguda. Encefalitis aguda. Virus. Bacterias.

Autochthonous acute viral and bacterial infections of the central nervous system (meningitis and encephalitis)

**Rapid diagnosis of acute viral and bacterial infections of the central nervous system (meningitis and encephalitis) is highly important for the clinical management of the patient and helps to establish early therapy that may solve life-threatening situations, to avoid unnecessary empirical**

**treatments, to reduce hospital stay, and to facilitate appropriate interventions in the context of public health. Molecular techniques, especially real-time polymerase chain reaction, have become the fastest and most sensitive diagnostic procedures for autochthonous viral meningitis and encephalitis, and their role is becoming increasingly important for the diagnosis and control of most frequent acute bacterial meningitides.**

**Automatic and closed systems may encourage the widespread and systematic use of molecular techniques for the diagnosis of these neurological syndromes in most laboratories.**

**Key words:** Acute meningitis. Acute encephalitis. Viruses. Bacteria.

## Introducción

El diagnóstico etiológico rápido de los procesos neurológicos infecciosos agudos (meningitis y encefalitis), debidos a bacterias o virus, tiene una gran trascendencia y rentabilidad clínica. Permite resolver satisfactoriamente algunas enfermedades extremadamente graves con tratamientos antibióticos o antivirales adecuados. Además, en los casos menos graves, contribuye a disminuir el tiempo de estancia hospitalaria, el uso inadecuado de antibióticos –en su caso– y evita en gran medida las situaciones de angustia que se generan ante un proceso neurológico sin filiar.

En la actualidad, un porcentaje elevado de casos de meningitis y de encefalitis agudas en humanos permanece sin un diagnóstico etiológico. Aunque presumiblemente la mayoría se debe a virus, diversas circunstancias, como tratamientos previos, mala conservación de la muestra, o problemas en la fase analítica, hacen que muchas infecciones bacterianas también puede que no se etiqueten.

En nuestro medio, los casos de meningitis y encefalitis virales (MEV) producidos por enterovirus (EV), virus de la Toscana (VTOS), virus del herpes simple (VHS) y varicela zóster (VVZ) suponen más del 95% de todas las meningitis y encefalitis en las que se obtiene un diagnóstico

Correspondencia: Dr. J.M. Navarro-Marí.  
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves.  
Avda. Fuerzas Armadas, 2. 18014 Granada. España.  
Correo electrónico: josem.navarro.sspa@juntadeandalucia.es

etiológico viral<sup>1-3</sup>. El número de casos debidos a virus de la parotiditis (VP) ha disminuido sustancialmente desde la introducción de la vacuna triple vírica en el calendario vacunal infantil. De forma excepcional, se han descrito cuadros neurológicos por virus del Nilo occidental<sup>4</sup> (VWN, del inglés West Nile). Aunque se ha encontrado en posibles reservorios<sup>5</sup>, no se ha logrado detectar el virus de la coriomeningitis linfocitaria (VCML) en pacientes con infección neurológica aguda en España hasta la fecha. El citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr (VEB), excepcionalmente, pueden ocasionar MEV, mientras que el papel real de otros virus del grupo herpes, como el virus del herpes humano tipo 6 (VHH 6), VHH 7 y VHH 8, que también se han detectado en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con cuadros neurológicos, está por determinar<sup>6</sup>.

Clásicamente, el diagnóstico de las MEV se ha realizado fundamentalmente por técnicas serológicas, mediante demostración de producción intratecal de anticuerpos, detección de seroconversión o seroincremento de inmunoglobulina (Ig) G en suero, o detección de IgM en suero o LCR, y por técnicas de cultivo en líneas celulares adecuadas de LCR o material de biopsia cerebral según los casos, o de las muestras representativas de las diferentes vías de diseminación o excreción del virus<sup>7</sup>. En los últimos años, a estos procedimientos se han añadido las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), que para detectar muchos de los virus implicados se han convertido en los procedimientos de referencia.

Entre las bacterias, excluido el período perinatal, la mayoría de los episodios de meningitis bacteriana aguda (MBA) los causan 3 microorganismos, transmitidos persona a persona: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b. En España, la vacunación sistemática infantil con vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b prácticamente ha eliminado la meningitis y otras formas invasivas de enfermedad causadas por este agente.

El diagnóstico de las MBA se realiza sobre todo por aislamiento en cultivo del microorganismo causal y por detección de antígenos específicos en LCR. Recientemente, se están introduciendo las TAAN como herramienta diagnóstica en estos cuadros, las cuales han mostrado su utilidad en el diagnóstico inicial y el control de estas infecciones.

A la hora de introducir nuevas técnicas en el laboratorio o de elegir el mejor método diagnóstico para cuadros de MEV o de MBA, hay que tener en cuenta, en combinación, diversos factores, como el microorganismo que se espera detectar en función del cuadro clínico y de la etiología local más frecuente, la muestra más representativa del cuadro clínico, la experiencia del laboratorio y las instalaciones disponibles.

