

DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL POR VIRUS HERPES SIMPLEX

Concepción Gimeno, José L. Pérez

Servicios de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia y Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat)

Las infecciones del sistema nervioso central (SNC) por los virus del herpes simple (VHS) tienen una morbilidad significativa y se asocian con una mortalidad elevada. Pueden dividirse en tres categorías: a) infecciones neonatales causadas en gran parte por el VHS tipo 2 (VHS-2), b) encefalitis herpética en niños mayores de tres meses y adultos, originadas en su mayoría por el VHS tipo 1 (VHS-1) y c) meningitis aséptica recurrente o síndrome de Mollaret, asociada generalmente con el VHS-2.

La infección neonatal es la consecuencia más grave de la infección genital. En EEUU presenta una incidencia de 1:3.500 a 1:5.000 partos. Clínicamente, puede manifestarse bajo la forma de una localización cutánea, ocular y oral, como una encefalitis o como una infección diseminada. La mortalidad de la infección diseminada es superior al 70%, reduciéndose con la instauración de una terapia adecuada. No existen cifras concretas sobre lo que representa la infección neonatal en nuestro país. Algunos datos sugieren que la prevalencia del herpes genital en la población podría ser menor que la de EEUU, por lo que cabría esperar algo similar para la infección neonatal.

La encefalitis en los adultos afecta, fundamentalmente, a los lóbulos temporal medio y frontal inferior, produciendo necrosis de estas zonas. Clínicamente aparece como un proceso encefálico focal asociado con alteración de la conciencia a distintos niveles, fiebre, convulsiones y hemiparesia (en aproximadamente un tercio de los pacientes). Es compatible con el cuadro presentado en la historia clínica que acompañaba a este control. Debido a que no existe ningún signo o síntoma clínico que sea patognomónico de encefalitis herpética, la instauración de una terapia empírica ha sido la norma hasta fechas recientes. Dicha norma comienza a reconsiderarse a partir del momento en que los nuevos métodos diagnósticos demuestran su aplicabilidad real en la práctica diaria de los laboratorios. La incidencia estimada en EEUU oscila entre 1:250.000 y 1:500.000 personas/año.

La meningitis de Mollaret es una forma leve de meningitis aséptica recurrente. Cada episodio dura unos días y puede recurrir en un período de meses o años. Aparece en las mujeres sexualmente activas que tienen episodios previos de reactivación del herpes genital. El episodio de meningitis puede coincidir, hasta en un 39% de los casos, con la presencia de lesiones en la zona genital.

PATOGENIA

La **patogenia** de las infecciones del SNC asociadas a los herpesvirus no está clarificada. Es conocido el tropismo de los VHS por las células nerviosas periféricas y centrales. Algunos estudios demuestran que las bases moleculares del neurotropismo residen en la presencia de regiones invertidas del genoma y otros en zonas del gen de la timidina kinasa (TK). Contrariamente, Lee *et al.* (1999), estudiando un segmento de 335 pb del gen de la TK, concluyen que la detección de polimorfismo en ese fragmento, que había sido descrito previamente como indicativo del neurotropismo, no puede ser interpretado como tal. Otros estudios, también recientes, demuestran que el gen γ_1 34.5, situado en las regiones invertidas de la región única larga (UL) del genoma de los VHS, modula de forma significativa la neurovirulencia, perdiéndose la misma si se produce una delección en esa zona o si se inserta un codón de parada.

También la respuesta del hospedador a la infección juega un papel destacado, fundamentalmente la interleuquina 6 (IL-6), cuya liberación es inducida por los VHS. Al igual que en otras infecciones hay otros factores implicados que pueden condicionar la susceptibilidad del individuo a un determinado microorganismo. Así, se ha demostrado que, en los pacientes con meningitis de Mollaret, existe un polimorfismo natural, que da como resultado un cambio de arginina por cisteína en el codón 52 del hexón 1 del gen MBL (*Mannose-Binding Lectin*) y una influencia hormonal de VHS-2 en el balance de la respuesta de citoquinas Th1/Th2.

