

---

---

## Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de infecciones del Sistema Nervioso Central.

Yelitza Zambrano<sup>1</sup>, Anna Chiarello<sup>1</sup>, Alain Soca<sup>1</sup>, Iris Villalobos<sup>2</sup>, Miguel Marrero<sup>3</sup>, Maritza Soler<sup>3</sup>, José Laferte<sup>3</sup> y Maritza Álvarez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio Genomik, <sup>2</sup>Hospital Central de Maracay y <sup>3</sup>Diag Kit CA. Maracay, Venezuela. Correo electrónico: genomik@cantv.net

**Palabras clave:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Líquido Cefalorraquídeo (LCR), Sistema Nervioso Central (SNC).

**Resumen.** En el presente trabajo se aplicó el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes RT-PCR y Multiplex PCR para la detección de secuencias específicas de Enterovirus, Herpesvirus humanos (Virus Herpes simple y Virus Herpes tipo 6, Citomegalovirus, Epstein Barr, Varicela Zoster), Virus de Inmunodeficiencia Humana, *Toxoplasma gondii*, *Micobacterium tuberculosis* y *Micoplasma pneumoniae* en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de cohortes de pacientes con sospecha clínica de meningoencefalitis. De las 322 muestras de LCR procesadas, se detectaron un total de 93 muestras positivas (28,8%) para los distintos agentes infecciosos. En el grupo de pacientes con diagnóstico clínico de meningoencefalitis viral (n=212), se obtuvo un total de 73 muestras positivas (34,4%), de las cuales 37 fueron positivas a Enterovirus (50,7%), 19 a VHS (26%) y 10 pacientes (13,7%) fueron positivos a CMV. Los otros agentes virales VZV, EBV y HHV6 se encontraron en menor frecuencia. Las 110 muestras restantes de LCR se analizaron aplicando PCR específicos a cada patógeno por estricta indicación médica, pudiéndose detectar en ellas la presencia de Virus de Inmunodeficiencia Humana (40%), *Micoplasma pneumoniae* (40%), *Toxoplasma gondii* (14%) y *Micobacterium tuberculosis* (12%). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la conveniencia de la aplicación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de laboratorio de las meningoencefalitis de diferente etiología, siendo además una herramienta muy valiosa para el manejo clínico de los pacientes y para la ejecución de estudios epidemiológicos.

## Use of Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of Central Nervous System infections.

*Invest Clín 2006; 47(4): 337 - 347*

**Key words:** Polymerase Chain Reaction (PCR), Cerebrospinal fluid (CSF), Central Nervous System (CNS).

**Abstract.** In the present work, the polymerase chain reaction (PCR) assay and his variants RT-PCR and Multiplex PCR were applied for the detection of specific sequences of Enterovirus, Human Herpes viruses (Herpes simple virus, Human Herpes virus type 6, Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, and Varicella Zoster), Human Immunodeficiency virus, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycoplasma pneumoniae* in patients' cohorts grouped by medical suspicion of meningoencephalitis. Of 326 samples of processed cerebrospinal fluid (CSF), 93 samples (28.5 %) were positive for the different infectious agents. In the group of patients with clinical diagnosis of viral meningoencephalitis (n=212), there was obtained a whole of 73 positive samples (34.4 %), of which 37 patients were positive to *Enterovirus* (50.7 %), 19 were positive to *VHS* (26 %) and 10 patients (13.7 %) were positive to *CMV*. Other viral agents as *VZV*, *EBV* and *HVH6* were detected in minor frequency. The 114 remaining samples were analyzed applying specific PCR to each pathogen for strict medical indication, being able to detect the presence of *Human Immunodeficiency Virus* (40%), *Mycoplasma pneumoniae* (40%), *Toxoplasma gondii* (14%) and *Mycobacterium tuberculosis* (12%) in CSF samples. The results obtained in this study demonstrate the convenience of the application of the molecular assays in the laboratory diagnosis of the meningoencephalitis of different etiology. Besides this, it is also a very valuable tool for the clinical management of the patients and for the execution of the epidemiological studies.