De forma particular, cuando se quieran implantar TAAN, hay que considerar inicial y fundamentalmente el coste/beneficio de su aplicación en cuanto a rentabilidad clínica y/o epidemiológica, y optar por los protocolos más rentables, en términos de sensibilidad y factibilidad técnica. Para ello, es aconsejable emplear equipos y reactivos comerciales, ya que los sistemas de preparación de ácidos nucleicos y las mezclas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) prefabricadas se encuentran sometidas a un riguroso control de calidad; y se deben fomentar to-

das las medidas que favorecen la automatización de los procesos, que contribuyen a disminuir el número de contaminaciones, que evitan errores manuales, como las desviaciones en el pipeteo, lo cual, por tanto, hace que las TAAN sean más reproducibles y fáciles de estandarizar.

## Diagnóstico molecular de las infecciones agudas del sistema nervioso central producidas por virus

Actualmente, las TAAN se han convertido en la mejor herramienta para diagnosticar casi todos los cuadros de MEV a partir de muestra de LCR. Sus principales ventajas respecto al cultivo celular son poder detectar virus no viables o que no crecen en cultivo, una rapidez y sensibilidad mayores, la necesidad de una dotación técnica menor, un volumen de muestra menor, y que hay "kits" comerciales para la mayoría de virus implicados.

Por otro lado, están surgiendo numerosos formatos que consiguen una *automatización* total o parcial de todo el procedimiento. Los sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos son compatibles con los formatos de amplificación comerciales y caseros, y simplifican bastante el proceso, a la vez que resultan ser más reproducibles que los sistemas de extracción manual.

Aunque la PCR es la técnica molecular más ampliamente implantada en la mayoría de los laboratorios de microbiología, están disponibles en el mercado otros formatos, como la amplificación isotérmica de ácido ribonucleico (ARN) (NASBA), para detectar los virus más frecuentes en MEV<sup>8</sup>.

Los EV son los principales agentes productores de meningitis aséptica (MA), y el microorganismo que más se detecta, en general, en LCR de pacientes con meningitis. Su incidencia real probablemente esté infravalorada, debido a que en muchos casos el cuadro clínico sigue un curso benigno y no requiere punción lumbar, ni ingreso hospitalario, y a que no se investiga de forma sistemática en muchos laboratorios de microbiología clínica. No obstante, se considera que aproximadamente el 90% de los episodios de fiebre y pleocitosis en LCR en la edad pediátrica está causado por EV<sup>9</sup>. Aunque la incidencia de la infección es máxima durante los meses cálidos del año, cabe esperarla en cualquier estación. Ocasionalmente, se han descrito casos de meningoencefalitis y encefalitis por EV<sup>10</sup> y complicaciones de la meningitis en pacientes inmunodeprimidos<sup>11</sup>.

Clásicamente, el aislamiento en cultivo celular a partir de muestra de LCR era la técnica de referencia para el diagnóstico de infección neurológica por EV<sup>12</sup>, pero el cultivo celular no es asequible para la mayoría de laboratorios y requiere una infraestructura especial y personal entrenado en el manejo de líneas celulares. Además, no hay una única línea celular en la que se puedan aislar los más de 70 serotipos descritos<sup>13</sup>.

Actualmente, la PCR se ha convertido en el método de referencia para diagnosticar procesos neurológicos por EV. Hoy día, hay numerosos "kits" comerciales disponibles, que facilitan la introducción de técnicas rápidas de PCR en la mayoría de los laboratorios de microbiología. El diagnóstico de la meningitis por EV mediante TAAN

supone uno de los mejores ejemplos de rentabilidad de las técnicas moleculares en microbiología en términos de coste/beneficio, tanto por evitar tratamientos antibióticos empíricos innecesarios, como por mejorar el tratamiento del paciente y de la situación de alerta sanitaria que generan los cuadros de meningitis, especialmente en niños en edad escolar<sup>14</sup>.

Es importante disponer de una técnica genérica sensible para detectar los distintos serotipos de EV, que utilice dianas conservadas dentro del género, como la región 5' no codificante (5' NC)<sup>15,16</sup>. Otras regiones, como VP1<sup>17,18</sup>, son más útiles con fines epidemiológicos, para determinar el serotipo de EV, mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados.

La muestra idónea para diagnosticar mediante TAAN meningitis por EV es el LCR. Aunque el exudado faríngeo o las heces también se aceptan<sup>12,19</sup>, hay que tener en cuenta que muchas veces la detección de EV en estas muestras puede simplemente representar colonización y excreción asintomática, respectivamente.