DIAGNÓSTICO

El **diagnóstico** correcto de estas infecciones es esencial, puesto que la instauración precoz de un tratamiento adecuado disminuye de forma significativa la mortalidad. Por lo general, se basa en la sospecha clínica, que puede estar facilitada en los casos de infección neonatal por la presencia de lesiones cutáneas vesiculares y, en los casos de meningitis recurrente, por la observación de lesiones genitales. En el electroencefalograma se pueden observar picos y ondas lentas localizadas en la región temporal; con la tomografía axial computarizada se observan lesiones radiotraslúcidas con edema o hemorragia, siendo la resonancia magnética nuclear la técnica de imagen más útil para el diagnóstico.

Durante mucho tiempo, el método de referencia ha sido el aislamiento del virus a partir de la biopsia cerebral. Otra de las técnicas usadas anteriormente era la detección del antígeno específico mediante inmunofluorescencia en este tipo de muestra. Sin embargo, las características invasoras de la craneotomía, la práctica generalizada de la administración de tratamiento empírico con aciclovir ante un caso sospechoso, así como la aparición de técnicas con buena sensibilidad partiendo de muestras más fáciles de conseguir, como el líquido cefalorraquídeo (LCR), ha hecho que el diagnóstico por biopsia haya caído en desuso.

El cultivo del LCR es muy poco sensible y no permite, en la mayoría de los casos, el aislamiento del virus. La detección de

antígeno a partir de las células del LCR tiene escasas sensibilidad y especificidad. De ahí que las técnicas de detección de anticuerpos específicos a partir de LCR hayan sido muy usadas hasta la introducción de las técnicas moleculares. Estas técnicas inmunológicas se basan en la detección de un incremento en el título de anticuerpos en el LCR o, preferiblemente, en el incremento de la relación de anticuerpos entre el suero y el LCR (mayor o igual a 20) como consecuencia de la síntesis intratecal de aquéllos. De esta manera, es posible diagnosticar hasta un 80% de los casos. Dos problemas se atribuyen a estos métodos: por un lado, la tardanza en la aparición de anticuerpos, lo que hace que se considere un diagnóstico retrospectivo (de confirmación de otros métodos) que no permite instaurar un tratamiento precoz; por otro lado, se ha documentado un aumento en el título de anticuerpos en el LCR también en los casos de fiebre y alteraciones mentales que acompañan a la reactivación de lesiones orolabiales, así como en los casos de alteración de la barrera hematoencefálica de etiología no herpética.

Cinco años después de la descripción de la metodología de la PCR, Powell *et al.* (1990) y posteriormente Rowley *et al.* (1990), refirieron la primera aplicación clínica de la PCR al diagnóstico de la encefalitis herpética. Desde entonces, esta técnica no sólo ha permitido el diagnóstico, sino la secuenciación completa del genoma de los VHS, el conocimiento de datos moleculares implicados en la neurovirulencia, la respuesta del hospedador frente a los VHS, la correlación genotípica y fenotípica de la resistencia a los antiviricos, el potencial de reducción de la instauración empírica de la terapia con aciclovir, etc., entre otros aspectos.

La detección de DNA de los VHS por PCR ha sido, probablemente, el prototipo de aplicación del diagnóstico molecular en la práctica asistencial del laboratorio. Fue el estudio clásico llevado a cabo por Aurelius *et al.* (1991), que permitió la detección de estos virus en 42 de 43 pacientes con encefalitis herpética confirmada, el pilar en que se ha basado su uso clínico. Posteriormente, Whitley y Lakeman, en 1995, revalidaron dicho uso. Detectaron DNA de los VHS en el LCR de 53 de 54 pacientes (98%) con encefalitis herpética diagnosticada por biopsia. Este hallazgo se produjo en todas las muestras, incluso en aquéllas que habían sido obtenidas antes de llevar a cabo la biopsia. Asimismo, fue también significativo que el DNA pudiera detectarse en 4 de 19 muestras de LCR obtenidas hasta dos semanas después de la instauración del tratamiento con aciclovir. Además, este grupo detectó tres casos de PCR positiva en 47 pacientes con sospecha clínica de encefalitis herpética y cuya biopsia fue negativa por cultivo, atribuyendo este hecho a que la biopsia no fue tomada del lugar adecuado. Comprobaron, además, que la detección de DNA de VHS por PCR en estas muestras se asociaba de forma significativa con imágenes neurológicas focales. Los resultados falsos negativos se atribuyeron a la presencia de inhibidores en la muestra. Estos autores concluyeron que la sensibilidad de la PCR en muestras de LCR era superior al 95% en el momento de la presentación clínica, con una especificidad del 100%.

