

Enterovirus asociados a Afecciones del Sistema Nervioso Central confirmados por biología molecular

>>> Un alto porcentaje de las meningitis asépticas son causadas por enterovirus (EV), arribar rápidamente al diagnóstico correcto evita, aplicación de tratamientos innecesarios, disminución del tiempo de internación y sobre todo de complicaciones. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en LCR, es el método gold estándar.

>>> AUTORES

Carmen Portillo (1), Eugenio Báez (2), Martin Agüero (3), Wilfrido Coronel (4), Gloria Samudio (5)

(1) Laboratorio Portillo. Asunción, Paraguay, (2) Sanatorio Migone. Asunción, Paraguay, (3) Centro Médico La Costa. Asunción, Paraguay, (4) Hospital Central-Instituto de Previsión Social. Paraguay, (5) Gran Hospital Nacional. Itagua Paraguay

>>> CORRESPONDECIA

Carmen Portillo. Bioquímica, Directora del Laboratorio Portillo
Email: portillolab@gmail.com

Artículo Original

>>> RESUMEN

Aproximadamente 90% de las meningitis asépticas son causadas por enterovirus (EV), miembro de la familia de los picornavirus. Los EV son ubicuos, se diseminan por vía fecal-oral y contacto directo, responsables de brotes o casos esporádicos con importante morbilidad. El diagnóstico se basa en la presentación clínica, imágenes, estudio citoquímico del líquido cefalorraquídeo (LCR) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), gold estándar que reemplaza al aislamiento viral y la serología. El objetivo de este estudio descriptivo de corte transversal fue determinar la presencia de EV por RT-PCR en el LCR de pacientes con sospecha clínica de meningitis aséptica, internados en servicios públicos y privados de Asunción y departamento Central del Paraguay de noviembre de 2007 a




NextLAB[®] ¹⁰
 ELEVA SU POTENCIAL

Celebrando 10 años de liderazgo

Microbiología.
 Conectividad con instrumentos.
 Business intelligence.
 Tótem de autogestión.
 Conector H.I.S.
 Integración con la Web.
 Publicación de resultados.

MIC[®]

CON[®]

BIS[®]

TUR[®]

CNT[®]

WEB[®]

PUB[®]

noviembre de 2014. El material genético fue extraído mediante el mini kit ADN y ARN Qiagen® que fue sometido a RT-PCR. Se incluyeron LCR de 203 pacientes, 124 (61%) niños (4 días-15 años) y 79 (39%) adultos (16-81 años). Setenta y siete (38%) provenían de servicios públicos y 126 (62%) de privados; 115 (57%) fueron varones. Se detectó RNA de EV en 166 (82%) pacientes, 90 niños y 76 adultos, y mayor número de casos entre los meses de octubre a abril. Este es el primer trabajo en el país y muestra una importante participación del EV en pacientes por infecciones del SNC compatibles con meningitis asépticas de etiología viral. La sospecha clínica fue mayor en niños, sin embargo, la proporción de resultados positivos fue mayor en adultos. Se observó mayor circulación en los meses cálidos.

Palabras clave: enterovirus, meningitis, PCR, Paraguay.

>>> INTRODUCCIÓN

Las infecciones del sistema nervioso central causadas por virus, aunque no son frecuentes tienen importancia debido a su gravedad, constituyendo una emergencia pediátrica ya que su rápido diagnóstico y manejo son decisivos en el pronóstico y seguimiento de la evolución. Entre ellas, la meningitis y encefalitis son cuadros agudos más frecuentes.

Los virus son agentes de reconocida prevalencia en el líquido cefalorraquídeo (LCR) claro o aséptico, compatible con meningitis (inflamación meníngea del espacio subaracnoideo) asociándose en 90% a enterovirus humanos (EV), tanto en niños como en adultos, sin predominio de género (1).

