



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico de laboratorio de las meningitis linfocitarias

José María Navarro Marí^{a,*}, Mercedes Pérez Ruiz^a y Diego Vicente Anza^b

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Centro de Referencia de Meningitis y Encefalitis Víricas de Andalucía, Granada, España

^bServicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián. CIBER Enfermedad Respiratoria CIBERES y Centro de Referencia de Enfermedad Meningocócica del País Vasco, San Sebastián, España

RESUMEN

Palabras clave:

Meningitis linfocitaria
Meningitis aséptica
Diagnóstico de laboratorio
PCR
Cultivo celular

La mayoría de las meningitis linfocitarias, principalmente las de evolución aguda y benigna, están producidas por virus. Los más comúnmente implicados en nuestro medio son los enterovirus, virus del herpes simple, virus varicela-zóster y virus Toscana. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) son el método de elección para el diagnóstico de las meningitis virales a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Son más rápidas, más sensibles y, además, no están tan condicionadas por la viabilidad de los virus en la muestra clínica como lo están los métodos tradicionales. El desarrollo de equipos comerciales validados, el grado de automatización de la técnica, y el empleo de sistemas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real son las principales premisas que hay que tener en cuenta a la hora de elegir el método en cada laboratorio. En la actualidad se encuentran disponibles equipos comerciales para la detección mediante PCR en tiempo real de enterovirus y herpesvirus, que son los virus implicados con mayor frecuencia. Aunque las TAAN a partir de una muestra directa han desplazado al cultivo celular con fines diagnósticos, la combinación de ambas tecnologías puede ser de gran utilidad. Cuando no es posible establecer el agente causal mediante TAAN en muestras de LCR, se debe recurrir al empleo de otras muestras (exudado faríngeo, heces) y otras técnicas, como la serología, que es el método de elección para el diagnóstico de meningitis por virus poco frecuentes en nuestro medio, como el virus de West Nile y el virus de la coriomeningitis linfocitaria.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Laboratory diagnosis of lymphocytic meningitis

ABSTRACT

Keywords:

Lymphocytic meningitis
Aseptic meningitis
Laboratory diagnosis
PCR
Cell culture

Lymphocytic meningitis, mainly those with an acute and benign course, are caused by viruses. In our area, the most commonly involved agents are enteroviruses, herpes simplex, varicella zoster and Toscana viruses. Nucleic acids amplification techniques (NAAT) are the methods of choice to diagnose viral meningitis from cerebrospinal fluid (CSF) samples. They are more rapid and sensitive, and indeed, they are not influenced by the viability of the virus in the clinical specimen as traditional methods are. The development of commercial equipments, the degree of automation, and the use of real-time polymerase chain reaction (PCR) systems are the most important premises to choose the molecular method in each laboratory. Recently, commercial kits of real-time PCR are available for the detection of enteroviruses and herpesviruses, which are the most frequently viruses involved in meningitis. Although NAAT from the clinical sample have replaced cell culture for diagnostic purposes, the combination of both methods remain useful. When the detection of the causal agent from the CSF sample is not possible, other specimens (pharyngeal exudates, stools) or serological methods can be used. Serology is the reference method for meningitis caused by West Nile virus and lymphocytic choriomeningitis virus, which are less frequently detected in our area.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: josem.navarro.sspa@juntadeandalucia.es (J.M. Navarro Marí).

Introducción

La mayoría de las meningitis linfocitarias (ML), principalmente las de evolución aguda y benigna, están producidas por virus. El término "meningitis aséptica" se suele usar, también, indistintamente junto con el de "meningitis linfocitaria", para denotar un cuadro de meningitis aguda con pleocitosis de predominio linfocitario y ausencia de agentes bacterianos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Por lo tanto, habitualmente, los términos meningitis aséptica, ML y meningitis vírica (MV) se emplean como sinónimos. Las meningitis en general producen un gran impacto sanitario. La detección de pleocitosis linfocitaria en un cuadro de meningitis aguda es importante para descartar inicialmente la meningitis meningocócica, la cual lleva aparejado un manejo concreto del paciente y de sus contactos. Sin embargo, la pleocitosis que se da en estadios iniciales de las MV, en muchos casos es de predominio polimorfonuclear. Aunque la tasa de mortalidad asociada a la MV es baja, la morbilidad que producen estos cuadros es elevada¹. Por ello, el poder disponer de técnicas de laboratorio que permitan establecer el agente etiológico en este tipo de cuadros es de especial importancia, a efectos de evitar un tratamiento antibiótico innecesario en el paciente y la quimioprofilaxis en los contactos.