ASPECTOS PRÁCTICOS DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL VHS

El LCR se recoge mediante punción lumbar. Se recomienda obtener, al menos, 0,5 ml de muestra, que se remitirá al laboratorio en un tubo estéril. Aunque se recomienda el transporte a +4°C, es apropiado hacerlo a temperatura ambiente si se van a realizar cultivos bacterianos además de la PCR. Si la muestra se recibe congelada, es preferible no someterla a ciclos de congelación y descongelación.

Se han utilizado varios métodos de extracción del DNA, algunos de ellos comercializados. Idealmente, un proceso de extracción debería aislar, concentrar y purificar el DNA de los VHS presente en las muestras, liberándolas de inhibidores de la reacción de amplificación catalizada por la *Taq* polimerasa. En la práctica, deben evaluarse varios aspectos a la hora de seleccionar un método apropiado de extracción: tipo de muestra (algunas presentan gran cantidad de inhibidores como la sangre, orina, heces, etc., y deben ser sometidas a procesos muy agresivos), la cantidad disponible, la sensibilidad que se desea alcanzar, la necesidad de realizar varias pruebas a partir de la misma muestra, la toxicidad de los reactivos, la eficacia de la eliminación de inhibidores, el tiempo que dura el proceso de extracción y los equipos especiales que se necesiten con cada procedimiento. Éstos y otros factores han de ser sopesados siempre buscando una relación óptima entre esfuerzo técnico y beneficio clínico (por ejemplo, que el tiempo de respuesta sea clínicamente útil).

Algunos de estos métodos, como el IsoQuick, que utiliza el agente caotrópico isotiocianato de guanidinio se ha mostrado superior en un estudio comparativo a otros métodos, incluido la proteinasa K más fenol-cloroformo, proteinasa K y lauril sulfato de sodio, RNAsin y lauril sulfato de sodio, y cloruro de litio más urea 6M. En nuestra experiencia, la extracción con proteinasa K seguida de fenol-cloroformo y precipitación alcohólica aporta buenos resultados. Sin embargo, debido a la lentitud de este proceso y a la utilización de agentes tóxicos, como el fenol, ha sido sustituida por las columnas QiaAmp (QiaGen).

El estudio de estas variables es importante para valorar la sensibilidad y especificidad de un método de PCR. A modo de ejemplo, en un intento de realizar un control de calidad interlaboratorio entre dos centros universitarios de referencia suizos, se compararon los resultados de dos protocolos usados de forma habitual para la detección del DNA de los VHS en el LCR de 43 pacientes con sospecha de encefalitis herpética. Cada centro empleó un método diferente de extracción de ácidos nucleicos (tratamiento con proteinasa K seguido de inactivación por calor en un caso, digestión con proteinasa K seguida de purificación con columnas de gel de sílice en el otro) y un protocolo distinto de amplificación, usando una PCR en red o una PCR doble (*nested*), respectivamente. Los datos combinados de las manifestaciones clínicas y los estudios radiológicos y de laboratorio condujeron al diagnóstico de encefalitis herpética en 6 de los 43 pacientes estudiados, lo que supuso un 14%. Se obtuvieron resultados discrepantes entre los dos centros en 8 casos (18%); cinco de ellos eran falsos positivos y tres falsos negativos. Siete de los 8 resultados discrepantes se asociaron con el método de extracción que utilizaba la proteinasa K más inactivación por calor. Como puede desprenderse de estos resultados, se confirma la necesidad de una normalización metodológica y la conveniencia de establecer controles de calidad, tanto internos como externos.