Al ser los EV virus ARN, previamente a la PCR, tiene que realizarse retrotranscripción (RT), o síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario (ADNc) al ARN viral. Se han descrito numerosos protocolos de PCR en tiempo real (RT-PCR) para EV<sup>8,15,16,20</sup>, y a partir de éstos se han desarrollado diversos formatos comerciales. La mayor rapidez, equiparable sensibilidad con respecto a la PCR convencional, y menor riesgo de contaminación de la RT-PCR, hacen de ésta la mejor técnica molecular para detectar EV en muestras de LCR.

Recientemente, se ha comercializado el sistema GeneXpert® (Cepheid Sunnyvale, CA, Estados Unidos) para detectar EV en muestras de LCR, que integra en el mismo cartucho de reacción todos los pasos del proceso (extracción, RT y RT-PCR), consiguiendo la automatización total de éste, lo que permite obtener resultados en un tiempo de 2,5 h. A diferencia de otros protocolos de RT-PCR para EV, que sólo amplifican un fragmento, este sistema incluye 4 "sets" de cebadores y sondas, que pueden amplificar hasta 4 fragmentos diferentes de la región conservada 5' NC<sup>15</sup>. Este hecho la hace muy sensible para detectar la gran mayoría de serotipos descritos de EV; tanto para los más frecuentemente implicados en meningitis (Coxsackie B5, *Echovirus* 4, 6, 9, 11 y 30)<sup>10</sup>, como para los serotipos de reciente descripción en España, como es el EV 75<sup>21</sup>.

Entre los virus de la familia *Herpesviridae*, los más frecuentes en procesos de encefalitis y meningoencefalitis agudas y subagudas son los alfa-herpesvirus, VHS y VVZ, los cuales suponen más del 75% de los casos en nuestro medio<sup>22</sup>. El tratamiento temprano de la infección con antivirales adecuados reduce en gran medida la mortalidad y las secuelas posteriores.

Las TAAN son el procedimiento de elección y se han convertido en las técnicas de referencia para detectar VHS y VVZ en LCR, que desplazan al cultivo de la biopsia cerebral, la cual, además de ser una técnica más cruenta, es menos sensible que la PCR específica del LCR, que es el método diagnóstico más fiable, y debe implantarse en preferencia al cultivo viral o a la determinación específica de anticuerpos intratecales<sup>6</sup>.

Las técnicas comerciales disponibles de PCR o NASBA en tiempo real, en combinación con los sistemas automá-

ticos de extracción de ácidos nucleicos, simplifican el procesamiento y proporcionan un resultado definitivo en 3-4 h, lo que facilita la instauración del tratamiento temprano con aciclovir.

Se han descrito numerosas dianas del genoma de VHS (ADN polimerasa, timidina cinasa) y VVZ (timidina cinasa, gen 28, gen 29) para su detección mediante protocolos de PCR<sup>6,23,24</sup>. Hay tanto *kits* comerciales basados en la amplificación múltiple de virus del herpes<sup>20</sup>, como los que detectan independientemente VHS y VVZ, que emplean el mismo protocolo de amplificación, por lo que permiten realizar de forma simultánea la investigación de ambos virus. Los primeros tienen la ventaja de utilizar un solo tubo de reacción para detectar varios virus, lo que simplifica la preparación de la reacción, y los segundos tienen la ventaja teórica de las técnicas de PCR simple con respecto a las de PCR múltiple, en lo que respecta a la sensibilidad.

Aunque con una frecuencia mucho menor, otros virus del herpes causan infección del sistema nervioso central. Si bien la PCR del LCR es útil para diagnosticar infección neurológica por CMV, y está en estudio si puede servir para diagnosticar linfoma primario por VEB en pacientes con sida, no ocurre así con VHH 6, VHH 7, VHH 8 y VEB investigado en otro proceso diferente al mencionado anteriormente, cuya detección no ofrece una evidencia definitiva de encefalitis por los mismos, dado que se ha detectado ADN de estos virus en pacientes sin cuadros neurológicos<sup>6</sup>.

El VTOS es un arbovirus que produce cuadros neurológicos, generalmente MA (aunque excepcionalmente se han descrito casos de meningoencefalitis y encefalitis), que cursa de forma leve y autolimitada, y los casos se concentran fundamentalmente en meses cálidos, cuando circula el vector<sup>25</sup>. Filogenéticamente, se han descrito 2 variantes (italiana y española) del VTOS<sup>26</sup>. En nuestro medio, supone actualmente la segunda causa de MA tras EV, ya que los casos debidos a VP, que anteriormente era el segundo agente viral más implicado en MA, prácticamente han desaparecido desde la introducción de la vacuna triple viral. El VTOS se puede detectar de casos de MA mediante cultivo del LCR en células Vero, o por detección de IgM específica en LCR y/o suero. No hay *kits* comerciales para la detección molecular del VTOS, aunque sí para detectar anticuerpos específicos IgG e IgM (Diesse, Siena, Italia). La técnica de referencia para detectar el VTOS en cuadros neurológicos sigue siendo el cultivo del LCR en líneas celulares; no obstante, la RT-PCR ha demostrado ser más sensible que éste<sup>27,28</sup>. Se deben utilizar técnicas que contemplen la variabilidad genética inherente a estos virus, ya que con algunos de los cebadores empleados en técnicas de RT-PCR para VTOS puede no detectarse la variante española<sup>29</sup>. Recientemente, se ha descrito un protocolo de RT-PCR dirigida frente al extremo 3' del gen *N*, una región conservada del segmento S del genoma del VTOS, que, en combinación con un sistema automático de extracción de los ácidos nucleicos, permite obtener resultados en 3-4 h con cualquiera de las variantes del virus<sup>28</sup>.