Los virus que están asociados de forma más habitual con la meningitis aguda en nuestro medio son los enterovirus (EV), el del herpes simple (VHS) tipo 2, varicela-zóster (VVZ) y Toscana (VTOS); con menor frecuencia, el de la parotiditis (VP), y muy raramente, el de West Nile (VWN) y el de la coriomeningitis linfocitaria (VCML)^{2,3}.

Hasta hace muy poco, el diagnóstico de laboratorio de las MV se realizaba mediante técnicas serológicas o cultivo celular. Sin embargo, el cultivo celular en muchos casos tiene poca o nula sensibilidad, u ofrece un resultado demasiado tardío para la mayoría de los virus potencialmente responsables. Además, la muestra idónea para diagnosticar un caso de MV mediante cultivo celular es el LCR, en el cual las cargas virales no suelen ser elevadas. Una demora en el transporte o en el procesamiento de la muestra disminuye aún más el número mínimo de virus viables necesarios para replicarse en líneas celulares. La serología, por otra parte, es un método indirecto que no permite establecer un diagnóstico de certeza, que además está especialmente limitada cuando el episodio está causado por EV y alfa herpesvirus. Por todo ello, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) son, hoy en día, el método de referencia para el diagnóstico de laboratorio de estas infecciones⁴.

Con fines diagnósticos, las TAAN deben enfocarse a amplificar regiones conservadas del genoma viral que hay que detectar. Existen métodos de TAAN comerciales para la detección de los virus más frecuentes productores de MV (EV, VHS, VVZ); sin embargo, la detección de otros virus a menudo asociados a meningitis en nuestro medio, como es el caso del VTOS, se realiza por métodos de desarrollo propio. El uso de métodos automáticos de extracción de ácidos nucleicos y de formatos de PCR en tiempo real simplifica enormemente todo el proceso.

Otros microorganismos que producen meningitis linfocitarias, aunque de forma menos frecuente, son *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Brucella* y *Cryptococcus*. Sin embargo, los cuadros de meningitis producidas generalmente por éstos, o bien no tienen una evolución aguda y están asociados a una población determinada con una serie de factores predisponentes, o bien se deben a complicaciones neurológicas de una infección preexistente. A diferencia de lo que ocurre con los virus, las TAAN a partir del LCR no son los métodos de referencia para la mayoría de estos agentes; éstos se basan en técnicas de cultivo, detección de antígenos microbianos o serología.

La participación de los laboratorios en controles de calidad tanto externos como internos permite asegurar la validez y la reproducibilidad de los métodos diagnósticos.

Toma de la muestra y conservación

La toma de la muestra para el diagnóstico microbiológico de las MV corresponde a la fase preanalítica del proceso, que generalmente no suele estar controlada por el laboratorio. El método preferente para la obtención de la muestra de LCR es la punción lumbar. La obtención de la muestra debe realizarse en condiciones asépticas para evitar la contaminación con microorganismos de la piel. El envío al laboratorio debe ser inmediato y, preferiblemente, el médico solicitante debe avisar de esta circunstancia al facultativo de microbiología.

El procesamiento de la muestra de LCR debe ser igualmente inmediato. Esta práctica es crucial si se trata de una meningitis bacteriana, en la que se recomienda un procesamiento en un tiempo inferior a 1 h. Para el estudio del virus, el LCR puede conservarse a 4 °C si se va a procesar en un tiempo inferior a 48 h, y para períodos superiores se recomienda conservarlo congelado a -80 °C. No debe conservarse a -20 °C para el estudio viral, ya que esta temperatura puede tener un efecto deletéreo para los virus ARN (EV, VTOS, VWN, VCML). En cambio, en el caso de la meningitis bacteriana, si la muestra debe conservarse unos días para estudios posteriores, lo más adecuado es mantenerla a temperatura ambiente.