Las regiones del genoma de los VHS que se han utilizado en las amplificaciones han sido también muy variadas. Se han amplificado al menos siete *loci*, distribuidos en la región U_L y en la U_S. Todos estas regiones codifican componentes estructurales, excepto una, la U_L23, que lo hace para la enzima timidín-quinasa (TK). La diferenciación entre los dos tipos de virus no se lleva a cabo en todos los casos, debido a la elevada homogeneidad entre ambos genomas. Sin embargo, se

recomienda realizarla, aunque sea solamente por un interés epidemiológico. Se han utilizado diversas técnicas para llevar a cabo la identificación de tipo, como la amplificación de regiones con un único punto de restricción diferencial, la PCR *nested* con iniciadores específicos, la PCR múltiple (con cebadores igualmente específicos para cada virus), la amplificación de una región común seguida de una hibridación con sondas específicas, la secuenciación directa del producto de amplificación y la PCR específica de alelo. Existen métodos comercializados que posibilitan dicha diferenciación mediante métodos de PCR múltiple, con buenos resultados. Así ha ocurrido en este control, aunque estos datos debieran evaluarse con un mayor número de muestras bien caracterizadas.

Por lo que se refiere a la detección de los productos de amplificación, el método más habitual consiste en la electroforesis sobre un gel de agarosa y observación de las bandas teñidas con bromuro de etidio, que se comparan con controles positivos sometidos al proceso analítico completo. La sensibilidad puede ser mejorada con la incorporación de técnicas adicionales, como el análisis *southern-blot* o la hibridación con sondas específicas seguida de una detección colorimétrica. De esta manera, puede conseguirse un aumento de sensibilidad de hasta 2 unidades logarítmicas, a la vez que se asegura la identidad del producto amplificado. Hoy en día, la tendencia es hacia la utilización de sistemas colorimétricos, tipo ELISA, para lo que existen diversos sistemas comercializados (PCR ELISA DiG Detection, Roche Diagnósticos; Gen-ETI-K, Sorin Diagnósticos, etc.). Casi todos ellos emplean el sistema biotina-digoxigenina-estreptavidina, con diversas variantes técnicas del conjugado enzimático. Al final, la lectura de la absorbancia permite hacer una interpretación objetiva. Algunos de los sistemas comerciales están diseñados para aplicaciones diagnósticas concretas, aunque existen otros que pueden emplearse como un procedimiento general de detección de productos de amplificación. La adopción de uno de estos últimos puede facilitar el diagnóstico de los diversos patógenos virales del SNC, cambiando tan sólo el proceso de amplificación específica.

El control de la contaminación cruzada de los productos de amplificación (*carryover*) debe ser fundamental en los laboratorios, puesto que la búsqueda de la máxima sensibilidad puede llevar consigo una menor especificidad. Por ejemplo, se puede realizar la inactivación fotoquímica de los productos amplificados mediante la adición de isoporaleno. El método más utilizado (comercializado por Roche Diagnostics) consiste en la inactivación del dUTP contenido en los productos de amplificación con la enzima uracil-N-glucosidasa, que reconoce y corta selectivamente los restos uracilo, previniendo la amplificación posterior de dichos fragmentos.

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Con independencia de las evaluaciones metodológicas a las que podemos someter a estas técnicas tan prometedoras, todavía quedan algunos aspectos que deben ser aclarados, antes de aplicarlas en la clínica. Dos factores parecen ser de la mayor importancia. En primer lugar, la sensibilidad de la PCR, determinada por la existencia de falsos negativos, que es un dato fundamental a tener en cuenta, tanto en aquellos centros donde el resultado de la PCR es definitivo para la instauración de una terapia, como en los que un resultado negativo condiciona la interrupción de un tratamiento empírico con aciclovir. En segundo lugar, el tiempo de respuesta del laboratorio pues, en ausencia de un resultado rápido, todas las virtudes teóricas de la PCR carecen de sentido.

