



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA.
DELEGACION 2 NORESTE, D.F.

“DETECCIÓN DE ENTEROVIRUS POR RT-PCR EN LÍQUIDO CEFALORAQUÍDEO EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL”

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:

PEDIATRÍA MÉDICA

PRESENTA:

DR. CARLOS JUÁREZ ORTIZ.

ASESOR EXPERTO:

DRA. GUADALUPE GARCIA ELORRIAGA.

ASESOR METODOLÓGICO:

DRA. AMALIA ESPARZA GARCIA



MÉXICO, D.F. FEBRERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JOSÉ LUIS MATAMOROS TAPIA
DIRECTOR DE EDUCACIÓN
E INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA. IMSS.

DR. JORGE E. MENABRITO TREJO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE PEDIATRÍA MÉDICA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA. IMSS.

DR. MARIO GONZALEZ VITE
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
PEDIATRÍA MÉDICA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA. IMSS

DRA. GUADALUPE GARCIA ELORRIAGA
INVESTIGADOR DE TIEMPO COMPLETO
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA E INFECTOLOGÍA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA "DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA. IMSS.

DRA. AMALIA ESPARZA GARCIA
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
DELEGACIÓN HIDALGO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DR. CARLOS JUÁREZ ORTIZ

RESIDENTE DE CUARTO AÑO
PEDIATRÍA MÉDICA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA. IMSS.

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| 1. Resumen | 5 |
| 2. Antecedentes científicos | 6 |
| 3. Justificación | 11 |
| 4. Planteamiento del problema | 12 |
| 5. Objetivos | 13 |
| 6. Material y métodos | 14 |
| Tipo de estudio | 14 |
| Universo de estudio y muestra | 14 |
| Criterios de selección | 14 |
| Variables | 16 |
| 7. Descripción general del estudio | 20 |
| 8. Tamaño de muestra | 20 |
| 9. Analisis estadístico | 20 |
| 10. Resultados | 21 |
| 11. Discusión | 22 |
| 12. Conclusiones | 23 |
| 13. Bibliografía | 24 |
| 14. Anexo 1 Secuencias de enterovirus | 30 |
| 15. Anexo 2 Iniciadores de enterovirus | 31 |
| 16. Anexo 3 Consentimiento Informado | 32 |
| 17. Anexo 4 Hoja de recolección de datos | 34 |
| 18. Tabla 1 Manifestaciones clínicas y gabinete | 36 |
| 19. Tabla 2 Líquido Cefalorraquídeo inicial | 37 |
| 20. Tabla 3 PCR panviral | 38 |

“Detección de enterovirus por RT-PCR en líquido cefalorraquídeo en pacientes pediátricos con infección del sistema nervioso central”

*García Elorriaga, **Esparza García, ***Juárez Ortiz. ****Sosa Maldonado. *****González Bonilla. *****Del Rey Pineda.

Unidad Investigación Inmunología, La Raza. **Coordinación Investigación en Salud Estatal Hidalgo. ***Residente Pediatría CMN La Raza. ****Jefa de neurología pediátrica CMN La Raza. *****Jefe de Unidad de Investigación La Raza. IMSS. *****Banco de Sangre La Raza IMSS.

Introducción: En población pediátrica la infección por enterovirus causa en SNC diferentes presentaciones clínicas, así tenemos que en preescolares y escolares es común la encefalitis y meningitis. La RT-PCR panviral en LCR es una prueba útil, sensible y específica ya validada en la detección de enterovirus en el SNC. En México se desconoce cual es la frecuencia de infecciones agudas por enterovirus en el SNC en la población pediátrica por lo que esta prueba nos ayudaría a diagnosticar los casos afectados siendo de gran apoyo en la institución del tratamiento específico.

Objetivo: Determinar frecuencia de infecciones por enterovirus en el Sistema Nervioso Central en menores de 15 años.

Material y métodos: Ingresaron pacientes menores de 15 años de edad entre abril y septiembre de 2007, internados en la Unidad Médica de Alta Especialidad la Raza y el Hospital de Infectología CMN La Raza con diagnóstico clínico de meningitis o encefalitis viral aguda, que contarán con LCR para analizar citoquímico y RT-PCR panviral. Se excluyeron a recién nacidos, pacientes portadores con inmunodeficiencia; tinción de Gram con visualización directa de alguna forma bacteriana o con coagulación positiva en LCR; y casos con aislamiento de un microorganismo bacteriano en cultivo de LCR; Se eliminaron los casos sin registro de fecha de entrega del resultado de RT-PCR; en alta voluntaria, traslado a otro Hospital no IMSS, y los que presentaron problemas en el procesamiento de la muestra.

Una vez que se obtuvo el consentimiento informado se efectuó punción lumbar para la extracción de LCR y toma de muestras de cultivos aerobios, tinción de Gram., coagulación, citoquímico, carga viral de CMV, VEB, HVS1, HVS2 y 10 gotas de LCR para RT-PCR. A las 24 horas se recabaron los resultados del cultivo de LCR, tinción de Gram y coagulación de LCR. La muestra de LCR para RT-PCR enteroviral se entregó en la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología, el resultado se entregó al médico tratante. Durante su estancia y al egreso se recolectaron los datos de las variables a estudiar. Para el análisis de los datos se utilizó estadística descriptiva

Resultados: Se identificaron 16 pacientes, ocho fueron eliminados por problemas técnicos en el procesamiento de la muestra. Ingresaron en total ocho pacientes y fueron 7/8 (87%) RT-PCR positivos para enterovirus. Del género masculino hubo 4(57%) casos y la edad promedio se ubicó entre 7 ± 3 años. Entre las principales manifestaciones clínicas encontramos crisis epilépticas en 86% (6/7), fiebre $\geq 38^\circ \text{C}$ y alteraciones en el comportamiento y en el estado de conciencia se observaron en 71% (5/7). Presentaciones menos comunes fueron crisis epilépticas aisladas y síndrome cerebeloso en 14%. El antecedente de infección de vías respiratorias superiores se registró en 42% (3/7). Todos los pacientes ameritaron tomografía computada, tres pacientes presentaron alteraciones del tipo de hemorragia, infarto y lesiones aisladas a múltiples. La estancia hospitalaria promedio se colocó entre 19 ± 12 días. Cursaron con complicaciones agudas 3/7 (42%) casos, y ningún fallecimiento se registró. La entrega de resultados de RT-PCR panviral en LCR para enterovirus fluctuó entre 1 a 6 días, promedio 4.8 ± 1.2