Parámetros bioquímicos de las meningitis linfocitarias

Ante un cuadro meníngeo, la petición que recibe el laboratorio suele ser múltiple, y en una misma muestra de LCR puede solicitarse, conjuntamente, el estudio bacteriano, el viral, el de hongos, y otros. Las características analíticas del LCR, de entrada, nos orientan hacia la más probable etiología infecciosa. La tabla 1 representa los parámetros bioquímicos del LCR asociados a las meningitis agudas más frecuentes, las bacterianas y las MV. En éstas aparece generalmente una pleocitosis discreta, con predominio linfocitario, aunque en algunos casos el recuento de leucocitos es muy elevado, y en estadios iniciales de la infección puede haber predominio de polimorfonucleares; los valores de proteinorraquia son normales o ligeramente elevados, y los valores de glucorraquia están elevados. En la meningitis bacteriana, el recuento de leucocitos de LCR es mayor, las concentraciones de proteínas están elevadas y existe un descenso de los valores de glucosa. Otros parámetros, especialmente en la edad pediátrica, se utilizan para orientar hacia una posible etiología, como son las concentraciones de la proteína C reactiva y de la prolactonina en suero, que son marcadores de infección bacteriana y, por lo tanto, se encuentran elevados en esta situación⁵. Los parámetros bioquímicos son especialmente útiles para las meningitis agudas, pero no ocurre así para los casos de encefalitis, en los que el recuento de leucocitos en el LCR es mucho menor, e incluso negativo. En este tipo de infección neurológica se tiene en cuenta, sobre todo, la orientación clínica apoyada por pruebas de imagen⁶. Tampoco es útil en el caso de punciones lumbares traumáticas en las que la muestra de LCR está contaminada con sangre periférica.

Tabla 1

Parámetros bioquímicos del líquido cefalorraquídeo asociados a las meningitis agudas

Parámetro	Normal	Vírica	Bacteriana
Leucocitos	< 10/μl	100-500/μl ^a	> 1.000/μl
Polimorfonucleares	Ausencia	< 50%	> 50%
Proteínas (mg/dl)	< 30-40	< 100	> 100
Glucosa (mg/dl)	> 50	> 50 (2/3 suero)	< 40
Tinción de Gram	Negativa	Negativa	Positiva
Proteína C reactiva sérica	Negativa	Negativa	Elevada (> 20 mg/l)
Prolactonina sérica	Negativa	Negativa	Elevada (> 1 ng/ml)

^aEn niños pequeños son frecuentes los recuentos > 500 leucocitos/μl con predominio de polimorfonucleares, simulando una meningitis bacteriana.

Diagnóstico microbiológico de las meningitis linfocitarias

La mayoría de las ML están producidas por virus. Es en los métodos de detección de este tipo de microorganismos en lo que más se ha avanzado en los últimos años. Así, mientras que hasta hace unos años el diagnóstico virológico de una ML estaba restringido a determinados laboratorios con capacidad de realizar cultivo celular, hoy en día las TAAN han sustituido a los métodos clásicos. Para los virus más frecuentes existen numerosas TAAN comerciales que permiten obtener un diagnóstico en pocas horas.

El diagnóstico definitivo de un caso de ML de naturaleza vírica se establece demostrando la presencia del microorganismo en el LCR. A veces esto no es posible y se recurre a otras técnicas, o a métodos indirectos. La detección del microorganismo en otros lugares diferentes al LCR (faringe, heces, determinaciones serológicas) no permite establecer un diagnóstico definitivo, sino un diagnóstico probable. La tabla 2 detalla los principales virus causantes de meningitis linfocitaria así como el tipo de muestras y técnicas que pueden utilizarse para detectarlas.

Técnicas moleculares

Las TAAN son, hoy en día, el método de elección para el diagnóstico de ML de origen vírico a partir de muestras de LCR. Éstas ofrecen una serie de ventajas con respecto a las técnicas clásicas como, por ejemplo: *a*) su rapidez, pues permiten disponer del resultado en pocas horas; *b*) la sensibilidad, en general más sensibles que el cultivo celular (éste, además, en muchos casos, añade la lentitud a la falta total de sensibilidad), y *c*) las TAAN no están tan condicionadas por la viabilidad de la muestra. Las desventajas que podrían asociarse a las TAAN serían, en primer lugar, que requiere el conocimiento de al menos una parte de la secuencia del genoma que se va a detectar. Por ello, deben diseñarse protocolos específicos para cada virus y, en consecuencia, con un mismo protocolo sólo se podrá detectar un número limitado de virus; en segundo lugar, hay que señalar que los equipos comerciales disponibles sólo han sido diseñados frente a algunos virus; en tercer lugar, hay una falta de estandarización y validación de técnicas entre laboratorios, y por último, el coste de los reactivos incluidos en las TAAN comerciales siguen siendo más caros que los reactivos empleados en métodos clásicos.