El género Enterovirus perteneciente a la familia de los Picornavirus son virus ARN de menor tamaño, con más de 100 serotipos, ubicuos y de diseminación fecal-oral, siendo el tracto alimentario, la principal puerta de entrada por contacto directo o indirecto con manos o aguas contaminadas. El periodo de incubación es de 7 a 14 días y las personas con infección subclínica pueden eliminarlos en las heces por varias semanas y en faringe por 1 a 2 semanas (2). Son

responsables de brotes o casos esporádicos, que varían según la época del año, la localización geográfica, edad y el nivel socio-económico. En países templados se observan frecuentemente en las estaciones cálidas, pero en los tropicales durante todo el año, siendo los Coxsackie B5 y los Echovirus 4,6,9,11 y 30, los que producen las meningitis con frecuencia y con importante morbilidad (3). Entre ellos podemos mencionar a Estados Unidos de Norteamérica, donde probablemente causen alrededor de las tres cuartas partes de todos los casos de meningitis viral notificados. En México constituyen causa importante de meningitis viral y son responsables del 80-90% de las Encefalitis, en lactantes y menores de 5 años, identificándose los Coxsackie B5, B2, B4, B3, B1 y los Echovirus 11, 9, 30, 4, 6, 3, 7, 5 y 21 (5). En Japón, se reportó el Echovirus tipo 9 en 1990 y en Alemania, un brote en 21 niños por Echovirus tipo 30, con una tasa de ataque de 24%, en 1997. En países de nuestra Región, la Argentina reporto casos desde el 1983 asociado a los Coxsackie B1, B3 y B5, así como a los Echovirus 11, 21 y 25 (8).

Más del 90% de las afecciones por los enterovirus pueden ser asintomáticas y los cuadros varían desde el síndrome pie-mano-boca hasta pericarditis y meningitis. Otro aspecto importante de la etiología de los enterovirus son las infecciones neonatales, que se adquieren de la madre o por transmisión nosocomial. La frecuencia con que se aísla un determinado serotipo varía marcadamente, ya que algunos se detectan por varios años produciendo epidemias y luego desaparecen en la siguiente estación.

El diagnóstico de la meningitis viral se basa en la presentación clínica, que generalmente es aguda con signos meníngeos, imágenes, el estudio citoquímico del líquido cefalorraquídeo, junto a la identificación del agente etiológico. La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), actualmente se constituye en el Gold Standard, reemplazando así al aislamiento viral y serología debido su rapidez, sensibilidad (100%) y especificidad del 95-100% (4). La más utilizada es la RT-PCR genérica que detecta todos los serotipos de Enterovirus al amplificar la región 5' NC, más conservada del genoma (5). La PCR permite diferenciarlas del Virus Herpes Simple, posibilitando el

manejo clínico con tratamiento de soporte general, suspendiendo el antiviral (Aciclovir) instaurado, ya que el cuadro es auto limitado, se resuelve en cinco a siete días, disminuyendo los días de internación, así como el costo de atención (6)

En nuestro país los primeros datos disponibles sobre la participación de los Enterovirus en pacientes hospitalizados por serología (IgG e IgM) fueron reportados por Portillo et al. en el 2004 (7). El objetivo de este estudio fue identificar al EV por PCR en el LCR de pacientes con sospecha clínica de meningitis asépticas, internados en diferentes servicios públicos y privados, de Asunción y Departamento Central de noviembre de 2007 a noviembre de 2014.

>>> MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio descriptivo de corte transversal realizado desde noviembre del 2007 a noviembre

de 2014 e incluyó las muestras remitidas al laboratorio de líquidos cefalorraquídeos de pacientes de todas las edades, internados en diferentes servicios públicos y privados del país bajo la sospecha clínica de meningitis por EV por manifestar signos meníngeos y un estudio citoquímico aséptico o a líquido claro.

La extracción de material genético se realizó con el mini kit ARN de Qiagen® utilizando 200 µl de muestra, seguido de una RT con 5 µl del ARN obtenido mediante el Kit MMLV y RNAsout de Invitrogen®, llevándolos en el termociclador Mastercycler Personal Eppendorf® a 37°C por 45 min y posteriormente a 94°C por 10 minutos.

En la PCR se realizó la amplificación de la región 5 no codificante pero muy conservada para los EV de acuerdo al protocolo modificado de Giacca (1993) (7) en 50 µl de volumen final con la Taq DNA Polimerasa recombinante de Invitrogen®, una primera ronda de 45 ciclos de 94°C por 1

Análisis multidisciplinarios de alta complejidad.