Conclusiones: La RT-PCR panvial para enterovirus en LCR es una prueba de detección rápida, que permite efectuar el diagnóstico de encefalitis o meningoencefalitis por enterovirus. El diagnóstico se realizó en 87%, y sugiere a los enterovirus entre las principales etiologías de infección aguda del SNC en población pediátrica. Los pacientes estudiados presentaron una elevada frecuencia de complicaciones así como manifestaciones neurológicas diferentes a lo reportado en la literatura mundial. Lo cual plantea la posibilidad de que en el país probablemente circulen enterovirus de mayor virulencia, como son los enterovirus 70 y 71. No fue posible establecer la etiología de los enterovirus por ser la RT-PCR panviral.

Es necesario continuar con los objetivos del estudio y obtener una mayor muestra que permita determinar la prevalencia de enterovirus en el sistema nervioso central y la frecuencia de manifestaciones en lactantes

ANTECEDENTES CIENTIFICOS

Los enterovirus pertenecen a la familia Picornaviridae que incluye a los enterovirus no polio y poliovirus. Los enterovirus no polio humanos tienen una simetría icosaédrica, miden de 20-30 nm, son no capsulados y poseen una cadena única de RNA de polaridad positiva que les permiten replicarse utilizando el propio RNA mensajero. Los virus que lo conforman son

- Coxsackievirus A con 23 tipos A1-A24 (el coxsackie 23 es conocido como Echovirus 9)
- Coxsackievirus B con 6 B1-B6
- Echovirus con 31 tipos
- Y los nuevos Enterovirus 68-71

Su genoma se divide en 4 regiones que codifican proteínas estructurales y 2 regiones no codificadoras, reguladoras. Las cuatro proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, y VP4 se sintetizan como una poliproteína en la que el extremo 5' está unido covalentemente a una pequeña proteína VPg. Dentro de cada grupo, existe un número de serotipos definidos por los epítomos de la cápside que se deben a las modificaciones estructurales de la superficie del virión ⁽¹⁾

Los mecanismos de patogenicidad de las infecciones por enterovirus comprenden infección lítica en las células del hospedero donde causan efecto citopático. Los enterovirus producen infecciones cíclicas en sus hospederos con viremia y subsecuente transporte del virus a los órganos blanco (médula espinal y cerebro, meninges, miocardio, piel, hígado). ⁽²⁾ Los enterovirus comparten características clínicas, epidemiológicas y ecológicas, así como propiedades químicas y físicas. Difieren en su comportamiento en cultivo, antigenicidad y ciclo replicativo, y en todos los casos el hábitat y lugar de replicación es el tracto intestinal humano. En la actualidad existen más de 70 serotipos que causan infecciones ⁽³⁾ y cada uno de los serotipos tiene un diferente patrón de circulación, y manifestación clínica ⁽⁴⁾.

La mayoría de las infecciones por enterovirus son inaparentes, y solo un pequeño porcentaje se manifiesta como herpangina, enfermedad boca mano pie, enfermedades respiratorias, oculares, cardíacas, gastrointestinales, meningitis, encefalitis, mielitis transversa, ataxia cerebral y parálisis flácida aguda ⁽⁵⁾; la magnitud de la enfermedad es variable, así puede ser leve o fulminante y fatal. Entre los serotipos que se han relacionado con meningitis enteroviral están Coxsackievirus B5, Coxsackievirus B2 y Echovirus 6 y los serotipos 13 y 18; otros serotipos con capacidad de infectar al sistema nervioso central son Coxsackievirus A9, B2 y B4, y los Echovirus 6, 9, 11 y 30 ⁽⁴⁻⁵⁾; recientemente los serotipos 70 y 71 se asociaron a enfermedad neurológica grave, debido al tropismo que tienen para invadir el sistema nervioso central ⁽⁵⁾.

Los serotipos de enterovirus tienen un comportamiento geográfico y temporal y una ocurrencia variable, pero se han reportado epidemias de meningitis, en Londres por Echovirus A9, Echovirus 7, Echovirus 9, Echovirus 11, Echovirus 19 y Echovirus 30⁽⁶⁾ mientras que en Cuba los serotipos implicados fueron Echovirus 4, Coxsackievirus B5, Coxsackievirus A9 y Echovirus 16⁽⁷⁾.

En la provincia de Belem PA Brasil se documento por medio de cultivos virales una prevalencia de meningitis aséptica de 13.2% porcentaje del cual 57.6% fueron pacientes menores de 11 años y los serotipos aislados fueron Echovirus 30, Coxsackievirus B5 Y Echovirus 30 y 4⁽⁸⁾

En los Estados Unidos de Norteamérica a través del sistema de vigilancia en infecciones por enterovirus, se notificaron alrededor de 44% de casos en menores de un año de edad y el principal sitio de aislamiento fue líquido cefalorraquídeo⁽⁴⁾. Se estima que 50 millones de personas son infectadas por enterovirus no polio, y alrededor de 30 000-50 000 admisiones hospitalarias son por meningitis enteroviral cada año.

La infección por enterovirus no polio ocurre a cualquier edad y es común en lactantes y niños, la transmisión se efectúa de persona a persona a través de la ruta orofecal y secreciones respiratorias, y durante el verano origina epidemias y casos esporádicos⁽⁹⁾.