En 2007 se ha notificado el primer caso en España de infección neurológica por VWN en un paciente con MA<sup>4</sup>. Aunque esta arbovirosis es por ahora infrecuente en nuestro medio, se ha constatado la circulación local de VWN en aves salvajes<sup>30</sup> de algunos humedales de nuestro en-

torno. El cuadro neurológico que produce puede llegar a ser muy grave, y ha provocado epidemias en otras regiones del mundo<sup>31</sup>. Hay *kits* comerciales de RT-PCR para detectar VWN, que pueden ser de utilidad para diagnosticar infección neurológica por este virus, aunque, hoy día, la técnica de elección sigue siendo la demostración de anticuerpos específicos en suero y LCR<sup>25</sup>.

Como norma general, las muestras de LCR para investigación de virus se pueden conservar a 4 °C hasta su procesamiento, si éste se va a realizar antes de 48 h, y en caso de más demora, se mantendrán a temperatura igual o inferior a -80 °C.

En la tabla 1 se muestran los principales agentes implicados en MEV y la utilidad relativa de las TAAN frente a las distintas técnicas diagnósticas usadas clásicamente, fundamentalmente cultivo y/o serología.

## Diagnóstico molecular de las meningitis bacterianas agudas

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios en los que se pone de manifiesto la utilidad y la

mayor sensibilidad de las TAAN en el diagnóstico temprano de MBA frente a otras técnicas, como cultivo, detección de antígenos o tinciones directas. En la mayoría de los casos, se utilizan sistemas de PCR múltiple, que permiten detectar en un mismo ensayo los 3 agentes principales implicados en MBA, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* tipo b, ya sea usando formatos clásicos, o, más recientemente, mediante RT-PCR.

Como se comentó anteriormente, gracias a la utilización de la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b, se han eliminado de nuestro entorno la meningitis y otras formas invasivas de enfermedad causadas por este agente. Ello, unido al hecho de que el diagnóstico molecular de las infecciones neumocócicas se trata en otro capítulo de esta monografía<sup>33</sup>, hace que en este capítulo nos centremos de forma casi exclusiva en las aplicaciones de las TAAN en el diagnóstico de infección por *N. meningitidis*. Tampoco trataremos otras formas de meningitis bacteriana, secundarias a traumatismos o cirugía, absceso cerebral, meningitis tuberculosa, etc., que por su origen, patogenia o forma de presentación requieren consideraciones especiales.

TABLA 1. Métodos diagnósticos de los principales virus implicados en meningitis y encefalitis agudas en nuestro medio

Virus	Síndrome neurológico	LCR			Otras muestras		
		PCR	Cultivo	Serología <sup>a</sup>	PCR	Cultivo	Serología <sup>a</sup>
<i>Enterovirus</i>	MA, (ME), (E)	+++	++	-	++ (faríngeo, heces)	++ (faríngeo, heces)	+
<i>Herpesviridae</i>							
VHS 1 y 2	E, MA <sup>b</sup>	+++	-	+	+++ (biopsia cerebral)	++ (biopsia cerebral)	-
VVZ	MA, ME, E, (MT), (VA), (CB)	+++	+/-	++	++ (Vesícula)	++ (Vesícula) <sup>c</sup>	++
CMV	E, MA, (EC), (VE), (RA)	+++	-	++	-	Faríngeo, sangre	++
VEB	ME, MA, (MT), (LP)	+++	-	++	-	-	++
VHH 6	ME, (PAEC)	+++	+	-	-	Sangre +/-	
<i>Paramyxoviridae</i>							
VP	MA	+++	++	++	++ (faríngeo, orina)	++ (faríngeo, orina)	++
Arbovirus <sup>d</sup>							
VTOS ( <i>Phlebovirus</i> )	MA, (ME), (E)	+++	++	+	-	-	+++
VWN ( <i>Flavivirus</i> )	E	++	+	++	Suero	-	+++
Robovirus							
VCML ( <i>Arenavirus</i> )	MA	++	++	++	-	-	+++

CB: cerebelitis; CMV: citomegalovirus; E: encefalitis; EC: enfermedad congénita; LP: linfoma primario en pacientes con sida; MA: meningitis aséptica; ME: meningoencefalitis; MT: mielitis transversa; PAEC: posible asociación con esclerosis múltiple; RA: radiculitis; VA: vasculitis; VCML: virus de la coriomeningitis linfocitaria; VE: ventriculitis; VEB: virus de Epstein-Barr; VHH 6: virus del herpes humano tipo 6; VHS: virus del herpes simple; VP: virus de la parotiditis; VTOS: virus de la Toscana; VVZ: virus varicela zóster; VWN: virus del Nilo occidental.  
Los paréntesis indican los cuadros clínicos raros.