Para evaluar la utilidad de la PCR de VHS en LCR en el diagnóstico y en la toma de decisiones posteriores en los pacientes con sospecha de encefalitis herpética, Tebas *et al.* diseñaron un modelo matemático que comparaba la posibilidad de iniciar el tratamiento, según el resultado de la PCR, con la administración empírica del aciclovir. Los datos de partida requeridos para el diseño del modelo eran la sensibilidad de la PCR (calculada en un 96% a partir de los datos publicados), la especificidad (99%), la prevalencia de la encefalitis herpética (que era de un 5% en el hospital de los autores del estudio), las consecuencias de la enfermedad (posibilidades de curación, muerte, secuelas graves y leves, etc.), y la media de la duración del tratamiento empírico (calculado en 5,3 días por estos autores). Los resultados del modelo de decisión fueron algo contradictorios en cuanto al pronóstico de los pacientes ya que, aunque en principio el modelo predecía mejores resultados con la administración empírica, la interrupción del tratamiento en los casos de encefalitis herpética mal diagnosticados y la mejora en la búsqueda del diagnóstico etiológico correcto en los casos de encefalitis con PCR negativa, hacían que el modelo, en condiciones conservadoras, se decantase por la alternativa de tratamiento guiado por los resultados de la PCR, reduciéndose además el uso del aciclovir en estos casos.

A modo de resumen, está fuera de duda el valor predictivo de un resultado positivo de la PCR de VHS, para lo que debemos buscar la máxima especificidad. En estas condiciones, la administración de antivirales debería ser mantenida durante el tiempo adecuado. Más interesante, y probablemente también más controvertido, es considerar el valor predictivo negativo de esta prueba. Siendo una práctica muy habitual la administración empírica de aciclovir endovenoso en los casos de sospecha clínica de encefalitis herpética, la prueba de PCR puede permitir reducir la administración innecesaria de esta droga. Para que este planteamiento sea útil en la práctica diaria, se deberán cumplir las dos condiciones expuestas al principio: búsqueda de la mayor sensibilidad y tiempo de respuesta reducido. Respecto a lo primero, es esencial que cada laboratorio someta su procedimiento a controles de calidad exigentes, siendo deseable disponer de un método que permita conocer, al menos de manera semicuantitativa la sensibilidad analítica del método. Por otra parte, y al margen de los beneficios que un buen diagnóstico tiene sobre el cuidado del paciente, los costes adicionales de la obtención de un resultado rápido "a la carta" mediante una PCR pueden quedar compensados fácilmente por el ahorro de la administración innecesaria de aciclovir, cuyo coste diario oscila entre 8000 y 10000 pesetas.

La posibilidad de llevar a cabo técnicas cuantitativas en nuestros laboratorios abre nuevas perspectivas en la aplicación clínica. Algunos resultados iniciales no mostraban correlación entre los niveles basales de DNA de VHS y la encefalitis herpética, debida a la infección primaria o a una recurrencia. Los títulos de virus no se relacionaban con la sintomatología clínica, ni predecían la evolución clínica, ni había diferencia entre pacientes tratados o no. Datos más recientes de otros autores, demostraron, sin embargo, que podría aplicarse un método cuantitativo de DNA para el seguimiento y control de la respuesta al tratamiento.

Aunque se ha detectado en algunos casos un aumento en los niveles de DNA tras cinco días de tratamiento, probablemente debido a la generación de muchos pequeños fragmentos de genoma cuando el virus se replica en presencia del aciclovir, sigue teniendo valor en la prospección a más largo plazo. Existen niveles detectables de DNA durante al menos 5-14 días y pueden persistir durante unos 30 días después de la aparición de la sintomatología. Domingues *et al.* han establecido en 100 copias de DNA/ μ l el nivel a partir del cual el pronóstico es peor, lo que puede tener aplicación clínica en un futuro no muy lejano.