Los enterovirus son responsables del 80 - 90% de todos los casos de meningitis aséptica^(3,10) y del 5% de encefalitis.⁽¹¹⁾

El diagnóstico de meningitis enteroviral se confirma mediante el cultivo viral de líquido cefalorraquídeo, estudio altamente específico pero técnicamente complejo por la dificultad que tienen algunos tipos de enterovirus en propagarse en cultivos celulares, es de costo elevado ya que requiere mínimo de 3 líneas celulares, con baja sensibilidad (35-75%) al depender de la cantidad de virus existente, y cuyo resultado es proporcionado después de 3 - 8 días. Debido a la demora en la emisión de resultados, muchas veces la enfermedad del paciente se resuelve antes de obtener el resultado del laboratorio de virología⁽¹²⁾. Además esta prueba no es accesible en la gran mayoría de hospitales de países en desarrollo y la interpretación del aislamiento en cultivo de heces debe efectuarse con precaución, porque el virus se elimina después de la infección y/o enfermedad durante varias semanas.⁽¹²⁻¹³⁾

Otra prueba diagnóstica viral, es la transcripción reversa de la reacción en cadena de polimerasa (RT- PCR) en líquido cefalorraquídeo, prueba que identifica 80-92% de los enterovirus causales de meningitis aséptica⁽¹⁴⁾ La prueba de RT-PCR mejora el diagnóstico de enterovirus y cuenta con varias ventajas, ya que requiere de muestras pequeñas para la identificación del ácido nucleico, es una prueba rápida con capacidad de generar resultados dentro de las 24 horas de su recepción, y es sensible y específica. En pacientes con meningitis por enterovirus la RT-PCR en LCR fue superior y más exacta que el cultivo viral⁽⁵⁾

Por la sensibilidad de 96%-100% y especificidad de 96% la prueba de RT-PCR en LCR, ha reemplazado al cultivo viral como prueba diagnóstica y es considerada en los países industrializados como el estándar de oro ⁽¹⁵⁾. Esta prueba en niños con meningitis aséptica acorta los tiempos de hospitalización y la administración de antimicrobianos ^(10,12, 16, 17, 18).

Los enterovirus se pueden detectar por aislamiento viral o RT-PCR a partir de hisopado faríngeo y rectal, así como en muestras de orina suero, plasma y LCR; las muestras de mayor rendimiento e importancia clínica, son a partir de faringe y heces por su largo tiempo de excreción viral y en los casos de meningitis el LCR ^(19,20, 21)

Debido a que todos los serotipos de enterovirus tienen una región conservada 5' no traducida, el uso de iniciadores provenientes de ésta región ofrecen un medio de identificación de la mayoría de los enterovirus que infectan a humanos ^(22,23).

En el presente trabajo los iniciadores seleccionados corresponden a la mencionada región, para obtener una amplia especificidad para el género enterovirus, y fue probada con 66 serotipos de enterovirus diferentes, no produciendo un producto de amplificación en coxsackievirus tipos A11, A17, y A24 y en Echovirus tipos 16, 22, 23 ⁽²³⁾. Los serotipos probados y la respectiva cepa, así como la línea de propagación utilizada se anotan en el Anexo 1.

Los iniciadores están formados por 20 a 21 bases con 100% de homología con las secuencias de RNA enteroviral. Usando la combinación de iniciadores 2 y 3, el producto resultante de la RT-PCR es de 155-bp, y usando la combinación 1 y 3, el producto que se obtiene es de 440-bp ^(Anexo 2) ⁽²⁴⁾.

La sensibilidad de la prueba de PCR es de 100% en comparación con el cultivo viral ⁽²¹⁾, y en diferentes tipos de PCR (anidada, de un paso y la PCR AMPLICOR), la sensibilidad en la detección de enterovirus a partir de LCR, fue significativamente superior al cultivo viral (94% vs. 86%) p 0.0001 ⁽²⁵⁾. En sí en los casos donde el cultivo viral de LCR fue negativo, la prueba de PCR confirmó el diagnóstico, cuando el paciente presentaba clínica compatible, pleocitosis en LCR y aislamiento viral en sitios alternativos. (Por ejemplo heces) Los resultados de la prueba de PCR en LCR en combinación con PCR en suero y orina no fueron superiores a la prueba de PCR en LCR como prueba única para efectuar el diagnóstico de meningitis enteroviral ⁽²⁰⁾.

El uso de estuches comerciales ⁽²⁶⁾ como ensayos diseñados en el laboratorio RT-PCR con los iniciadores adecuados para enterovirus ⁽²⁷⁾ son de uso común en los laboratorios de diagnóstico de virología molecular, una ventaja importante es que permiten la rápida entrega de los resultados, evita la realización de estudios innecesarios, autoriza la suspensión de tratamientos

antimicrobianos, una menor estancia en el hospital, y disminución de costos, a diferencia de cuando se emplean otros métodos de diagnóstico en pacientes con evidencia de infección por enterovirus. Lo que enfatiza la importancia de una RT-PCR positiva para enterovirus ⁽²⁸⁾.

Debido a que el citoquímico del LCR en la meningitis por enterovirus puede cursar con pleocitosis o elevación de proteínas establecer el diagnóstico entre una meningitis bacteriana o enteroviral es difícil. En estos casos, la PCR ha mostrado su mayor utilidad y en otras condiciones como son la presencia de pleocitosis en el LCR,

punción lumbar traumática y en los pacientes menores de 3 años de edad con meningitis aséptica cuyas manifestaciones son inespecíficas y cursan con un LCR con ausencia de pleocitosis ⁽²⁹⁻³⁰⁾. En áreas de alta prevalencia de meningitis bacteriana, el valor de ejecutar una PCR enteroviral como una prueba diagnóstica rápida adicional ayuda a establecer el diagnóstico cuando se sospecha etiología enteroviral ⁽³¹⁾.