*Recibido: 03-05-2005. Aceptado: 04-05-2006.*

### INTRODUCCIÓN

Las encefalitis y las meningitis no bacterianas denominadas también meningitis asépticas o serosas, son los procesos inflamatorios que con más frecuencia afectan al SNC. El cuadro clínico de estas patologías se caracteriza por síntomas de las vías respiratorias altas, cefalea, mialgias, fiebre, alteración del estado de conciencia, disfunción cerebral difusa o local, confusión, desorientación, alteración del comportamiento y de la personalidad, irritación menín-

gea, náuseas, vómitos y rigidez de la nuca, crisis convulsivas locales o generalizadas y la presencia de un líquido cefalorraquídeo de aspecto claro o ligeramente turbio, con niveles de proteína y glucosa variable y acompañado o no de leucocitosis y pleocitosis (1).

Los agentes infecciosos generalmente implicados en las meningoencefalitis son los virus, sin embargo se han reportado otros agentes etiológicos tales como bacterias, parásitos y hongos, así como también desordenes de tipo autoinmune, los cuales

pueden ocasionar estas patologías en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes (2-13). Su incidencia a nivel mundial varía según el grupo de edad, el estado previo de salud y el nivel socioeconómico, siendo las de etiología viral las más frecuentes en todos los grupos etarios (14-16).

En Venezuela, según estadísticas del Ministerio de Salud, desde el año 2003 hasta la semana N° 47 del año 2005 se reportaron un total de 3787 casos de meningitis, con 156 fallecimientos. Las campañas de vacunación contra los principales agentes bacterianos causantes de meningoencefalitis han impactado la epidemiología de las infecciones del SNC. En este sentido las estadísticas de meningitis en Venezuela para el año 2004 registraron 447 casos de meningitis viral y 899 de meningitis bacteriana, sin embargo esta correlación cambió significativamente en el año 2005 donde se observaron 893 casos de meningitis viral y solo 244 de las bacterianas (17). Esta situación no ha cambiado en muchos países subdesarrollados donde las meningoencefalitis bacterianas son frecuentes, y tienen una mortalidad significativamente mas alta que en los países desarrollados, con tasas de hasta 50% y secuelas hasta en un 60% de los sobrevivientes (18-20).

En estudios seroepidemiológicos realizados en el estado Zulia se reportó que el 61% de las infecciones del SNC, referidas como de etiología no precisada, fueron causadas por agentes virales (14). Estos resultados alertaron al sistema de salud sobre la posibilidad de existencia de un subregistro de éstas y otras entidades infecciosas que causan enfermedades neurológicas tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunodeprimidos y además señaló la necesidad de disponer de un diagnóstico diferencial rápido y oportuno para estas entidades.

La identificación rápida y precisa de dichos agentes infecciosos en las muestras clínicas procedentes de pacientes con afectación del SNC, tiene gran valor diagnóstico y epidemiológico, permitiendo la implementación de las estrategias terapéuticas adecuadas (16). Los métodos convencionales que han estado disponibles para estos fines incluyen el aislamiento del agente causal a partir de muestras de LCR o tejido cerebral, la detección de antígeno en tejido cerebral y la detección de anticuerpos específicos intratecales (21-23). Estos métodos generalmente son lentos, laboriosos y poco sensibles (21-25). La emergencia natural de una variedad de agentes infecciosos neurotrópicos y las limitaciones de los métodos tradicionalmente utilizados para la identificación de los mismos, ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias diagnósticas. El desarrollo de las técnicas de biología molecular y en particular del ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han permitido la detección de secuencias de ADN y ARN de microorganismos en diferentes tipos de muestras clínicas, con una adecuada sensibilidad, logrando un diagnóstico etiológico rápido y preciso (4, 26-29).

En el presente trabajo se realiza la confirmación etiológica de un grupo de agentes neurotrópicos en muestras de LCR de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos con sospecha clínica de meningoencefalitis de diferente etiología. La aplicación de los ensayos de PCR y RT-PCR para la detección de los diferentes agentes infecciosos se basó exclusivamente en el criterio médico e incluyó la detección de Enterovirus (EV), Herpesvirus humanos: Citomegalovirus (CMV), Virus Herpes Simple (VHS), Epstein Barr Virus (EBV), Varicela Zoster Virus (VZV), Herpes Virus Humano 6 (HVH6), también se estudio la presencia de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), *Micobacterium tuberculosis*, *Micoplasma*

*pneumoniae* y *Toxoplasma gondii*, cuando era indicada por el facultativo.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Muestras

Se estudiaron un total de 322 muestras de LCR pertenecientes a un grupo de pacientes hospitalizados en diferentes centros de salud de las ciudades de Maracay y Valencia, en los cuales existía la sospecha clínica de infección del SNC de diferente etiología. Las muestras fueron recolectadas durante las primeras 72 horas de evolución, durante el período comprendido entre Enero de 2002 y Noviembre de 2004. El procesamiento se inició inmediatamente después de su recepción en el laboratorio Genomik de la ciudad de Maracay.