<sup>a</sup>Suero: un aumento de 4 veces el título de inmunoglobulina (Ig) G entre el suero de fase aguda y el de fase convaleciente, o una única IgM positiva pueden ser diagnósticas.

<sup>b</sup>MA recurrente (síndrome de Mollaret) producida por VHS 2.

<sup>c</sup>La inmunofluorescencia directa ofrece la misma sensibilidad que el cultivo.

<sup>d</sup>Clasificación no taxonómica de virus transmitidos por artrópodos.

<sup>e</sup>Clasificación no taxonómica de virus transmitidos por roedores.

Tomada de Navarro et al<sup>2</sup>, Boivin<sup>6</sup>, Debiasi y Tyler<sup>7</sup>, Sánchez-Seco y Navarro<sup>25</sup> y Cinque et al<sup>32</sup>.

*N. meningitidis* es la primera causa de meningitis bacteriana en todo el mundo<sup>34</sup>. En España, como en otros países industrializados, la enfermedad meningocócica es endémica, con tasas de incidencia anual actualmente inferiores a 5 casos/100.000 habitantes<sup>35</sup>. Las formas típicas de presentación clínica de la enfermedad son la meningitis y la sepsis meningocócica. La meningitis es la entidad más común, y constituye la única forma de meningitis bacteriana que causa epidemias. La sepsis meningocócica aislada, aunque es menos frecuente, tiene peor pronóstico que la meningitis, y son habituales los casos en los que ambas formas, sepsis y meningitis, concurren. Por la potencial gravedad de los episodios, es prioritario confirmar el diagnóstico con rapidez con el fin de instaurar de manera temprana el tratamiento antimicrobiano adecuado y de poder establecer medidas profilácticas (quimioprofilaxis y/o vacuna) para evitar la aparición de casos secundarios<sup>36</sup>.

El desarrollo de métodos de diagnóstico molecular en infecciones bacterianas ha sido especialmente beneficioso en el contexto de la enfermedad meningocócica. Con respecto al cultivo, estos métodos son más sensibles, ya que no requieren bacterias viables y, por lo tanto, su capacidad de detección no se ve afectada, o sufre en menor medida la administración de antimicrobianos previa a la obtención de muestras. Esto permite la confirmación microbiológica de episodios sospechosos que no podría obtenerse por métodos de cultivo tradicional. El informe anual de la Red Europea de Vigilancia de Enfermedades Invasivas mostró que el uso de la PCR para diagnosticar enfermedad meningocócica se tradujo en un aumento de hasta el 100% en el número de casos confirmados<sup>37</sup>. En algunos países como Irlanda, Reino Unido y Grecia, el número de casos confirmados sólo por PCR superó a los confirmados por cultivo.

Las TAAN aportan más rapidez, especialmente los formatos de RT-PCR, con los que es posible detectar ADN de meningococo a partir de una muestra clínica en pocas horas<sup>38</sup>, y permiten predecir la susceptibilidad antimicrobiana<sup>39</sup> y caracterizar genéticamente el microorganismo sin necesidad de realizar un aislamiento previo<sup>40</sup>.

Por otro lado, actualmente es posible identificar directamente, a partir de muestras clínicas, el grupo capsular de *N. meningitidis*, lo que permite realizar intervenciones preventivas, como vacunación o quimioprofilaxis, para evitar casos secundarios. Asimismo, en los laboratorios de referencia es posible realizar, a partir de muestras clínicas, una genotipificación exhaustiva, con procedimientos adecuados para genosubtipado (*porA* typing) y MLST (*Multilocus Sequence Typing*), lo que proporciona información esencial para los sistemas de vigilancia epidemiológica.

En pocas entidades pueden aprovecharse las ventajas del diagnóstico molecular de una forma tan rentable como en la enfermedad meningocócica. Por ello, son ya muchos los laboratorios de microbiología que usan protocolos de PCR para diagnosticar y confirmar esta enfermedad, proceder que es avalado por la Organización Mundial de la Salud<sup>41</sup>. En un futuro no muy lejano, estas técnicas deberán aplicarse en todos los laboratorios, ya sea mediante su realización in situ, con la consiguiente estandarización de los protocolos<sup>42,43</sup>, o bien derivándolo a laboratorios de referencia.