La validación como prueba diagnóstica de las diferentes pruebas de PCR en LCR para detectar enterovirus fue difícil, ya que todas ellas mostraron su superioridad frente al estándar de oro (cultivo viral); correspondiendo al consenso de expertos su validación y actualmente se aceptan al cultivo viral y la prueba de PCR como pruebas confirmatorias de meningoencefalitis viral, aunado a una historia clínica, exploración física del paciente, análisis del LCR para proteínas y glucosa compatibles, e identificación y análisis del patógeno mediante serología y PCR ⁽³²⁾.

Por su parte el sistema de vigilancia epidemiológica establece como caso confirmado de meningitis y/o encefalitis agudas por enterovirus, a todo paciente con cuadro clínico compatible y aislamiento viral y/o PCR en LCR positivos ⁽³³⁾. Actualmente la prueba de PCR en cualquiera de sus modalidades (RT-PCR panviral) ha alcanzado una gran importancia para establecer el diagnóstico ⁽³⁴⁾.

Entre las principales manifestaciones de enterovirus en el SNC esta la encefalitis viral, caracterizada por fiebre, cefalea, alteración del estado de conciencia, convulsiones, y en algunos casos se asocia con datos de focalización neurológica, o a un franco estado de coma, la recuperación es la regla, sin embargo la convalecencia puede ser prolongada. En los menores de un año de edad provoca secuelas neurológicas graves y en neonatos el cuadro encefálico es a menudo grave y fatal. Tomando en consideración que la encefalitis es una enfermedad grave, la distinción entre encefalitis infecciosa aguda y encefalopatía es importante, pero tiene dificultades diagnósticas, siendo de gran ayuda la prueba de PCR en la confirmación del diagnóstico ⁽³⁵⁾

En lactantes las infecciones del SNC por enterovirus son comunes, y a diferencia de otros grupos de edad las manifestaciones clínicas no son neurológicas, y se presenta con fiebre inexplicable, asociada a un citoquímico de LCR normal (hay ausencia de pleocitosis 40%), en estos casos la prueba

PCR para enterovirus en LCR auxilia a confirmar el diagnóstico de meningitis enteroviral ^(36,37)

Otras manifestaciones de enterovirus que se han documentado por PCR en LCR son las crisis convulsivas desencadenadas por fiebre en menores de 6 años ⁽³⁸⁾.

Es importante tomar en cuenta la fase evolutiva en que se encuentra la meningitis para la toma de PCR e interpretación de los resultados, así es mayor la positividad de la prueba de PCR en la fase aguda, y en la fase de convalecencia los estudios en sueros son negativos. La correlación de un resultado positivo o negativo de PCR en LCR y/o suero contra las pruebas combinadas de la virología convencional (serología y aislamiento en uno a tres sitios, vgr. LCR, heces y faringe) es del 78%. Mientras que la especificidad para la PCR es de 100%, Por lo tanto el LCR y/o suero deben ser tomadas en la fase aguda ⁽³⁹⁾.

El empleo de RT-PCR en tiempo real utilizando cualquiera de los tres fluorógenos Taíman, Syber Green I y Lux, probando diferentes procedimientos de extracción del RNA viral, resultando con mejor éxito la sonda Syber Green 1 ⁽⁴⁰⁾

La utilización de una RT-PCR panviral para enterovirus es útil para la detección de éstas infecciones, ya que la RT-PCR ejecutada en LCR es un método sensible y específico para el diagnóstico de meningitis enteroviral aguda. ⁽¹⁸⁾.

La RT-PCR que se empleará en el presente protocolo, como se mencionó es la desarrollada por Zoll y colaboradores ⁽²³⁾ con la cual se demostró la persistencia de infecciones enterovirales, y cuyo objetivo también es que se convierta en una prueba de diagnóstico de rutina.

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de infección viral aguda en el SNC se fundamenta en la falta de evidencia de etiología bacteriana ^(41,42) pero con el advenimiento de las técnicas de biología molecular que amplifican el ácido nucleico viral en LCR, como es la prueba de PCR en cualquiera de sus modalidades, han reemplazado al cultivo viral como el estándar de oro y actualmente son pruebas de elección para el diagnóstico.

La infección viral aguda del SNC en el Departamento de Infectología Pediátrica del Hospital de Infectología del CMNLR IMSS está dentro de los principales diagnósticos de internamiento, y representan el 80% de los ingresos. La infección por enterovirus en el SNC causa diferentes presentaciones clínicas, las cuales se han relacionado con la edad del paciente, de tal manera que en escolares es común encefalitis y meningitis, sin embargo información sobre la frecuencia de manifestaciones no neurológicas en otros grupos de edad, es limitada. La infección por enterovirus en el SNC causa una amplia gama de enfermedades, y puede presentarse desde una enfermedad febril, crisis convulsivas desencadenadas por fiebre, meningitis o bien como encefalitis.

Dentro de las causas de meningitis viral se encuentran el HSV, HHV6, EBV, VZV, CMV, adenovirus y los enterovirus no polio, los cuales son los principales productores de meningitis viral y de encefalitis ⁽⁴³⁾ Por lo que es necesario contar con una prueba diagnóstica que nos permita identificar la frecuencia de infecciones agudas del SNC en los pacientes menores de cinco años.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los pacientes pediátricos con diagnóstico de encefalitis viral, atendidos en la Unidad Médica de Alta Especialidad La Raza, ¿Cual es la frecuencia de infección por enterovirus mediante RT-PCR en LCR?

OBJETIVOS

GENERAL

- Establecer si la prueba de RT-PCR panviral es útil en la detección de infección aguda por enterovirus en el Sistema Nervioso Central en menores de 15 años.

SECUNDARIOS

- Identificar la frecuencia con que los enterovirus son responsables de la meningitis, encefalitis, fiebre inexplicable y crisis convulsivas desencadenadas por fiebre en población pediátrica
- Identificar el patrón de temporalidad de las infecciones del SNC causada por enterovirus
- Conocer la participación de enterovirus en lactantes con síndrome febril y en niños con crisis convulsivas desencadenadas por fiebre
- Determinar el tiempo promedio en que se entregan los resultados de RT-PCR
- Contabilizar los días de estancia hospitalaria al tener un diagnóstico confirmado de infección del SNC enteroviral aguda

MATERIAL Y MÉTODOS.