Clínico humano
Bromatológico
Veterinario
Agronómico
Bioanalítica
Industrial y Medio Ambiente

De Bahía Blanca para todo el país.

IACA
LABORATORIOS
www.iaca.com.ar



min, 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos y una extensión final de 68°C por 3 min. Del producto obtenido se tomaron 1 ul para la segunda ronda con 35 ciclos de 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 49°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 min, también a un volumen de 50 ul. Los primers CX3, CX8, CX9 Y CX10 utilizados fueron sintetizados por Invitrogen® y detectaron unos productos de 230 - 120 pb, visualizados en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El límite de detección fue de 5 copias/ml y los controles positivos que fueron gentilmente proveídos por el Instituto Carlos Malbrán Argentina. Todo este protocolo se pasó a tiempo real, desde el 2011 utilizando el equipo Rotor gene® y los Iscript Selectc DNA Synthesis Kit y Master mixSso Fast Eva Green Supermix de Bio Rad respectivamente.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva calculándose las frecuencias y los porcentajes de enterovirus hallados y su distribución por año, estación y edad.

Aspectos éticos

El estudio es retrospectivo de revisión de fichas de pacientes que tuvieron indicación de estudio laboratorial para su diagnóstico. Se preservó la identidad de los pacientes utilizando solo códigos garantizando así el anonimato en los resultados.

>>> RESULTADOS

Se incluyeron muestras de LCR de 203 pacientes internados con sospecha de meningitis por enterovirus por el reporte de un citoquímico (aséptico) compatible con etiología viral, de ellos 124 (61%) fueron de niños con edades comprendidas entre 4 días a 15 años y un 79 (39%) de adultos de 16-81 años. Setenta y siete pacientes (38%) provenían de servicios públicos y 126 (62%) de privados; 115 (57%) fueron del sexo masculino y 88 (43%) del sexo femenino.

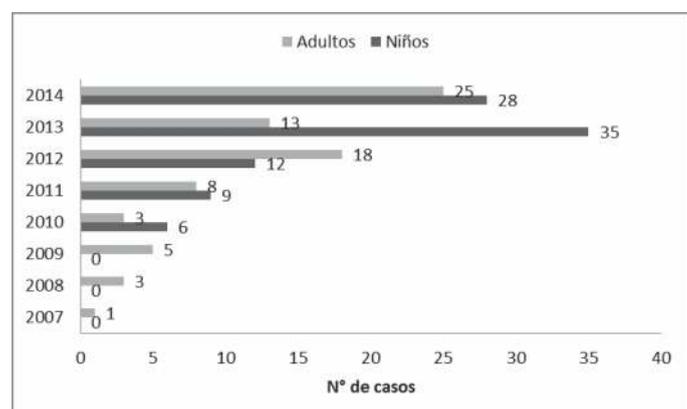
En 166 de los LCR se detectó el ARN del

Enterovirus con un 82% de positividad, diagnosticándose así meningitis viral afectando principalmente niños (Figura 1), en 90 casos (54%) niños y a 76 (46%) adultos, siendo el menor de 4 días y el mayor de 81 años.

>> **Tabla 1.** Pacientes con sospecha de meningitis por enterovirus. Paraguay 2007-2016. n: 203

n: 203			
Características		Nº de muestras	%
Edades	Menores de 1 año	33	16
	1 a 5 años	95	47
	6 a 10 años	54	27
	11 a 15 años	21	10
	1 a 15	173	85
	16 a 30	47	23
	31 a 45	23	11
	46 a 60	8	4
	61 a 75	6	3
Sexo	Femenino	88	43
	Masculino	115	57
Procedencia	Privado	126	62
	Publico	77	38

>> **Figura 1.** Enterovirus detectados por grupo etario. Paraguay, 2007-2014. n:166



En cuanto a la distribución por sexo, los EV se detectaron en 101 varones (61%) y en 65 mujeres (39%). En su mayoría correspondieron a pacientes internados en diferentes servicios del sector privado 111 (62%) y en el público 56 (38%).



PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

/ Biología Molecular / Hematología y Hemostasia / Microbiología / Endocrinología
/ Citometría de Flujo / Inmunoserología / Química Clínica / Virología



Consultar alcance en
www.oaa.org.ar



RIQAS



PLANTA DE LABORATORIO
Av. Scalabrini Ortiz 676

DPTO. COMERCIAL
4858-7061 al 63
laboratorio@stamboulian.com.ar

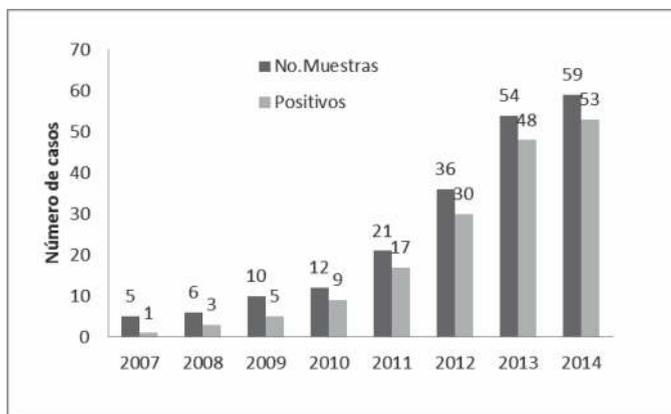
2206-6000

WWW.STAMBOULIAN.COM.AR

STAMBOULIAN
SERVICIOS DE SALUD

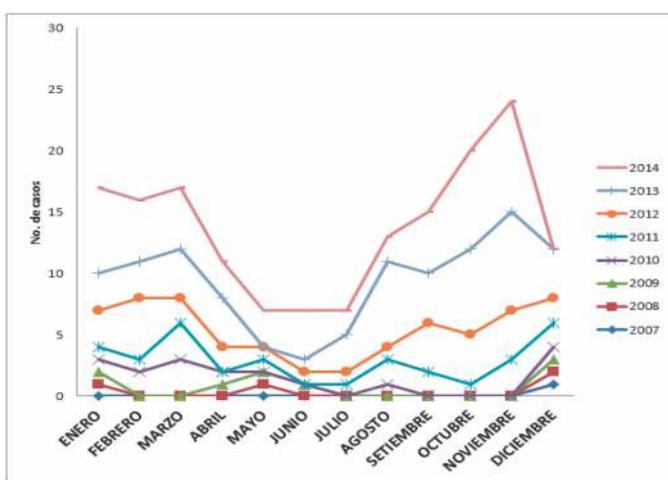
La distribución los casos positivos detectados por año mostró un aumento gradual coincidente con el aumento del número de muestras estudiadas, pero con un 50% como mínimo en cada año, tal como lo muestra en la siguiente Figura 2.

>> **Figura 2.** Enterovirus en infecciones del SNC. Paraguay, 2007-2014 n: 203



En cuanto a la distribución estacional, desde el 2011, se observaron más detecciones de casos positivos de octubre a abril, coincidentes con los meses más calurosos en el país, tal como se observa en la Figura 3.

>> **Figura 3.** Distribución mensual de los Enterovirus. Paraguay, 2007-2014. n: 166



>>> DISCUSIÓN

Este primer estudio en el país, con un periodo de 7 años, confirmó un 82% de participación del EV mediante la PCR, en pacientes internados en diferentes servicios, con sospecha de meningitis agudas asépticas de etiología viral. En todos los años el predominio fue de niños

(54%), que se observó claramente en el 2013 con 35 casos (65 %) de 54 muestras, aunque este fue el grupo mayoritario analizado, constituyéndose así estos datos en la línea de base nacional.

Los casos de meningoencefalitis afectan en primer lugar a lactantes, lo que se reflejó en nuestra casuística que incluyó a niños desde 4 días de vida, quienes generalmente aún tienen el sistema inmunológico débil, por lo requieren de un diagnóstico oportuno que les garantice la vida. Luego los mayores de 15 años, que constituyen población activa y por último al grupo de los adultos mayores, prácticamente inmunosuprimidos (19), con un paciente de 81 años de edad en este grupo.

Asumiendo que esta etiología viral es difícil de predecir basados únicamente en la presentación clínica y el citoquímico del LCR, el 82% por PCR aportó un diagnóstico rápido y confiable (14).