Las muestras utilizadas con más frecuencia para diagnosticar la enfermedad meningocócica son el LCR y la

sangre, esta última en forma de sangre completa (tubo con EDTA), suero o plasma. La sangre completa ofrece un rendimiento mejor que las fracciones, pero está más expuesta a la presencia de inhibidores<sup>44</sup>. También, tanto para cultivo como para PCR, se ha utilizado con éxito material obtenido de lesiones petequiales, por lo que cuando se disponga de este tipo de muestras es recomendable utilizarlas. Las muestras deben recogerse lo antes posible, una vez que se establece la sospecha clínica, y, preferiblemente, antes de instaurar tratamiento antimicrobiano, aunque su administración no debe suponer una renuencia a realizar la toma. En un estudio realizado en 51 pacientes con enfermedad meningocócica, la duración media de la detección de ADN bacteriano en sangre tras la admisión en el hospital fue de 40 h, superando en un episodio los 4 días<sup>45</sup>. Otro trabajo mostró la persistencia de ADN de meningococo en el LCR del 40% de los pacientes con meningitis meningocócica tras recibir un tratamiento antimicrobiano completo durante más de 7 días<sup>46</sup>.

Las muestras deben conservarse a 4 °C hasta su procesamiento, si bien este aspecto puede no ser esencial, ya que la PCR es capaz de detectar ADN de meningococo tras varios días de conservación y transporte de las muestras a temperatura ambiente<sup>47</sup>. La extracción de ácidos nucleicos se puede realizar empleando distintos métodos de extracción convencionales, y en todos los casos, especialmente cuando la muestra a analizar es sangre completa, es recomendable purificar el ADN antes de la PCR.

Los protocolos de PCR utilizados por los distintos laboratorios son muy variados<sup>48</sup>. Incluyen diversas dianas, modelos de PCR convencional y en tiempo real, distintos sistemas de detección de los productos amplificados y formatos tanto caseros como comerciales. Algunos de ellos, como se comentó anteriormente, combinan la detección simultánea de las 3 bacterias más frecuentemente implicadas en episodios de meningitis aguda: meningococo, neumococo y *H. influenzae* tipo b<sup>49</sup>. Las técnicas de RT-PCR son más rápidas, permiten hacer simultáneamente la amplificación y la detección, lo que conlleva una manipulación menor y, por lo tanto, un riesgo menor de contaminación, superan en sensibilidad a la PCR convencional<sup>38,50</sup> y pueden proporcionar un resultado cuantitativo. La capacidad de detección referida en los distintos métodos es variable, con valores que oscilan entre 25 y 1.000 UFC/ml<sup>38,45</sup>.

La estrategia de trabajo más adecuada en la enfermedad meningocócica incluye un procedimiento de PCR a 2 niveles. El primero consiste en un cribado diagnóstico para la detección de ADN de meningococo, y el segundo se dirige a identificar el genogrupo. Para la detección genérica, se utilizan iniciadores de regiones conservadas. Los más comunes amplifican fragmentos del gen *ctrA* (operon capsular) o del gen *crpA* (regulación transcripcional de la región *LysR*)<sup>44,48</sup>. Para la determinación del genogrupo se amplifican distintos fragmentos del gen *siaD* (operon capsular)<sup>51</sup>.

Debido a la trascendencia de la enfermedad, es muy recomendable utilizar protocolos que incluyan 2 dianas distintas (PCR genérica y PCR de genogrupo), de manera que el resultado positivo se base en la detección de ambas dianas. Para los laboratorios que utilicen una única diana, se recomienda que un resultado positivo se confirme mediante la repetición del análisis en una segunda alícuota de la muestra original.

TABLA 2. Grados de recomendación y niveles de evidencia<sup>52</sup> para utilizar técnicas moleculares en meningitis y encefalitis agudas de origen autóctono

Grado de recomendación	Significado del grado de recomendación	Nivel de evidencia	Microorganismo estudiado
A	Extremadamente recomendable	1 a 1 c	EV, VHS, VVZ VTOS, CMV
B	Recomendación favorable	2	Meningococo, neumococo, VEB-LP, VP, VWN, VCML
C	Recomendación favorable, pero no concluyente	4	VEB, VHH 6, VHH 7, VHH 8

CMV: citomegalovirus; EV: enterovirus; VCML: virus de la coriomeningitis linfocitaria; VEB-LP: virus Epstein-Barr en linfoma primario en pacientes con sida; VHH 6: virus del herpes humano tipo 6; VHH 7: virus del herpes humano tipo 7; VHH 8: virus del herpes humano tipo 8; VHS: virus del herpes simple; VP: virus de la parotiditis; VTOS: virus de la Toscana; VVZ: virus varicela zóster; VWN: virus del Nilo occidental.

Se han utilizado otras dianas, como la región 16S rRNA, que permite diseñar métodos para la detección simultánea de todas las bacterias que causan meningitis; sin embargo, el riesgo de contaminación de reactivos o muestras con ADN bacteriano extraño desaconseja su uso en este contexto<sup>44</sup>.