I. Tipo de estudio.

Observacional, transversal descriptivo, prolectivo.

II. Universo de estudio.

Pacientes menores de 15 años de edad que presenten el diagnóstico probable de: fiebre sin causa explicable de más de 24 horas de evolución, crisis convulsivas desencadenadas por fiebre, meningitis aséptica, encefalitis viral agudas ingresados en los departamentos de Infectología Pediátrica y la Unidad de Investigación del HICMR, Neurología Pediátrica y Urgencias del Hospital Gaudencio González Garza CMNLR IMSS

III. Criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- Todo paciente con:
- Diagnóstico probable o de sospecha de encefalitis o meningitis viral
- Menores de 15 años de edad
- Con LCR para analizar citoquímico y realizar RT-PCR
- Pacientes que cuenten con la autorización de sus padres o tutores para ingresar al estudio

Criterios de No Inclusión

- Pacientes portadores de algún tipo de inmunodeficiencia.
- Muestra de LCR con visualización directa de alguna forma bacteriana por tinción de Gram y coagulación positiva a antígenos bacterianos
- Recién nacidos
 - punción lumbar contraindicada
 - ✓ Insuficiencia respiratoria o cardíaca
 - ✓ Tiempos de coagulación prolongados
 - ✓ Datos de hipertensión endocraneana
 - ✓ Edema de papila
 - ✓ Estado neurológico y fondo de ojo no valorables
 - ✓ Glasgow ≤ 8
 - ✓ Déficit focal neurológico
- En ausencia de citoquímico de LCR inicial

Criterios de Exclusión

- Aislamiento de un microorganismo bacteriano en el cultivo de LCR
- Expedientes que no cuenten con la fecha en que se entregó el resultado de RT-PCR.
- En los casos de alta voluntaria del paciente o el seguimiento no fue posible se trasladó a otro Hospital no IMSS
- Muestra de RT-PCR incubada y procesada en forma incorrecta
- Muestra insuficiente para procesar la muestra

VARIABLES DEMOGRAFICAS

EDAD

Definición conceptual. Tiempo que una persona ha vivido desde que nació.

Definición operacional Se recabara del expediente la edad del paciente la cual será asignada en años.

Indicadores: años.

Escala de medición. Cuantitativa discreta.

SEXO

Definición conceptual. Condición orgánica que distingue al macho de la hembra, en los seres humanos, plantas o animales.

Definición operacional. Masculino o femenino.

Indicadores. Masculino o femenino.

Escala de medición dicotómica nominal.

MENINGITIS ENTEROVIRAL

Definición conceptual Inflamación de las meninges caracterizada por pleocitosis en LCR y el aislamiento o identificación de un enterovirus en LCR.

Definición operacional. De acuerdo a la definición de caso, es todo paciente con fiebre ≥ 38.5 C °, con uno o más de los siguientes signos: rigidez de nuca, cefalea intensa no explicable; y dos o más de siguientes datos: fotofobia, náusea, vómito y dolor abdominal.

En menores de 2 años de edad: la presencia de fiebre $\geq 38.5^{\circ}$ C y uno o más de los siguientes signos: irritabilidad o fontanela abombada.

En ambos grupos la presencia de alguno de los siguientes citoquímicos de LCR: normal, con leve incremento de proteínas (> 50 mg/dl), y / o leve a moderado aumento de células ($<500/\text{mm}^3$) con predominio de linfocitos ($>50\%$)

Una vez identificados se clasificarán en:

- Caso confirmado paciente con definición de caso + Identificación en RT-PCR de enterovirus en LCR.
- Caso sospechoso si llena la definición clínica de caso.
- Caso probable aquel caso sospechoso con LCR : normal, o con leve incremento de proteínas (> 50mg/dl), y / o moderado aumento de células (<500/mm³) y predominio de linfocitos (>50%) o con pleocitosis inicial.

Indicadores: La presencia de signos y síntomas anotados, citoquímico y RTPC en LCR.

Escala de medición: Nominal.

ENCEFALITIS ENTEROVIRAL AGUDA

Definición conceptual. Es el resultado de la invasión directa a células neuronales, principalmente a nivel de la materia gris, causando inflamación, destrucción celular y necrosis. ⁽⁴³⁾.

Definición operacional. Se considerará el diagnóstico de encefalitis cuando el paciente presenta fiebre > 38° C, alteración en el estado de conciencia por más de 24 horas, cambios en la personalidad y comportamiento, alucinaciones, crisis convulsivas focales o generalizadas, con o sin signos neurológicos de focalización y antecedente de enfermedad respiratoria o gastrointestinal.

Indicadores: Signos, síntomas.

Escala de medición: Nominal, dicotómica presente ausente.

FIEBRE SIN CAUSA EXPLICABLE

Definición conceptual es la presencia de fiebre $\geq 38.3^{\circ}$ C de más de 24 horas de evolución sin causa explicable en un niño previamente sano.

Definición operacional Todo paciente menor de 12 meses de edad que curse con fiebre \geq de 38^a C, asociada a irritabilidad marcada de más de 24 horas de evolución y cuya historia clínica y exploración cuidadosa no es evidente la causa de la fiebre, y cuyo LCR es normal o con pleocitosis.

Indicadores; fiebre, irritabilidad y citoquímico de LCR.

Escala de medición Nominal, dicotómica presente ausente.

LIQUIDOCEFALORRAQUÍDEO (LCR)

Definición conceptual. Líquido intracraneal de la medula espinal, que mantiene en suspensión la masa encefálica, amortigua traumatismos y tiene funciones de nutrición, transporte y eliminación de sustancias de deshecho del metabolismo cerebral. En presencia de infección viral el citoquímico puede presentar alteraciones.