Esta PCR, que utilizó una región muy conservada del genoma entre diversos genotipos de enterovirus (18), posibilitó la identificación rápida de ARN de enterovirus en los casos sospechosos de meningitis aséptica, permitiendo la disminución del tiempo de internación, las complicaciones secundarias (extravasación de la canalización e infecciones nosocomiales) y el uso de antibióticos innecesarios, así como el Acyclovir (16).

Se observó un mismo patrón de circulación de EV todos los años, pero con más actividad en los meses calurosos, más claramente desde el 2011 (81%) coincidente con el incremento de muestras analizadas, lo que indica además la utilidad de esta nueva herramienta diagnóstica, ya que la PCR fue asumida gradualmente por los médicos mejorando así el manejo clínico del paciente.

La participación de los enterovirus en nuestro país fue similar a la registrada en Perú con 83,3% en las meningitis agudas asépticas y en 38,8% en las encefalitis en población pediátrica, también con comportamiento estacional, frecuente en los climas cálidos y en Panamá con un 73%, entre 1998 y 1999 (17).

Entre el periodo de 2007 a 2014, los porcentajes de positividad de EV fueron de un 50% o más, confirmando que en nuestro país circulan en todos los años y además se correlacionaron con lo observado en Argentina entre el 2005- 2008 que reportó un 70 % (8) y que luego en el 2005 - 2010 disminuyó a un 42 % (11,12). En Salvador, Bahía la frecuencia de enterovirus detectados fue de 37,7% en el año 2002 (15).

Sin embargo, fueron muy elevadas en comparación a la casuística del Brasil, en Rio de Janeiro con un 11%, entre el 2005-2006 (9), en Uruguay con un 10% por el grupo de Burgeño A, en el 2009-2010 (10) y la casuística en Colombia, Armenia mostró un 10% de detección de enterovirus por PCR también en niños (18). También un estudio multicéntrico europeo de Vliet en 1993 (23), mostró 24,5% de detección por esta metodología comparada con el aislamiento en cultivo que fue solo de 7,5%.

En cuanto a que la mayoría de las muestras (62%) provenían de servicios privados, esto se relacionaría, por un lado, con que en el Servicio Público se prioriza la búsqueda de HSV por su gravedad y la necesidad de iniciar el tratamiento con Aciclovir y, por otro lado, a los limitados recursos económicos del paciente hospitalario generalmente, puesto que esta metodología aún no está disponible en los hospitales públicos.

Es indiscutible la ventaja que aporta el diagnóstico viral rápido mediante la PCR, en una enfermedad que, aunque benigna, no tiene un tratamiento antiviral específico, tiene un inicio agudo y preocupante. Por tanto, tiene sus beneficios no solo para el paciente sino en la comunidad por su impacto en la economía de la salud, al disminuir el consumo de antibióticos como la disminución de la resistencia (20)

Si bien el 82% de HEV observado fue elevado y aún falta analizarlo en detalle, sirven para considerar que es una patología importante en nuestro país porque se registran anualmente, causando morbilidad debido a que todas ellas requirieron internación y sería conveniente analizar si hay relación con la calidad y tipo de las aguas a la que accede la población u otra fuente de

transmisión a fin de disminuirlas (22).

También es importante considerar que la PCR anidada no permitió la diferenciación entre los diferentes enterovirus, por lo que requirió de modificaciones al pasarlas en tiempo real, pero que es imperiosa, la implementación de la Genotipificación a fin de conocer y diferenciar el serotipo circulante en cada temporada (13,21).

>>> CONFLICTO DE INTERESES

Este trabajo se realizó con financiación propia y en ausencia de conflicto de intereses.