OTRAS POSIBILIDADES DIAGNÓSTICAS DE LA PCR DE VHS

La PCR ha permitido la detección de la resistencia de los VHS frente al aciclovir, asociada a ciertas mutaciones en el gen de la TK vírica, lo que permite estimar la probabilidad de la respuesta *in vivo* al tratamiento. Sin embargo, la aplicación rutinaria de una técnica de este tipo depende de la demostración definitiva de la asociación entre las mutaciones genotípicas y la resistencia fenotípica. Sobre este aspecto, Lee *et al.* concluyen que la detección de polimorfismos en un fragmento de 335 pb del gen de la TK, que había sido implicado previamente en la resistencia a aciclovir, no se correlaciona de forma significativa con dicha resistencia por lo que dicha aplicación está, por el momento, todavía en estudio.

Varios autores han detectado la presencia de DNA específico de dos herpesvirus en la misma muestra de LCR, evidencia molecular de que la coinfección por herpesvirus puede existir en el SNC. De ahí el interés de la detección de genoma de herpesvirus en una misma reacción de amplificación, algo conocido y usado por los participantes del control. Se ha demostrado que los VHS, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y herpesvirus humano tipo 6 pueden inducir la liberación de IL-6, condicionando una situación de inmunodepresión, lo que permitiría el establecimiento o reactivación de otros agentes infecciosos en el mismo hospedador y apoyaría la existencia de coinfección en el SNC. Estos datos realzan el valor de la PCR *multiplex*, que es en la actualidad el método más útil para el diagnóstico de las infecciones del SNC. Puesto que la experiencia no es muy amplia, se ha de guardar cautela en la interpretación de estos resultados múltiples, sobre todo si se ha de decidir el tratamiento más apropiado. Se han descrito casos de pacientes que respondieron bien al tratamiento con un antiviral que era activo frente a uno de los virus detectado con la PCR, pero no frente a los restantes.

Para finalizar, los datos resultantes del análisis de este control, demuestran que aproximadamente un 50% de los laboratorios participantes están capacitados para diagnosticar infecciones del SNC mediante PCR, con una fiabilidad elevada, ya que sólo un centro proporciona resultados discrepantes con los del laboratorio de referencia. También se desprenden del análisis de los datos que la gran mayoría de participantes utiliza métodos comercializados y realiza la detección de varios patógenos. Cabe esperar que, con el tiempo, el número de laboratorios implicados en la realización de estas técnicas vaya en aumento, lo que hará posible obtener información más útil de los resultados de un control de calidad externo, como el presente.

BIBLIOGRAFÍA

Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1991; 337:189 -192.

Casas I, Tenorio F, De Ory F, Lozano A, Echevarria JM. Detection of both herpes simplex and varicella-zoster virus in cerebrospinal fluids from patients with encephalitis. *J Med Virol* 1996; 50:25–36.

Domingues RB, Lakeman FD, Mayo MS, Whitley RJ. Application of competitive PCR to cerebrospinal fluid samples from patients with herpes simplex encephalitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2229 -2234.

Hirsch HH, Bossart W. Two-centre study comparing DNA preparation and PCR amplification protocols for herpes simplex virus detection in cerebrospinal fluids of patients with suspected herpes simplex encephalitis. *J Med Virol* 1999; 57:31-35.

Lee NY, Tang YW, Espy MJ, Kolbert CP, Rys PN, Mitchell PS, Day SP, Henry SL, Persing DH, Smith TF. Role of genotyping analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3171–3174.

Powell KF, Anderson NE, Frith FD, Croxson MC. Noninvasive diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990; 335:357-358.

Rowley A, Whitley RJ, Lakeman FD, Wolinsky SM. Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis* 1990; 335:440-441.

Tang Y, Mitchell S, Espy MJ, Smith TF, Persing DH. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2127-2136.

Tebas P, Nease RF, Storch GA. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of herpes simplex encephalitis: A decision analysis model. *Am J Med* 1998; 105:287-295.

Whitley RJ, Lakeman F. Herpes simplex virus infection of the central nervous system: Therapeutic and diagnosis considerations. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 414 - 420.