A la hora de elegir una técnica molecular para el diagnóstico habitual de los virus productores de ML, se podría atender, por este orden, a los siguientes criterios: *a*) disponibilidad de reactivos

comerciales con demostrada sensibilidad y especificidad; *b*) empleo de sistemas de PCR en tiempo real (u otros métodos de amplificación), con sensibilidad equivalente a los sistemas convencionales de PCR anidada, pero más reproducibles, rápidos y menos sujetos a problemas de contaminación que éstos; *c*) posibilidad de automatización o semiautomatización del procedimiento; *d*) empleo de protocolos de PCR en tiempo real de diseño propio para aquellos virus para los que no existen reactivos comerciales disponibles, y *e*) sistemas convencionales de PCR múltiple para la detección de los virus más frecuentes. Además, la infraestructura y el personal disponible en cada laboratorio con experiencia en TAAN van a condicionar el empleo de una o varias de estas técnicas moleculares.

Más del 80% de las ML de origen vírico están producidas por EV⁷. De hecho, los EV son los agentes microbianos más frecuentes de meningitis aguda, especialmente en la edad pediátrica. Se han descrito más de 90 serotipos de EV, aunque son sólo unos pocos los que producen con frecuencia cuadros de ML: echovirus 6, 9, 11, 30 y coxsackievirus B5⁸. En España, últimamente se han notificado casos de meningitis por serotipos de reciente descripción, como es el caso del EV 75, el cual estaba asociado a cuadros no meníngeos en otras áreas geográficas⁹. Existen métodos comerciales de PCR en tiempo real que amplifican regiones conservadas del genoma viral, lo cual permite detectar cualquier serotipo de EV. La región más adecuada para la detección de EV con fines diagnósticos es la región 5' no codificante (5' NC). La automatización de algunos de los pasos del proceso total simplifica bastante el diagnóstico microbiológico. Así, existen métodos para la detección de EV totalmente automatizados, como el sistema GeneXpert® EV (Cepheid, Sunnyvale, Estados Unidos), que integra los pasos de extracción del ARN viral, transcripción reversa (TR) y PCR en tiempo real en un mismo cartucho de reacción¹⁰. En principio, el mayor inconveniente que puede tener este sistema sería su coste, más elevado que otras TAAN comerciales semiautomáticas o manuales. Sin embargo, el mayor gasto derivado del estudio y el manejo de un cuadro de meningitis aguda se produce durante las primeras 24 h del ingreso¹¹, y esta técnica permite obtener un diagnóstico rápido y fiable en 2,5 h. Por lo tanto, el disponer de la misma puede facilitar enormemente el manejo del cuadro clínico, ya que evitaría, en muchos casos, el ingreso hospitalario y tratamientos antibióticos del paciente y sus contactos, que además generan un coste muy superior al del sistema molecular de diagnóstico. Aparte de este método, otras TAAN comerciales han sido optimizadas para utilizarse a partir del ácido nucleico viral extraído por sistemas automáticos; o bien, en combinación con éstos, utilizan reactivos que permi-

Tabla 2
Rendimiento de los principales métodos de diagnóstico microbiológico de las meningitis linfocitarias de origen vírico

Microorganismo	LCR			Otras muestras		
	PCR	Cultivo	Serología ^a	PCR	Cultivo	Serología ^a
<i>Enterovirus</i>	+++	++	-	+++ (faringeo, heces)	+++ (faringeo, heces)	+
<i>Herpesviridae</i>						
VHS ^b	+++	-	+	-	-	-
VVZ	+++	+/-	++	++ (vesícula)	++ (vesícula) ^c	++
<i>Paramyxoviridae</i>						
VP ^d	+++	++	++	++ (saliva, orina)	++ (saliva, orina)	++
<i>Arbovirus^e</i>						
VTOS (<i>Phlebovirus</i>)	+++	++	+	-	-	+++
VWN (<i>Flavivirus</i>)	++	+	++	++ (suero)	-	+++
<i>Roborivirus^f</i>						
VCML (<i>Arenavirus</i>)	++	++	++	-	-	+++

^aSuero: un aumento de 4 veces el título de IgG entre el suero de fase aguda y el de fase convaleciente, o una única IgM positiva, pueden ser diagnósticas.

^bMeningitis aséptica recurrente (síndrome de Mollaret) producida por VHS tipo 2.

^cLa inmunofluorescencia directa ofrece la misma sensibilidad que el cultivo.

^dPrácticamente han desaparecido los cuadros de meningitis por VP desde la introducción de la vacuna triple vírica en el calendario vacunal.

^eClasificación no taxonómica de virus transmitidos por artrópodos.

^fClasificación no taxonómica de virus transmitidos por roedores. Modificado de Pérez-Ruiz et al¹⁴.