Los ensayos de PCR se realizaron de acuerdo a la sospecha clínica del médico tratante. Para el análisis, las muestras fueron divididas en los siguientes grupos:

- Grupo 1: Se estudiaron 212 muestras de LCR provenientes de pacientes, tanto recién nacidos como de niños y adultos, con el diagnóstico clínico de meningoencefalitis de posible causa viral (EV, CMV, EBV, VHS, VZV y HHV6). Este grupo comprendió 186 pacientes inmunocompetentes y 26 pacientes con una historia clínica de inmunosupresión por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).
- Grupo 2: 15 muestras de LCR provenientes de pacientes adultos con diagnóstico de SIDA (24-50 años), con manifestaciones cerebrales o meníngeas debido a VIH.
- Grupo 3: 47 muestras de LCR provenientes de 42 pacientes adultos (35 pacientes VIH positivos y 7 inmunocompetentes) y de 5 recién nacidos, con un diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis cerebral.

- Grupo 4: 43 muestras de LCR provenientes de pacientes adultos (31 pacientes VIH positivos y 12 inmunocompetentes) con un diagnóstico presuntivo de infección del SNC debido a *Mycobacterium tuberculosis*.
- Grupo 5: 5 muestras de LCR provenientes de pacientes inmunocompetentes con un rango de edad entre los 3 a 8 años y con un diagnóstico clínico presuntivo de infección del SNC por *Micoplasma pneumoniae* debido a los resultados serológicos.

Las muestras fueron consideradas como positivas o negativas en dependencia de la detección de las secuencias de genoma específicas para cada agente infeccioso. El reporte individual de los resultados para cada paciente fue emitido en un lapso de 48 horas posteriores a la recepción de las muestras.

### Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN)

Se utilizó el estuche RNeasy Total RNA Isolation System (Cat # Z5110, Promega). Las muestras de LCR con un volumen entre 1,5-2 mL fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos y se recuperaron 200  $\mu$ L de LCR. A este volumen se le añadieron 300  $\mu$ L de solución desnaturante, 30  $\mu$ L de acetato de sodio pH 4,0 y 300  $\mu$ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La mezcla se agitó utilizando un vortex durante 10 a 20 segundos y se colocó en hielo por 15 minutos. Posteriormente se procedió a la centrifugación a 14 000 rpm en frío por 15 minutos y se transfirieron 400  $\mu$ L de la fase acuosa a un tubo vacío. Se añadió igual cantidad de isopropanol, se agitó suavemente y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. Los ácidos nucleicos se precipitaron mediante centrifugación a 14000 rpm en frío por 15 minutos y el sedimento se lavó con 1 mL de etanol frío al 75%. Se procedió a centrifugar 2 mi-

nutos a 10°C y con posterioridad a secar a temperatura ambiente por 15 min. El precipitado resultante se resuspendió con 30 µL de agua estéril libre de nucleasas (Promega) y la suspensión se utilizó inmediatamente en los ensayos.

#### Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción inversa

- Para el análisis de las muestras de LCR de pacientes con sospecha de infección por EV, CMV, EBV, VHS, VZV y HHV6 (Grupo 1), se utilizó el ensayo de PCR múltiple anidado descrito por Casas y col. en 1997 (30), usando los estuches comerciales Access RT-PCR Systems (Cat.# A1260 y PCR Master Mix Cat.# M7502, Promega), en un volumen final de 25 µL. Los controles positivos empleados fueron: cepas Coxsackievirus B2 y Enterovirus 70 (aisladas de pacientes y tipificadas por seroneutralización) para los EV, cepa F para HSV 1, cepa Lovelace para HSV2, cepa CS para HHV6, Cepa ELLEN (ATCC) para VZV, cepa AD169 (ATCC) para CMV y células RAJI (ATCC) para EBV.
- PCR para VIH 1&2. El análisis de VIH en las muestras de LCR incluidas en el grupo 2, se realizó mediante los ensayos de PCR para VIH 1&2 descrito por Albert y col. (31) y Olov y col. (32) respectivamente. Se empleó un juego de cebadores externos para la primera amplificación y dos internos para la segunda amplificación de tres regiones conservadas del genoma viral para VIH tipo 1: una región del pol (JA17 a JA20); una región del gag (JA4 a JA7) y una región conservada del env (JA13 a JA16) y dos regiones del genoma viral para VIH tipo 2: (gag p24, y LTR). Como controles positivos del ensayo se utilizaron ADN de linfocitos de pacientes infectados con VIH 1 confirmados

en el ensayo de Western blot y con carga viral conocida.