>>> BIBLIOGRAFÍA

- Banfi A, Avendaño L. Virus y sistema nervioso. En: Avendaño L.F. *Virología clínica*. 1ª ed., Chile: Mediterráneo, 2011:195-12.
- Novillo A. Familia Picornaviridae. En: Carballal G., Oubiña J. *Virología Médica*, 2ª. Ed., Buenos Aires: El Ateneo, 1996: 213-21.
- Freire C, Cisterna D. Enterovirus. En: Savy V, Candurra N. *Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico rápido*. 1ª Edición, Argentina; Sociedad Argentina de Virología – AAM, 1998: 97-04.
- Freire MC. Enterovirus. Carballal G, Oubiña J. *Virología Médica*. 4ª. Edición, Argentina; Corpus; 2015: 339-46.
- Rosete SEM y cols. Encefalitis Viral. *Rev de Enf. Inf en Ped*. 2005; 74 (X) IX: 43-51.
- Giacca M. Et al. Nested Polymerase Chain Reaction for High-Sensitivity Detection of Enteroviral RNA in Biological Samples. *J. of Microbiol*, 1993 May; 5(31):1345-9.
- Portillo C, Báez E, Arbo M, Nuñez D. Prevalencia de Enterovirus en pacientes hospitalizados en Asunción (1999.2003). Resumen de temas libres IV Congreso Paraguayo de Infectología. *Rev Parag. Infec*. 2003;35.
- Palacios G, Cisterna D, Freire MC, Cello J. RT- Nested PCR for the detection of enterovirus in biological samples from patients with suspected enteroviral infections. *Rev Arg Microbiol* 2000; 32:165-72.
- Svartz A. y cols. Utilidad en la Detección de Enterovirus en Meningitis Viral en Pediatría. *Rev Arg de Virol* 2008;1(40):
- Vidal et al. Enterovirus as Etiologic agent of Meningitis, Southern Brazil. *Rev. Arg. de Virol*. 2011; 1(43):86.
- Burgeño A y cols. Investigación de agentes virales asociados a casos de Meningoencefalitis a líquido claro en el sistema de vigilancia epidemiológica de Uruguay. *Rev. Arg. de Virol*. 2011;1(43): 93.
- Lema C y cols. Enterovirus asociados a Enfermedades neurológicas en Argentina durante el periodo de 2005-2010. *Rev. Arg. de Virol*. 2011;1(43): 94.
- Svartz A. y cols. Importancia del Diagnóstico Etiológico molecular en Meningoencefalitis virales. *Rev. Arg. de Virol*. 2011;1(43):75.
- Cisterna D y cols. Caracterización molecular de Echovirus 4 causante de un extenso brote de Meningitis en Argentina. *Rev. Arg. de Virol*. 2011;1(43): 93.
- Nieto J, Castrejon MM, Saenz-Llorens X. Características de la Meningitis Enteroviral en niños: Es posible predecir su etiología. *Rev. Med. Cient*; 2(14):8-11.
- Silva H, Tanajura M. et als. Aseptic meningitis síndrome due to enteroviruses and Leptospiras in children of Salvador, Bahia. *Rev. da Soc. Bras. de Med.Trop*. 2002 mar-ap;35(2):159-65.
- Espinosa I. et als. Infecciones del Sistema Nervioso Central por Enterovirus en Niños atendidos en un Hospital de Lima. *Perú. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública* 2011; 28(4): 602-9.
- Armenta S, López Silva S. Diagnóstico molecular de las Infecciones virales del Sistema Nervioso Central. *Bioquímica*. 2004 oct-dec; (25):109-15.
- González M, Giraldo A, Quintero L, Padilla L, Sarmiento L, Castaño J. Prevalencia de enterovirus en recién nacidos y lactantes que consultaron a un centro de atención de primer nivel, Armenia, Colombia. 2009. *Biomédica* 2011; 31:545-51.
- Torres L, Rojas Y, Govia Y, Sequera M. Diagnóstico Molecular de la Meningoencefalitis Viral. Utilidad Clínica de las Pruebas. *Informe Médico*. 2014; 16(1):27-30
- Merovitz BSL, Demers AM, Newby DMD, Mc Donald JMD. The enterovirus 71 infections at Canadian center. *Ped. Infect. Dis. Jour*. 2000; 19:755- 57
- García-Elorriaga G, Esparza García A, Méndez Rojas C, del Rey Pineda G, González Bonilla C. Estandarización de la RT PCR en LCR de pacientes pediátricos con infección de sistema nervioso central por enterovirus. *Rev. Inv.Clin*. Jan-Feb 2012; 1(64):59-66.
- Vliet KE van, Glimaker M, Lebon P, Klapler PE, Taylor CE, Ciardi M, et al. Multicenter evaluation of the Amplicor enterovirus PCR test with cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *J. of Clin. Microb*. 1998; (36): 2652-7.