## Conclusiones

El análisis por TAAAN del LCR se recomienda para infección por EV, VHS y VVZ (grado de recomendación A) (tabla 2), que son los implicados en MEV con más frecuencia en nuestro entorno. Son las técnicas de elección para todos ellos, además se dispone de reactivos comerciales, e incluso de métodos totalmente automatizados, y el impacto es inmediato en el tratamiento del paciente y de la alerta sanitaria en el caso de MA por EV, así como en el tratamiento temprano con aciclovir para VHS. La aplicación de TAAAN en LCR para diagnóstico de infección por otros virus del herpes tiene una utilidad variable; se recomienda para CMV (grado de recomendación A), puede ser de utilidad para diagnosticar linfoma primario por el VEB en pacientes con sida (grado de recomendación B), y ofrece resultados no concluyentes si el VEB se detecta en otro contexto o en el caso de VHH 6, VHH 7 y VHH 8 (grado de recomendación C).

El VTOS debería investigarse de forma sistemática en casos de MEV (grado de recomendación A), especialmente en determinadas áreas de España, aunque el hecho de no disponer de reactivos comerciales restringe su investigación a laboratorios de virología más especializados. La investigación por TAAAN de otros virus de menor incidencia, como VP, VWN o VCML (grado de recomendación B), debe realizarse fundamentalmente en centros de referencia.

La implantación de técnicas moleculares para el diagnóstico y la tipificación de infección por meningococo (grado de recomendación B) debe plantearse en los laboratorios con capacidad técnica suficiente, por su gran utilidad para el tratamiento tanto de los pacientes, como del contexto epidemiológico resultante del proceso. Sería deseable, dada la importancia que tiene la enfermedad meningocócica, buscar procedimientos técnicos más simples que permitieran generalizar su uso a la mayoría de los laboratorios de microbiología.

Actualmente, tanto para MEV como para MBA, el mejor formato de detección molecular probablemente sea la

combinación de sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos con técnicas de amplificación en tiempo real. El futuro de las TAAAN para diagnosticar estas infecciones pasa por desarrollar sistemas automatizados cerrados, con pocas posibilidades de contaminación y una garantía de calidad elevada.

## Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Gutiérrez Rodríguez MA, García Comas L, Rodero Garduño I, García Fernández C, Ordoñez Gavín M, Ramírez Fernández R; Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid. Increase in viral meningitis cases reported in the Autonomous Region of Madrid, Spain, 2006. *Euro Surveill.* 2006;11:E061103.3.
- Navarro JM, Fernández-Roldán C, Pérez-Ruiz M, Sanbonmats S, De la Rosa M, Sánchez-Seco MP. Meningitis por virus de la Toscana en España: descripción de 17 casos. *Med Clin (Barc).* 2004;122:420-2.
- De la Loma A, Trallero G, De Ory F, Tenorio A, Sanz M, Echevarría JM. Meningitis linfocitaria. en España: posible situación epidémica en el año 2000. *Med Clin (Barc).* 2002;118:694-5.
- Kaptoul D, Viladrich PF, Domingo C, Niubó J, Martínez-Yélamos S, De Ory F, et al. West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:70-1.
- Ledesma J, Fedele G, Carro F, Gegúndez MI, Sánchez-Seco MP, Lledó L, et al. Caracterización genómica del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) detectado en roedores en España. IX Congreso Nacional de Virología. Zaragoza: 2007. p. 174 [abstract].
- Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes.* 2004;11(Suppl 2):48A-56A.
- Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:903-25.
- Landry ML, Garner R, Ferguson D. Real-time nucleic acid sequence-based amplification using molecular beacons for detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3136-9.
- Nigrovic LE, Chiang VW. Cost analysis of enteroviral polymerase chain reaction in infants with fever and cerebrospinal fluid pleocytosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000;154:817-21.
- Modlin JF. Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2148-61.
- Chadwick DR. Viral meningitis. *Br Med Bull.* 2005;75-76:1-14.
- Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, Roizman B, Straus SE, editors. Fields Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 655-712.
- Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol.* 2005;86:445-51.
- Nolte FS. Case studies in cost effectiveness of molecular diagnostics for infectious diseases: pulmonary tuberculosis, enteroviral meningitis and BK virus nephropathy. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1463-7.