- Para la detección de *T. gondii* en las muestras de LCR incluidas en el grupo 3, se empleó el método de PCR descrito por Fuentes y col. (33), el cual utiliza cebadores que corresponden al gen B1 del genoma del *T. gondii*. Como control positivo del ensayo se utilizó la cepa RH de *T. gondii*.
- La determinación de *M. tuberculosis* en las muestras de LCR incluidas en el grupo 4, se llevó a cabo mediante el PCR múltiple descrito por Del Portillo y col. (34) con modificaciones. Se emplearon dos juegos de cebadores, uno que amplifica un fragmento de 506-pb del gen del antígeno 32-kDa para *Micobacterias*; el segundo juego de cebadores amplifica un fragmento de 984-pb de la secuencia de inserción IS6110 que pertenece al complejo de *M. tuberculosis*. Como control positivo del ensayo se utilizó la cepa *Micobacterium smegmatis* (ATCC 19420).
- Para el análisis de *M. pneumoniae* en las muestras de LCR incluidas en el grupo 5, se utilizó el protocolo de PCR anidada descrita por Deng y col. (35). Este ensayo utiliza juegos de cebadores que amplifican un fragmento de 277pb de la región variable dentro del gen del ARNr 16S de *M. pneumoniae*. Como control positivo del ensayo se utilizó una cepa de *Micoplasma spp* obtenido de cultivo celular.

Las amplificaciones de todos los ensayos se realizaron en un termociclador PTC-100 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, MA), utilizando para la reacción tubos de ensayo de pared delgada (MJ Research, MA, USA). Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidium a una concentración final de 1,5 µg/mL. Se utilizó el marcador de

peso molecular: 50bp DNA Step Ladder Promega. (Cat. # G4521) y las corridas se realizaron utilizando una corriente eléctrica de 120 voltios por 60 min. Las bandas fueron visualizadas mediante luz ultravioleta en un equipo de documentación de geles Alpha Ease™ Imagen analysis software (Alpha Innotech Corporation), siendo identificados cada uno de ellos por la talla de la banda obtenida.

### RESULTADOS

De las 322 muestras de LCR procesadas se detectaron un total de 93 positivas (28,8%). En las muestras de LCR incluidas

en el Grupo 1 (n= 212), se obtuvo un total de 73 positivas (34,4%), cuya distribución se encuentra en la Tabla I. Es de señalar que 37 pacientes fueron positivos a EV (50,7%), 19 fueron positivos a VHS (26%) y 10 pacientes (13, 7%) fueron positivos a CMV. Los otros agentes virales VZV, EBV y HVH6 se hallaron en menor frecuencia. De los 26 pacientes inmunosuprimidos incluidos en el grupo 1, 13 (50%) resultaron positivos a alguno de los agentes estudiados: 4 a VHS, 6 a CMV y 3 a EBV.

En el grupo 2, constituido por 15 muestras de LCR de pacientes con SIDA con manifestaciones meníngeas y en las cuales se investigó la presencia de secuen-

**TABLA I**  
DISTRIBUCIÓN DE AGENTES VIRALES EN 73 MUESTRAS DE LCR POSITIVAS EN PACIENTES CON MENINGOENCEFALITIS VIRAL

Muestras de (LCR) (n)	Edad (años)	Manifestaciones Clínicas / Diagnóstico presuntivo	Resultado RT-PCR positivo
37	2-41	Meningitis aséptica, pleocitosis linfocitaria	EV
18	2-44	Encefalitis viral, pleocitosis linfocitaria, meningoencefalitis viral, gingivo estomatitis herpética	VHS
1	4	Clínicamente: meningo-encefalitis viral, pleocitosis linfocitaria, antecedentes de gingivo- estomatitis herpética	VHS
5	30-45	VIH positivo, clínicamente encefalitis, ADN de CMV positivo en sangre.	CMV
3	RN	Sepsis neonatal, ADN de CMV positivo en sangre	CMV
1	36	Clínicamente meningo-encefalitis viral, pleocitosis linfo-monocitaria	CMV
1	49	Clínicamente poliradiculitis, Síndrome de Inmunodeficiencia	CMV
2	41-50	Complicación Varicela	VZV
1	8	Clínicamente: cerebelitis post-varicela	VZV
3	5-39	Meningoencefalitis viral, pleocitosis linfocitaria, SIDA.	EBV
1	54	Meningitis crónica, pleocitosis linfocitaria.	HVH6