VCML: virus de la coriomeningitis linfocitaria; VHS: virus del herpes simple; VP: virus de la parotiditis; VTOS, virus Toscana; VVZ: virus varicela-zóster; VWN: virus West Nile; +++: alto rendimiento; ++: rendimiento moderado; +: bajo rendimiento; -: no recomendado.

ten realizar los procesos de TR y PCR en un solo paso¹²⁻¹⁵. La ventaja que pueden ofrecer estos sistemas con respecto al sistema automático para la detección de EV es que el eluido obtenido tras el proceso de extracción se puede utilizar para la investigación de otros virus. Este hecho es especialmente importante cuando se trata de muestras de LCR, cuyo volumen habitualmente es escaso.

A los EV le siguen en frecuencia e importancia los alfa herpesvirus. De éstos, los que se asocian con las ML son el VVZ y el VHS tipo 2 (el VHS tipo 1 está generalmente asociado a encefalitis), y que afecta, principalmente, a neonatos que adquieren la infección por transmisión vertical, y en los que se produce un cuadro de meningitis recurrente denominado síndrome de Mollaret¹⁶. Las TAAN son el patrón de referencia para detectar estos virus en muestras de LCR. Se han descrito numerosos sistemas comerciales de PCR en tiempo real y PCR convencional, que utilizan diversas dianas del genoma de los herpesvirus (timidina cinasa y ADN polimerasa del VHS; timidina cinasa, gen 28 y gen 29 del VVZ)¹⁷. Algunos de ellos son sistemas de PCR múltiple que detectan varios virus de la familia *Herpesviridae* en un mismo tubo, o bien se trata de formatos de PCR simple que utilizan el mismo protocolo de amplificación y permiten su detección simultánea.

Aparte de los EV, VHS y VVZ, no existen TAAN comerciales disponibles para detectar otros virus responsables en nuestro medio de cuadros de ML. Éste es el caso del VTOS, que es uno de los virus detectados con más frecuencia en ML en ciertas regiones². La PCR es más sensible que el cultivo viral para detectar VTOS en muestras de LCR¹⁸. Se han publicado diversos métodos de PCR con este fin¹⁸⁻²¹. Sin embargo, algunos de ellos²⁰ carecen de sensibilidad para detectar la variante de VTOS que circula en España debido a la variabilidad genética que tiene ésta con respecto a la cepa de referencia originalmente descrita en Italia^{19,22}. Por ello, al igual que ocurre con los EV, la PCR para detectar VTOS en el LCR debe dirigirse a dianas conservadas del genoma viral. De las técnicas de PCR descritas para este virus, las que utilizan el formato de PCR en tiempo real^{18,21} son las más adecuadas con fines diagnósticos, porque permiten detectar la variante española de VTOS y, además, son más sencillas de realizar y optimizar que los formatos de PCR convencional.

Las TAAN a partir de una muestra única de LCR para detectar EV, VHS, VVZ y VTOS permitirían diagnosticar, en la mayoría de ocasiones, más del 95% de las ML de origen vírico en nuestro medio. Para algunos de estos virus, se pueden realizar TAAN sobre otras muestras representativas del cuadro clínico. La detección de EV en el exudado faríngeo o heces puede orientarnos hacia esa etiología, aunque el resultado hay que interpretarlo en conjunción con unas manifestaciones clínicas compatibles, ya que los EV pueden estar presentes en estas muestras en ausencia de ML, bien como colonizador, en la faringe, o por ser la vía de excreción del virus, en las heces. Dado el coste que tienen las TAAN, el uso de éstas para la detección de EV queda restringido al estudio del LCR, que es la única muestra que realmente permite confirmar el cuadro clínico.

La ML producida por el VP prácticamente ha desaparecido desde la introducción en el calendario vacunal de la vacuna triple vírica. Para este virus, se han descrito protocolos de PCR-TR convencional y PCR-TR en tiempo real, que amplifican diversos fragmentos de genes virales. La diana más utilizada es el gen SH, que codifica para la proteína *small hydrophobic*, que además es la diana de elección para identificar el genotipo²³. Con fines exclusivamente diagnósticos, han sido publicados otros protocolos de PCR en tiempo real que amplifican un fragmento de este gen y otras regiones más conservadas del genoma, como son el gen F, que codifica para la proteína de fusión^{24,25}. Además del LCR, las muestras de saliva y de orina también son útiles para la detección del VP mediante TAAN.

Excepcionalmente, se han detectado en España casos de meningitis por el VWN²⁶ y por el VCML (de F. Ory Manchón, M. Pérez Ruiz y J.M. Navarro Marí, comunicación personal). Algunas casas comerciales disponen de equipos de PCR en tiempo real para VWN. Sin embargo, no existen formatos comerciales para la detección molecular del VCML.