Definición operacional. Se recabará el reporte del citoquímico de LCR, y se clasificara de acuerdo a los hallazgos en:

Normal cuando los componentes se encuentran en valores normales. (anexo 3)

LCR anormal por la presencia de pleocitosis a expensas de mononucleares y glucosa baja.

LCR alterado con pleocitosis secundaria a polimorfonucleares con glucosa normal o baja.

LCR con hiperproteíorraquia.

LCR con pleocitosis e hiperproteíorraquia.

Indicadores Citoquímico de LCR

Escala de Medición Dicotómica nominal normal o anormal.

IDENTIFICACIÓN DE ENTEROVIRUS EN LCR POR RT-PCR PANVIRAL

Definición conceptual. Prueba de biología molecular que tiene iniciadores con elevada especificidad para con 66 serotipos de enterovirus diferentes, no produciendo un producto de amplificación en coxsackievirus tipos A11, A17, y A24 y en Echovirus tipos 16, 22, 23. 1.⁽²³⁾

Definición conceptual De la muestra de LCR se tomaran 10gotas para la prueba de RT-PCR enteroviral que será entregará en la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología donde será procesada (Anexo 3) el resultado se entregará como positivo o negativo.

Indicador Detección de secuencia de RNA viral.

Escala de medición Dicotómica nominal positiva o negativa.

ENFERMEDAD FEBRIL ASOCIADA A CONVULSIONES

Definición conceptual. Infección de sistema nervioso central por enterovirus que se manifiesta con fiebre asociada a convulsiones.

Definición operativa Pacientes menores de 6 años de edad que curse con fiebre \geq de 38^a C, asociada a crisis convulsivas y cuya historia clínica apoyen que el evento convulsivo sea el primer evento y en la exploración física no hay evidencia de la causa de la fiebre, y cuya RT-PCR enteroviral es positiva en LCR.

Indicadores: fiebre, crisis convulsivas y RT-PCR enteroviral es positiva en LCR.

Escala de medición: Dicotómica nominal. Presente ausente.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El tesista y el médico adscrito de infectología pediátrica evaluaron a los pacientes que ingresaron a Urgencias, Neurología e Infectología Pediátrica con alguno de los siguientes diagnósticos: encefalitis, meningitis, agudas de probable etiología viral, fiebre sin causa explicable en menores de un año de edad y crisis febriles en menores de 6 años de edad; en caso de contar con los criterios de inclusión, se solicitó a los padres o representante legal el consentimiento para ingresar al estudio.

Descartada alguna contraindicación de punción lumbar en los pacientes, se procedió a la extracción de LCR, para la toma de muestras de cultivos aerobios en medios rutinarios, tinción de Gram. (2ml), y coagulación (2 ml.), citoquímico (2ml); 10 gotas de LCR para la prueba de RT-PCR, y 2ml para carga viral de CMV, VEB, HVS1, HVS2.

Del expediente clínico se recolectó información acerca de la evolución del padecimiento, manifestaciones clínicas, complicaciones, días de estancia y tratamiento instituido.

Las muestras rutinarias para la identificación microbiológica en LCR se inocularon de inmediato en días en el laboratorio clínico del Hospital de Infectología. A las 24 horas de primoaislamiento se verificó desarrollo en los medios de cultivo de LCR y el reporte final fue capturado después de 72 horas. El resultado de la tinción de Gram. y coagulación de LCR se recabó en 24 horas, pero si la muestra se tomo el fin de semana el resultado fue proporcionado en 48 - 72 horas.

El tesista entregó al laboratorio clínico del HICMLR 2ml de LCR para la determinación de carga viral de CMV, VEB, HVS1, HVS2, el resultado oficial fue entregado en un periodo de 7-10 días hábiles.

La muestra de LCR para RT-PCR enteroviral se entregó en la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología en días hábiles y el fin de semana la muestra se almacenó a -20° C, para entregarse el lunes por la mañana.

Se recabaron estudios de tomografía computarizada de cráneo y el EEG fue interpretado por el neurólogo participante. La prueba de RT-PCR panviral para enterovirus es una prueba ya validada, y una vez estandarizada la prueba se procesaron las muestras en LCR. El resultado se entregó al médico tratante y se anotó la fecha en que se recibió. Se eliminaron a los pacientes cuando el cultivo del LCR fue positivo a un microorganismo bacteriano; en casos de alta voluntaria o traslado a otro hospital no IMSS; PCR cuantitativa positiva para

otros virus (CMV, VEB, HVS1, HVS2); y cuando la muestra fue insuficiente o en almacenamiento inadecuado.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se incluyó a los pacientes atendidos durante el periodo de abril a septiembre del 2007.

RESULTADOS

Se identificaron 16 pacientes con el diagnóstico de encefalitis viral, fueron eliminados ocho por problemas técnicos en el procesamiento de la muestra, conformando la muestra final ocho pacientes.

El 87% (7/8) de las muestras fueron RT-PCR positivos para enterovirus. Entre los pacientes con prueba positiva 57% (4/7) fueron del género masculino, y la media de edad se ubicó en 7 ± 3 , con un rango de 3 a 13 años.

Entre las principales manifestaciones clínicas 86% (6/7) presentaron crisis epilépticas, seguidas de fiebre $\geq 38^\circ$ centígrados y manifestaciones neurológicas en 71% (5/7). El síndrome encefálico se caracterizó por alteraciones en el comportamiento, alucinaciones y alteraciones en el estado de conciencia. Presentaciones menos comunes fueron crisis epiléptica aislada y síndrome cerebeloso en 14% (1/7) (tabla 1)

Antecedente de infección previa se encontró en cuatro casos, 42% (3/7) habían padecido infección de vías respiratorias superiores y de gastroenteritis aguda 14% (1/7).