LCR: Líquido cefalorraquídeo. n: número de muestras de LCR. RN: recién nacidos. EV: Enterovirus. CMV: Citomegalovirus. VZV: Varicela Zoster Virus. VHS: Virus Herpes Simple. EBV: Epstein Barr Virus. HVH6: Herpes Virus Humano 6. VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

cias de VIH, se obtuvieron 6 muestras positivas para VIH tipo 1 con un 40% de positividad.

En los pacientes con sospecha clínica de Toxoplasmosis (Grupo 3, n= 47), se obtuvieron 7 muestras positivas (14,9%), 5 de las cuales pertenecían a pacientes VIH positivos y el resto pertenecían a pacientes con sepsis neonatal.

En el grupo 4 constituido por 43 pacientes con sospecha clínica de infección por *M. tuberculosis*, se obtuvieron 5 muestras de LCR positivas (12%), 3 de cuales correspondieron a pacientes VIH positivos. En las 5 muestras de LCR de pacientes con sospecha clínica de infección del SNC por *M. pneumoniae* (grupo 5), se obtuvieron 2 muestras positivas en el ensayo de PCR (40%). Ambos pacientes tenían resultados positivos para la prueba de anticuerpos IgM a *M. pneumoniae* en suero y LCR y presentaron, respectivamente, un cuadro clínico de encefalitis y meningitis aséptica y de neumonía.

## DISCUSIÓN

La epidemiología de las infecciones del SNC es compleja debido a diversos factores sanitarios y poblacionales entre los que se destacan las campañas de vacunación, el incremento del número de pacientes con diversas formas de inmunosupresión, la emergencia y reemergencias a nivel mundial de un amplio rango de agentes infecciosos, la implementación de nuevos métodos diagnósticos y los problemas derivados de la resistencia microbiana. Las meningoencefalitis asépticas, plantean un problema para los laboratorios a diferencia de las meningoencefalitis bacterianas para las cuales existe una estrategia diagnóstica establecida en los Centros de Salud. En este contexto los especialistas en el área clínica deben enfrentar a individuos con una amplia variedad de síntomas que indican compromiso

importante del SNC (36). La utilización de las técnicas moleculares, particularmente la PCR, ha revolucionado el diagnóstico de las entidades infecciosas, resultando de mucha utilidad para el establecimiento de la etiología de numerosas infecciones del SNC (4, 7, 26, 27, 37-43).

En el presente trabajo se aplicaron ensayos de PCR para la detección de diferentes agentes infecciosos neurotrópicos (EV, Herpes virus humanos, VIH, *T. gondii*, *M. tuberculosis*, *M. pneumoniae*), en muestras de LCR provenientes de un grupo de pacientes con sospecha clínica de meningoencefalitis.

En 212 pacientes con sospecha clínica de meningoencefalitis de posible etiología viral (Grupo 1), se encontró un total de 34,4% de positividad, siendo los EV, VHS y CMV los patógenos más detectados en orden de frecuencia. Los EV y los herpes virus humanos son considerados patógenos neurotrópicos de importancia médica en los cuales el diagnóstico específico permite la implementación de una terapia antiviral específica para los Herpes o una observación clínica estrecha y medidas de soporte en caso de los EV (9, 44-46). En estudios previos donde se han utilizado diferentes protocolos de PCR para la detección de EV y Herpes virus humanos en muestras de LCR de pacientes con meningitis aséptica y encefalitis, se ha encontrado que la positividad general para estos agentes oscila entre un 10-60% (2, 10, 25, 30, 37, 38).

Fue posible establecer el diagnóstico de la infección del SNC por el VIH-1 en 6 de 15 pacientes adultos con SIDA (Grupo 2). El VIH-1 ha sido reconocido como un virus neurotrópico relacionado con una variedad de desórdenes neurológicos progresivos en los pacientes con SIDA. Los pacientes con enfermedades neurológicas causadas directamente por el VIH o por la infección de agentes oportunistas, pueden presentar replicación intratecal del virus, por lo tanto el diagnóstico temprano y el tratamiento

oportuno son considerados de un gran valor pronóstico (47-49).