15. Kost CB, Rogers B, Oberste S, Robinson C, Eaves BL, Leos K, et al. Multi-center beta trial of the GeneXpert Enterovirus assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1081-6.
16. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric micro-well detection assay. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2590-2.
17. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1288-93.
18. Casas I, Palacios GF, Trallero G, Cisterna D, Freire MC, Tenorio A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol.* 2001;65:138-48.
19. Terletskaia-Ladwig E, Metzger C, Schallasta G, Enders G. A new enzyme immunoassay for the detection of enteroviruses in faecal specimens. *J Med Virol.* 2000;60:439-45.
20. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría 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;57:145-51.
21. Avellón A, Rubio G, Palacios G, Casas I, Rabella N, Reina G, et al. Enterovirus 75 and aseptic meningitis, Spain, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1609-10.
22. Echevarría JM, Casas I, De Ory F, Tenorio A, Echevarría C, Lozano A. Diagnóstico de laboratorio en casos de encefalitis aguda y subaguda de posible etiología vírica. *Neurología.* 1997;12:381-3.
23. 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.
24. Espy MJ, Teo R, Ross TK, Svien KA, Wold AD, Uhl JR, et al. Diagnosis of Varicella-Zoster Virus Infections in the Clinical Laboratory by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3187-9.
25. Sánchez-Seco MP, Navarro JM. Infecciones por el virus Toscana, el virus del Nilo Occidental y otros arbovirus de interés en Europa. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:560-8.
26. Sanbonmatsu-Gómez S, Pérez-Ruiz M, Collao X, Sánchez-Seco MP, Morillas-Márquez F, De la Rosa-Fraile M, et al. Toscana virus in Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1701-7.
27. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2500-2.
28. Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Mari JM, Tenorio A. Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol.* 2007;39:276-81.
29. Sánchez-Seco MP, Echevarría JM, Hernández L, Estévez D, Navarro-Mari JM, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol.* 2003;71:140-9.
30. Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Gómez Tejedor C, Jiménez-Clavero MA. Seroconversion in Wild Birds and Local Circulation of West Nile Virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1915-7.
31. Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan C, Phillips M, Bresnitz E, et al. Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:654-8.
32. Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol.* 2003;26:1-27.
33. Marimón Ortiz de Zárate JM, Cilla Eguiluz G, Pérez-Trallero E. Biología molecular en el diagnóstico de la infección respiratoria aguda de origen bacteriano. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(Supl 9):26-32.
34. World Health Organization. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. [Acceso 29 de febrero de 2008] Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/meningitis/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EDC\\_99\\_7\\_EN/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/meningitis/WHO_CDS_CSR_EDC_99_7_EN/en/)
35. Enfermedades de Declaración Obligatoria. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. [Acceso 17 de marzo de 2008] Disponible en: <http://www.isciii.es/jsps/centros/epidemiologia/seriesTemporalesAnuales.jsp>
36. Pérez-Trallero E, Aldamiz-Echeverría L, Pérez-Yarza EG. Meningococci with increased resistance to penicillin. *Lancet.* 1990;335:1096.
37. Invasive *Neisseria meningitidis* in Europe-2002. [Acceso 17 de marzo de 2008] Disponible en: [http://www.eubis.org/documents/2002\\_meningo.pdf](http://www.eubis.org/documents/2002_meningo.pdf)
38. Kesanopoulos K, Tzanakaki G, Levdiotou S, Blackwell C, Kremastinou J. Evaluation of touch-down real-time PCR based on SYBR Green I fluorescent dye for the detection of *Neisseria meningitidis* in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43:419-24.
39. Vázquez JA, Enriquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: any need to act? *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:64-70.
40. Kriz P, Kalmusova J, Felsberg J. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from cerebrospinal fluid. *Epidemiol Infect.* 2002;128:157-60.
41. Control of epidemics of meningococcal meningitis. WHO practical guidelines. [Acceso 17 de marzo de 2008] Disponible en: <http://w3.whosea.org/EN/Section23/Section1108/info-kit/who-meningitis-guidelines.pdf>
42. Fox AJ, Taha MK, Vogel U. Standardized nonculture techniques recommended for European referent laboratories. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:84-8.
43. Taha MK, Fox A. Quality assessed nonculture techniques for detection and typing of meningococci. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:37-42.
44. Guiver M, Borrow R. PCR diagnosis. En: Pollard AJ, Maiden MC, editors. *Meningococcal Disease*. Totowa: Humana Press; 2001. p. 23-40.
45. Hackett SJ, Guiver M, Marsh J, Sills JA, Thomson APJ, Kaczmarski EB, et al. Meningococcal bacterial DNA load at presentation correlates with disease severity. *Arch Dis Child.* 2002;86:44-6.
46. Vicente D, Esnal O, Valiente A, Idígoras P, Pérez-Trallero E. Detección de *Neisseria meningitidis* en el LCR de pacientes con meningitis meningocócica correctamente tratada. XI Congreso SEIMC. Bilbao: mayo 2004.
47. Sidikou F, Djibo S, Taha MK, Alonso JM, Djibo A, Kairo KK, et al. Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1486-8.
48. Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, Caugant DA, Clarke SC, Diggle MA, et al. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genotyping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:144-9.
49. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1553-8.
50. Guiver M, Borrow R, Marsh J, Gray SJ, Kaczmarski EB, Howells D, et al. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000;28:173-9.
51. Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:855-7.
52. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine Levels of Evidence. Grades of Recommendation. [Acceso 13 de marzo de 2008] Disponible en: [http://www.cebm.net/levels\\_of\\_evidence.asp](http://www.cebm.net/levels_of_evidence.asp)