Recientemente se ha descrito la implicación de los parechovirus humanos (PEVh, familia *Picornaviridae*) en episodios de ML²⁷. El PEVh genotipo 3 ha mostrado un especial tropismo por el sistema nervioso central, y se ha detectado en episodios de ML en niños pequeños. Aunque todavía el conocimiento es muy preliminar, es posible que en un futuro haya que considerar este patógeno emergente en episodios de ML no filiados y, por lo tanto, diseñar protocolos específicos para detectarlo.

Excepto los alfa herpesvirus que no requieren de un paso de TR previo a la PCR, al ser virus ADN, el resto de virus frecuentemente asociados a ML son virus ARN. La detección de virus ARN mediante TAAN se puede realizar de dos formas: a) empleo de sistemas *one-step* que realizan TR y PCR en un solo paso, y b) TR con cebadores *random* (mezcla homogénea de hexanucléotidos con todas las combinaciones de secuencias posibles) que permite obtener ADN complementario (ADNc) total de cualquier ARN viral. En función de la cantidad de muestra disponible, se debe elegir uno u otro método. Los protocolos *one-step* son más simples y rápidos; sin embargo, para detectar múltiples agentes mediante PCR específicas para cada uno de ellos, deben utilizarse varias alícuotas del ARN viral. El segundo método requiere dos pasos independientes, pero generalmente el rendimiento es mayor, y con sólo una alícuota de ARN viral se obtiene un producto de ADNc que puede usarse para las diferentes reacciones de PCR específicas para cada virus.

Cultivo viral

El cultivo como método de diagnóstico de ML de origen vírico está restringido a laboratorios especializados y de referencia. Entre los virus más prevalentes, solamente con los EV y el VTOS se obtiene un rendimiento aceptable. Aunque se han usado diversas líneas celulares para el cultivo del VTOS²⁸, la utilizada más ampliamente es la que contiene células Vero. Los serotipos de EV comúnmente implicados en la ML crecen bien en líneas celulares a partir del tercer día de incubación, dependiendo de la carga de virus que contenga la muestra²⁹. Sin embargo, no existe una línea celular óptima para todos ellos y, por lo tanto, el abordaje del diagnóstico de los EV mediante cultivo celular lleva consigo el uso de varias líneas celulares que permiten el crecimiento de todos los serotipos de EV. Las líneas más adecuadas son células de rhabdomyosarcoma, MRC-5, BGM, Vero, Hep-2, etc. El cultivo celular permite recuperar la cepa viral para posteriores análisis de caracterización antigénica y genética con fines epidemiológicos.

Aunque las TAAN a partir de una muestra directa han desplazado al cultivo celular con fines diagnósticos, la combinación de ambas tecnologías puede ser de gran utilidad. El uso de PCR sobre el sobrenadante del cultivo celular no sólo genera una amplificación del virus en ambos sentidos –primero sobre el cultivo y, más tarde, la diana de PCR–, sino que además permite la identificación, mediante métodos genotípicos, de nuevos serotipos de EV que no dan efecto citopático visible y para los que no existen antisueros específicos con los que caracterizar la cepa por métodos clásicos (neutralización del efecto citopático o inmunofluorescencia con antisueros específicos de tipo)³⁰. Para determinar el serotipo mediante métodos genotípicos, se suele realizar la secuenciación de los productos de la amplificación de un fragmento del gen VP1^{31,32}. Por el volumen generalmente limitado de LCR, es preferible obtener el aislado de EV a partir de otras muestras con mayor carga viral como el exudado faríngeo y las heces, una vez que se ha confirmado el diagnóstico etiológico.

En definitiva, el tipo de laboratorio y la capacidad de éste para realizar TAAN, bien por la disponibilidad de reactivos comerciales para detectar los virus más prevalentes en cuadros de ML, bien por la existencia de infraestructura y personal entrenado en este tipo de tecnología, van a condicionar la amplitud del estudio virológico en estas infecciones. Cualquier laboratorio debería tender a utilizar reactivos comerciales, ampliamente evaluados y optimizados. El uso