Se detectó la presencia de *T. gondii* en las muestras de LCR de 7 de 47 pacientes (14%, Grupo 3) con diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis cerebral, siendo notorio que 5 de estas muestras positivas provenían de pacientes infectados con VIH. La infección por *T. gondii* tiene un profundo impacto en el curso de las enfermedades neurológicas en niños y adultos, pero principalmente su importancia se enfatiza durante el embarazo y la inmunosupresión (50). Se ha reportado que la infección por *T. gondii* es frecuente en pacientes VIH positivos causando lesiones cerebrales focales (51,52). En un estudio realizado por Parmley y col. (53), utilizando el ensayo de PCR y cebadores del gen B1 del *T. gondii*, se obtuvo un 44% de positividad en muestras de LCR de pacientes adultos inmunocomprometidos con diagnóstico clínico de encefalitis debida a infección por *T. gondii*.

En los pacientes con sospecha de meningoencefalitis debido a la infección por *M. tuberculosis* (Grupo 4, n= 43) y *M. pneumoniae* (grupo 5, n = 5), se detectó la infección en el 12% y el 40% de los pacientes, respectivamente. El incremento de la incidencia de tuberculosis y de infecciones por otras micobacterias en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, ha impulsado la búsqueda de métodos diagnósticos más rápidos y sensibles que el cultivo o las pruebas serológicas. El ensayo de PCR ha resultado apropiado y práctico para la detección de diferentes micobacterias en muestras de LCR de pacientes con meningoencefalitis, propiciando la iniciación de terapias adecuadas y evitando que los pacientes sufran daños severos del SNC y muerte (54, 55). La infección por *M. pneumoniae* ocasiona infecciones del tracto respiratorio alto y bajo, pero frecuentemente produce también manifestaciones extrapulmonares que incluyen desórdenes del SNC y

periférico. Las presentaciones clínicas de dichas afecciones incluyen meningitis, meningoencefalitis y mielitis transversa. La utilización del PCR en algunos pacientes con síndromes neurológicos ha sido beneficiosa ya que ha permitido detectar el *M. pneumoniae* en muestras de LCR de pacientes con cultivo negativo (5).

A pesar de la extrema sensibilidad que, teóricamente tiene la PCR, solo se pudieron detectar patógenos aproximadamente en un tercio de los LCR enviados al Laboratorio para estos estudios; las causas pueden ser múltiples y combinadas, ej. una baja concentración de microorganismos en LCR, la toma tardía de la muestra y el envío de muestras a temperaturas no controladas. Además es posible que la PCR que usamos en la actualidad no tenga el nivel de sensibilidad suficiente para detectar el 100% de los casos positivos, a este respecto existe una gran controversia en la literatura debido a la falta de una "prueba de oro" que permita establecer la verdadera sensibilidad de este método molecular en las diferentes situaciones clínicas (1).

Los resultados que se obtuvieron permiten sustentar que la implementación de las técnicas moleculares en los laboratorios clínicos es factible y mejora el diagnóstico etiológico de un grupo agentes infecciosos que están frecuentemente implicados en las meningoencefalitis asépticas en nuestro país. Debido a la rapidez en que puede realizarse el diagnóstico (48 horas), este método puede tener un impacto beneficioso en el manejo terapéutico de los pacientes, pudiéndose evitar el uso indiscriminado de antibióticos en casos no necesarios, teniendo en cuenta que para algunos grupos virales existen medicamentos específicos, como por ejemplo para los Herpesvirus.

La utilización de la biología molecular representa una alternativa de elección para el sistema de salud nacional permitiendo perfeccionar el diagnóstico y los estudios



epidemiológicos de las infecciones del SNC de etiología no bacteriana, actualmente está siendo usada en muchos países y abundan las citas bibliográficas sobre el tema, sin embargo, a nivel nacional encontramos escasas publicaciones, por lo cual consideramos de importancia este reporte que puede estimular el uso de esta tecnología y una aplicación más frecuente del método a la práctica médica.