El citoquímico de LCR fue anormal en 57% (tabla 2). Todos los casos de enterovirus tuvieron: cultivos bacterianos sin desarrollo, coagulación y gram negativos y el número de copias de PCR cuantitativa de Citomegalovirus, Epstein Barr fueron negativas para enfermedad al igual que los resultados de Herpes simple 1 y 2 por PCR cualitativo. (tabla 3)

En la totalidad de los pacientes se realizó tomografía computada de cráneo, en 43% (3/7) presentaron hallazgos anormales. La mayoría de pacientes manifestaron crisis convulsivas 88% (6/7), y en 50% el patrón fue de crisis focales.

Solo en un paciente se detectó correlación en los hallazgos de la tomografía de cráneo y el electroencefalograma (tabla 1)

La estancia hospitalaria se colocó entre 4 a 49 días, promedio 19 ± 12 , la estancia se prolongó en 3/7 pacientes por complicaciones agudas. Las complicaciones en el primer paciente fueron hipertensión endocraneana, infartos cerebrales y paro cardiorrespiratorio. El segundo caso ingreso con deterioro neurológico, hemiparesia faciocorporal derecha, se agrega neumonía nosocomial y egresa con afasia. El último paciente curso con sepsis e hipertensión endocraneana. Ninguno de los pacientes con RT-PCR positivos para enterovirus falleció.

El número de días para la entrega de resultados fluctuó entre 1 y 6, promedio 4.8 ± 1.2

DISCUSIÓN:

En la muestra estudiada la etiología por enterovirus fue mayor a la reportada por la literatura mundial que se ubica entre 26 al 80% ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾, este incremento probablemente este influido por el patrón de temporalidad que presentan las infecciones de enterovirus. En verano su prevalencia es mayor y predomina sobre infecciones causadas por Epstein Barr, Citomegalovirus y Herpes simple 1 y 2.

En la mitad de los pacientes estudiados el antecedente de infección aguda reciente de vías respiratorias altas o de gastroenteritis aguda estuvo presente. Los preescolares y escolares del género masculino fueron los más afectados, llama la atención que ningún caso de meningitis o encefalitis fue identificado en el grupo de lactantes, comportamiento que coincide con las publicaciones de meningoencefalitis por enterovirus. ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾

Las manifestaciones clínicas dominantes fueron crisis convulsivas, déficit neurológico y fiebre. En la mayoría de los casos fue sustentado el síndrome encefálico. Crisis convulsivas y fiebre fueron características constantes. Y un patrón predominante de crisis convulsivas no fue detectado. La afasia fue el principal signo de déficit neurológico al ingreso. En contraste con publicaciones europeas, la fiebre fue un signo común, al igual que en los estudios de casos reportados en el continente americano ^(7,46).

El citoquímico de líquido cefalorraquídeo mostró el típico patrón viral, con mínima elevación de proteínas y células. Todos los pacientes tuvieron indicación de tomografía computada por la presencia de déficit neurológico o crisis convulsivas focales. Alteraciones en el estudio tomográfico presentaron tres casos, con daño cerebral generalizado por infartos múltiples bilaterales y trombosis de seno venoso en dos pacientes.

Debido a que tres pacientes presentaron complicaciones agudas (hipertensión endocraneana, deterioro neurológico y paro cardiorrespiratorio), severas y su evolución fue prolongada e insidiosa, no descartamos la participación de enterovirus con mayor virulencia como son los enterovirus 71 y 70 en estos casos; desafortunadamente la prueba utilizada en el presente estudio es panviral y no permite identificar cual es el enterovirus implicado. Pese a lo reportado en otros estudios, el número de casos complicados fue mayor en el grupo evaluado, probablemente por ser un hospital de concentración o probablemente a una elevada prevalencia de enterovirus de mayor virulencia.

El resultado de la RT-PCR fue de nula utilidad para la modificación del tratamiento de los casos, debido a que el tiempo de entrega en promedio supero los cuatro días, limitando la posibilidad de brindar manejo antiviral específico oportuno en los casos graves.

CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio a pesar de contar con una muestra pequeña, el diagnóstico de encefalitis por enterovirus se realizó en el 87% mediante RT-PCR panviral y sugiere que los enterovirus se encuentren entre las principales etiologías.
2. Es posible la detección rápida de encefalitis por enterovirus mediante la prueba de RT-PCR.
3. Si bien, los resultados son parte de un estudio piloto en la estandarización de RT-PCR para enterovirus, es necesario continuar con los objetivos del estudio y obtener una mayor muestra que permita determinar la prevalencia de enterovirus en el sistema nervioso central.
4. Nuestros pacientes representaron mayor frecuencia de complicaciones y diferentes manifestaciones neurológicas con respecto a lo reportado en la literatura mundial.
5. No fue posible establecer la prevalencia de crisis convulsivas secundaria a infección por enterovirus en sistema nervioso central en lactantes por lo que se requiere continuar la investigación en este grupo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beatrice ST, Katze Mg, Zajac BA, Crowell RL: Induction of neutralizing antibodies by the coxsackie B3 virion polypeptide, VP2. *Virology* 1980; 104: 426-438
2. Zeichhard H, Grunert HP, Armstrong D, Cohen J: *Infectious Diseases*. Mosby Publishers, London, United Kingdom, 1999: 3.1-3.12
3. Modlin JF: Enterovirus infection in infants and children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1999; 12: 155-158
4. Hsu V, Mullins J: Enterovirus surveillance in the United States, 2000-2001 *Jama* 2002; 288: 3104-3105
5. Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J*.1999; 18; 1033-1040
6. Atkinson PJ, Sharland M, Maguire H Predominant enteroviral serotypes causing meningitis. *Arch Dis Child* 1998; 78: 373-374
7. Sarmiento L, Mas P, Goyenechea A, Palomera R, Morier L, Capó V, Quintana I, Santón M: First Epidemia of Echovirus 16 meningitis in Cuba. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7: 887-889
8. Lamarao LM, Gomes Mdel, Ferreira LL, Fonseca CM, Araujo LC, Santan MB, Tavares- Neto J: Investigation of enterovirus in case of aseptic meningitis syndrome of Belem. *Rev Soc Bras. Med Trop* 2005; 38: 391-395
9. Syriopoulou V Ph, Hadjichristodoulou Ch, Daikos DL , Pirounaki M, Chatzicou V, Pavlopoulou I, Anagnostakou M, Theodoridou M, Dellagrammaticas H Clinical and epidemiological aspects of an enterovirus outbreak in a neonatal unit. *Journal of Hospital Infection* 2002; 51: 275- 280.
10. Rotbart HA: Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-981
11. Coria-Lorenzo JJ, Juárez-Escobar M, Velasco-Alvarez VH: Meningoencefalitis viral. Enfoque clínico *Revista Mexicana de Pediatría* 2001;68: 252
12. Romero JR: Reverse transcription polymerasa chain reaction of the enterovirus . *Arch Pathol. Lab Med* 1999; 123: 1161-1169