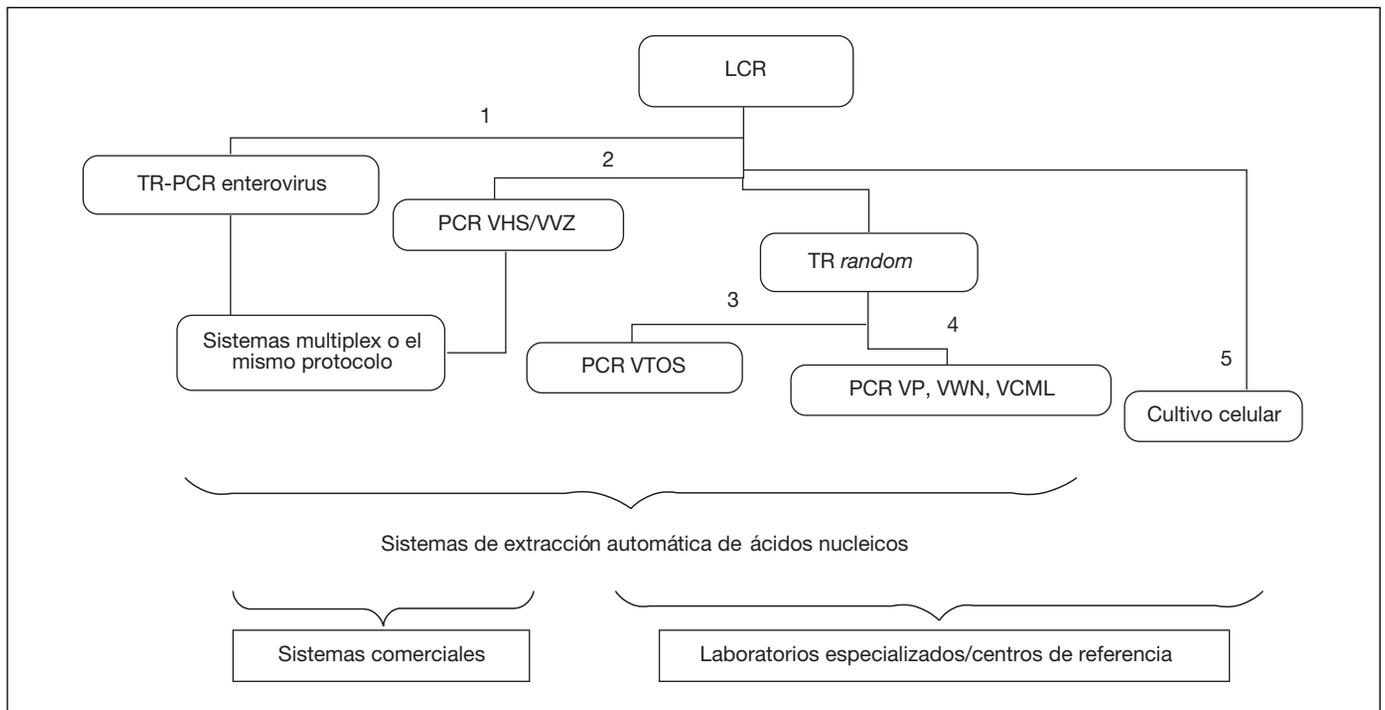


Figura 1. Algoritmo del procesamiento de la muestra de líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis linfocitaria de origen vírico. LCR: líquido cefalorraquídeo; TR-PCR: transcripción reversa más reacción en cadena de la polimerasa; VCML: virus de la coriomeningitis linfocitaria; VHS: virus del herpes simple; VP: virus de la parotiditis; VTOS, virus Toscana; VVZ: virus varicela-zóster; VWN: virus West Nile.

de TAAN de desarrollo propio, así como el cultivo celular para el diagnóstico viral y posteriores estudios epidemiológicos, quedaría restringido a ciertos laboratorios especializados y laboratorios de referencia. La figura 1 muestra un posible algoritmo de diagnóstico virológico de ML a partir de muestras de LCR.

Serología

La serología se utiliza para el diagnóstico de ciertas ML víricas. Aunque no es útil para diagnosticar las causadas por EV o por el VHS, sí se han utilizado para las originadas por el VVZ, bien por demostración de IgM específica en suero, bien por seroconversión de IgG entre suero de fase aguda y fase convaleciente, o por la producción intratecal de anticuerpos específicos³³. Una IgM positiva frente al VTOS con unas manifestaciones clínicas compatibles es diagnóstica de un cuadro de meningitis aguda por este virus. Además, es el método de elección para detectar cuadros neurológicos por el VWN y otros virus emergentes, como el VCML, a partir de suero o de LCR.