### REFERENCIAS

1. **DeBiasi RL, Tyler K.** Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17(4): 903-925.
2. **Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A.** Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: A search for entero-and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol* 1999; 57: 145-151.
3. **Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, Kremastinou JK.** Laboratory diagnosis of common Herpesvirus infections of the Central Nervous System by a Multiplex PCR Assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12): 4426-4432.
4. **Jeffery KMJ, Banghan CRM.** Recent advances in the laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Curr Opin Infect Dis* 1996; 9:132-137.
5. **Socan M, Ravnik I, Bencina D, Dove P, Zakotnik B, Jazbec J.** Neurological symptoms in patients whose cerebrospinal fluid is cultured-and/or Polymerase Chain Reaction-Positive for *Mycoplasma pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 31-35.
6. **Climent Y, Martinez I, Nuñez N, Ginebra M, Zamora L, Gutierrez M, Sotolongo F, Acosta A, Climent LW.** Detection e identificación por PCR de microorganismos causantes de meningoencefalitis bacteriana. *VacciMonitor* 2002; 11(2):1-5.
7. **Xavier M, Correa B, Coromina M, Canas N, Guimaraes J.** Sudden psychotic episode probably due to meningoencephalitis and *Chlamydia pneumoniae* acute infection. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2005(15):1-15.
8. **Chiu HH, Lai SL.** Fatal meningoencephalitis caused by disseminated strongyloidiasis. *Acta Neurol Taiwan* 2005 (14):24-27.
9. **Thwaites GE, Chau TTH, Stepniwska K, Phu NH, Chuong LV, Sinh DX, White NJ, Parry CM, Farrar JJ.** Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. *Lancet* 2002; 360(26):1287-1292.
10. **Chesky M, Scalco R, Afilase L, Read S, Jobim LF.** Polymerase Chain Reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58(3-B): 836-842.
11. **Cerdas C, Retana M, Ramirez G, Valenciano A.** Neurocisticercosis parenquimatoosa activa. Reporte de un caso y revision de la literatura. *Rev Costarric Cienc Med* 2004; 25(1-2):1-6.
12. **Jauregui JMS, Sulibarria ZZ.** Las micosis en los pacientes infectados por el VIH en la era de los tratamientos antirretrovirales de gran eficacia. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 5-8.
13. **Gaete JN, Navarrete CA, Gonzalez J, Saez MD, Quijada VM, Espinoza ML.** Aspergilosis meningovascular: Caso clinico. *Rev Chil Neur-Psiquiat* 2005; 43(3):217-225.
14. **Valero N, Henriquez R, Hernandez C, Pomeda O, Romero M, Urdaneta F, Atencio R, Larreal Y, Espina LM, Rodríguez Z.** Agentes virales en pacientes con procesos infecciosos del Sistema Nervioso Central. *Invest Clín* 2001; 42(4):255-267.
15. **Whitley RJ, Gnann JW.** Viral Encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* 2002; 359:507-514.
16. **Davis LE, Tyler KL.** Molecular diagnosis of SNC viral infections. *J Neurol Psych* 2005; 76:10.
17. **Ministerio de Salud. República Bolivariana de Venezuela.** Alertas Epidemiológicas 2004 y 2005. <http://www.msds.gov.ve/msds/index.php>.
18. **Mehlhorn A, Sucher B.** An overview of bacterial meningitis. *US Pharm* 2005; 30(8): 3-12.

19. **Williams AJ, Nadel S.** Bacterial meningitis: current controversies in approaches to treatment. *CNS Drugs* 2001; 15:909-919.
20. **Meneses DFO, Rodríguez AEP.** Meningoencefalitis bacterianas en Cuba. *Rev Cub Hig Epidemiol* 2001; 39(2):86-94.
21. **Kahlon J, Chatterjee S, Lakeman FD.** Detection of antibodies to herpes simplex virus in the cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis* 1987; 155:38-44.
22. **Anderson M.** Management of cerebral infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56: 1243-1258.
23. **Lipton JD, Schafermeyer RW.** Central nervous system infections: the usual and the unusual. *Ped Emergencies* 1995; 13: 417-443.
24. **Linde A, Klapper PE, Monteyne P.** Specific diagnostic method for herpesvirus infections of the central nervous system: a consensus review by the European Union Concerted Action on virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Diagn Virol* 1997, 8: 83-104.
25. **Davies NWS, Brown LJ, Gonde J, Irish D, Robinson RO, Swan AV, Banatvala J, Howard RS, Sharief MK, Muir P.** Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:82-87.
26. **Bell J.** The Polymerase chain reaction. *Immunology Today* 1989; 10:351-356.
27. **Mullis KB.** The unusual origin of the polimerase C reaction. *Sci Am* 1990; April:36-43.
28. **Eisenstein BI.** The polymerase Chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 18:178 -183.
29. **Briese T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Zhiqianq L, Neil R, Kappor V, Casas I, Pozo F, Limberger R, Brena PP, Jingyue J, Lipkin WI.** Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(2): 310-313.
30. **Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM.** Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 1997; 66:39-50.
31. **Albert J, Fenyo EM.** Simple, sensitive and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by Polymerase Chain Reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1560-1564.
32. **Olov G, Raden UB, Gustafsson A, Albert J, Albino P, Andreasson PA, Naucler A, Biberfeld G, Wadell G.** Improved detection of HIV-2 DNA in clinical samples using a nested primer-based polymerase chain reaction. *J Adq Imm Deficiency Syndr* 1992; 5(3):286-293.
33. **Fuentes I, Rodríguez M, Domingo C, Del Castillo F, Juncosa T, Alvar J.** Urine sample used for congenital toxopasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2368-2371.
34. **Del Portillo P, Thomas M, Martínez E, Marañón C, Valladares B, Patarroyo M, López M.** Multiprimer PCR system for differential identification of Mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1996; 34:324-328.
35. **Deng S.** Detection by PCR and differentiation by RFLP of *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Micoplasma* y *Ureaplasma*, based upon 16S RNA genes. *PCR. Methods Appl* 1992; 1:202-204.
36. **Banfi PA.** Encefalitis ¿Cuáles y como tratar? *Rev. Chil. Infectol* 2003; 20(Supl 1): S28-S33.
37. **Sarmiento L, Mas P, Goyenechea A., Palomera R., Morier L, Capó V, Quintana I, Santin M.** First epidemic of Echovirus 16 meningitis in Cuba. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:887-889.
38. **Gomes MLC, Kopecka H, Lindares AC.** Detection of Enterovirus in cases of neurological disorders in the state of Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; 43(6):321-324.
39. **Colmenero DJ, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P.** Real Time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:1025-1027.

40. **Echevarria JM, Casas I, Tenorio T, de Ory F, Martinez MP.** Detection of varicella-zoster virus specific DNA sequences in cerebrospinal fluid from patients with acute aseptic meningitis and no cutaneous lesions. *J. Med Microbiol* 1994; 43: 331-335.
41. **Gozlan J, Amrani ME, Baudrimont M.** A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS. *AIDS* 1995; 9:253-260.
42. **Fong IW, Briton CB, Luinstra KE, Toma E, Mahony JB.** Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1995; 33:484-485.
43. **Liu PYF, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS.** Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology* 1994; 44:1161-1164.
44. **Robart HA.** Nucleic acid detection systems for enterovirus. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:156-168.
45. **Harbin AM, Yeager AS, Bruhn FW, Grossman M.** Neonatal herpes simplex infection in the absence of mucocutaneous lesions. *J Pediatr* 1982; 100:715-721.
46. **Samuelson A, Skoog E, Forsgren M.** Aspects on serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA. *Serodiagn Immunother Inf Dis* 1990; 4:395-406.
47. **Glass JD, Wesselingh SL.** Microglia in HIV-associated neurological diseases. *Microsc Res Tech* 2001; 54(2):95-105.
48. **Power C; Gill MJ; Johnson RT.** Progress in clinical neurosciences: The Neuro-pathogenesis of HIV infection: Host-virus interaction and impact of therapy. *The Can J Neurolog Sc* 2002; 29(1):19-32.
49. **Teja VD, Talasila SR, Vemu L.** Neurological manifestations of HIV infection: an Indian hospital-based study. *AIDS Read* 2005; 15(3): 139-143.
50. **Mirdha BR.** Status of *Toxoplasma gondii* infection in the etiology of epilepsy. *Journal Ped Neurol* 2003; 1(2):95-98.
51. **Goto M, Takahashi T, Kanda T, Iwamoto A.** Detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-1-infected Japanese patients with focal neurological signs. *J Int Med Res* 2004; 32(6):665-670.
52. **Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chioccola VL.** PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4765-4768.
53. **Parmley SF, Goebel FD, Remington KS.** Detection of *Toxoplasma gondii* in Cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (1):3000-3002.
54. **Kulkarni SP, Jaleel MA, Kadival GV.** Evaluation of an in-house-developed PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis in Indian children. *J Med Microbiol.* 2005 54(Pt 4):369-373.
55. **Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S.** Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51(3): 165-171.