Las técnicas de ELISA comerciales son generalmente las preferidas para el diagnóstico serológico por su buena sensibilidad y capacidad de analizar un gran volumen de muestras. Otros métodos serológicos que se utilizan para la detección de anticuerpos específicos son, por ejemplo, la reacción de fijación de complemento, el *immunoblot* y la inmunofluorescencia indirecta. Hay que tener en cuenta la posibilidad de que se produzcan reacciones cruzadas cuando se trata de la detección de anticuerpos frente a virus emparentados. El método de confirmación de la especie viral sería el ensayo de reducción de placas o el ensayo de neutralización del efecto citopático³⁰. Estos métodos son demasiado laboriosos para su uso común y, en consecuencia, sólo se llevan a cabo en laboratorios de referencia.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Baringer JR. Viral infections. En: Asbury AK, McKhann GM, McDonald WI, eds. Diseases of the nervous system: clinical neurobiology. 2.ª ed. Filadelfia: W.B. Saunders. 1992; p. 1298-311.
2. Navarro JM, Fernández-Roldán C, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu S, de la Rosa M, Sánchez-Seco MP. Meningitis por virus Toscana en España: descripción de 17 casos. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:420-2.
3. Gutierrez Rodriguez MA, Garcia Comas L, Rodero Garduño I, Garcia Fernandez C, Ordobas Gavin M, Ramirez Fernandez R, et al. Increase in viral meningitis cases reported in the Autonomous Region of Madrid, Spain, 2006. *Euro Surveill*. 2006;11: E061103.3.
4. Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:903-25.
5. Dubos F, Moulin F, Gajdos V, de Suremain N, Biscardi S, Lebon P, et al. Serum procalcitonin and other biologic markers to distinguish between bacterial and aseptic meningitis. *J Pediatr*. 2006;149:72-6.
6. Chadwick DR. Viral meningitis. *Br Med Bull*. 2005;75:1-14.
7. Boletín Epidemiológico Semanal. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Vigilancia de enterovirus no polio. Sistema de Información Microbiológica. Años 2006-2009. 2009 Vol. 17 n.º 4/37-48. Disponible en: http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/boletin_semanal/BOLETIN_2009-04.pdf.
8. Modlin JF. Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 6.ª ed. Filadelfia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2148-61.
9. Reina-González G, Pérez-Ruiz M, Avellón A, Trallero G, Otero A, de la Rosa-Fraile M, et al. Enterovirus 75, un nuevo virus patógeno en nuestro medio. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:566-9.
10. Kost CB, Rogers B, Oberste S, Robinson C, Eaves BL, Leos K, et al. Multicenter beta trial of the GeneXpert Enterovirus assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1081-6.
11. 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.
12. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol*. 1994;32:2590-2.
13. 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.
14. 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.
15. Petitjean J, Vabret A, Dina J, Gouarin S, Freymuth F. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay on the LightCycler for the rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol*. 2006;35:278-84.

16. Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol.* 2007;6:1015-28.
17. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes.* 2004;11 Suppl 2:A48-56.
18. Perez-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.
19. Sanchez-Seco MP, Echevarria JM, Hernandez L, Estevez 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.
20. 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.
21. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lô MM, et al. Rapid detection of important human pathogenic phleboviruses. *J Clin Virol.* 2008;41:138-42.
22. Sanbonmatsu-Gamez S, Perez-Ruiz M, Collao X, Sanchez-Seco MP, Morillas-Marquez F, de la Rosa-Fraile M, et al. Toscana virus in Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1701-7.
23. Palacios G, Jabado O, Cisterna D, de Ory F, Renwick N, Echevarria JE, et al. Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1869-78.
24. Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2902-8.
25. Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Doi R, Gotoh A, et al. Rapid and sensitive detection of mumps virus RNA directly from clinical samples by real-time PCR. *J Med Virol.* 2005;75:470-4.
26. Kaptoul D, Viladrich PF, Domingo C, Niubo J, Martinez-Yelamos 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.
27. Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, et al. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsis-like illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis.* 2008;47:358-63.
28. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez-Seco MP, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1657-63.
29. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2576-80.
30. Hsiung GD. *Picornaviridae*. En: Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML, eds. *Hsiung's diagnostic virology: as illustrated by light and electron microscopy*. 4.^a ed. New Haven: Yale University Press; 1994. p. 119-40.
31. 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.
32. 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.
33. Echevarria JM, Casas I, de Ory F, Tenorio A, Echevarria C, Lozano A. Diagnóstico de laboratorio de encefalitis agudas y subagudas de probable origen viral: siete años de experiencia. *Neurología.* 1997;12:381-3.
34. Pérez-Ruiz M, Vicente D, Navarro-Mari JM. Infecciones agudas del sistema nervioso central (meningitis y encefalitis) virales y bacterianas de origen autóctono. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 Supl 9:S8-14.