13. Dagan R: Nonpolio enterovirus and the febrile young infant: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 67-71
14. Debais RL, Tyler KL: Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis. *Clinical Microbiology. Reviews*, 2004; 17:903-925
15. Rotbart HA: Nucleic acid detection systems for enterovirus. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 156-168
16. Rotbart HA, McCracken JR, Whitley RJ, et al: Clinical significance of enterovirus in serious summer febrile illness of children. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 869-874
17. Ahmed A, Brito F, Goto C, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction for diagnosis of the enteroviral meningitis in infancy. *J Pediatr* 1997; 131: 393-397
18. Rotbart HA, Ahmed A, Hickey S, et al: Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16: 409-410
19. Hyypia T, Auvinen P, Maaronen M: Polymerase Chain reaction for human picornavirus. *J Gen Virol* 1989; 70: 3261-3268
20. Zoll GJ, Melchers WJF, Kopecka H, Jambroes G, Van der Piel HJA, Galama JMD: General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enterovirus: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 160-165
21. Lizuka N, Kuge S, Nomoto A: Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackie B1. *Virology* 1987; 156: 64-73
22. Pozzetto B, Andreoletti L, Beguier E, Bourlet T, Dussaix E, Grangeot-Keros L, Gratacap-Cavallier B, Henquell C, Legrand-Quillien MC, Novillo A, Palmer P, Petitjean J, Sandres K, Dubreuil P, Fleury H, Freymuth F, Leparac-Goffart I, Hober D, Izopet J, Kopecka H, Lazizi Y, Lafeuille H, Lebon P, Roseto A, Marchadier E, Masquelier B, Picard B, Puel J, Seigneurin JM, Wattre P, Aymard M. Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens *J Clin Microbiol.* 1996

23. Young PP, Buller RS, Storch GA: Evaluation of a commercial DNA enzyme immunoassay for detection of enterovirus reverse transcription-PCR products amplified from cerebrospinal fluid specimens *J. Clin Microbiol* 2000; 39: 4260-4261
24. Muir P, Ras A, Klapper E, Cleator M, Korn K, et al. Multicenter quality assessment of PCR methods for detection of enterovirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1409-1414
25. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH: Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase Chain reaction test on patient management. *JAMA* 2000; 283: 2680-2685
26. Spicher, VM, Berclaz, PY, Cheseaux, JJ, Morandi, PA, Suter S, Wunderli W, Siegrist CA: Detection of Enteroviruses in the Cerebrospinal Fluid by Polymerase Chain Reaction: Prospective Study of Impact on the Management of Hospitalized Children *Clinical Pediatrics* 2000; 39: 203-208
27. Stellrecht KA, Harding I, Woron AM, Lepow ML, Venezia R. A: The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management *Journal of Clinical Virology* 200; 25 S1:19-26
28. Gram AK, Murdoch DR: Association between cerebrospinal fluid pleocytosis and enteroviral meningitis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1491
29. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, Kennedy PG: Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2005; 12: 38: 391-395
30. Bernit E, Lamballerie X, Zandotti C, Berger P, Veit V, Schleintz N, Micco P, Harlé JR, Chartel R: Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. *Medicine* 2004; 83: 245-251
31. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, Kennedy PG: Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and

- guidelines for management. *Eur J Neurol* 2005; 12: 38: 391-395
32. Kennedy PGE: Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75 (Suppl 1): 110-115
33. Peña MJ, Bolanos M, Pérez MC, Mosquera MM, Trallero G, Lafarga B. The importance of polymerase chain reaction in the diagnosis of enterovirus infections of the central nervous system in children. Clinico-epidemiologic characteristics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1999 ;17:227-309
34. Kobayashi, Ken-Ichiro; Haruta, Tsunekazu. Clinical spectrum in hospitalized children with echovirus type 13 infection. *Pediatrics International.* 2005;47:185-189
35. Hosoya M, Sato M, Honzumi K, Katayose M, Kawasaki Y, Sakuma H, Kato K, Shimada Y, Ishiko H, Suzuki H Association of nonpolio enteroviral infection in the central nervous system of children with febrile seizures *Pediatrics.* 2001;107:E12
36. Thoren A, Widell A: PCR for the diagnosis of enteroviral meningitis. *Scand J Infect Dis* 1994; 26 : 249-254
37. Donia D, Diviza M, Pana A: Use of armored RNA as a Standard to construct a calibration curve for real time RT-PCR. *J virol Methods* 2005; 126: 157-163
38. Whitley RJ, Kimberlin DW: Viral encephalitis. *Pediatric in Review* 1999;20: 192-198
39. Chaudhuri A, Kennedy PGE: Diagnosis and treatment of viral encephalitis *Postgrad Med J* 2002;78: 575-583
40. Lewis H, Gibbon FM: Management of viral meningitis and encephalitis. *Current Paediatrics* 2000; 10: 110-115
41. Kolski H, Ford-Jones EL, Richardson S, Petric S, Nelson S, Jamieson F, Blazer S, Gold R, Otsubo H, MacGregor D. Etiology of Acute childhood encephalitis at The Hospital for Sick Children Toronto, 1994-1995. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 398-409

42. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993; 15: 532-537
43. Cornelissen MT, Smits HL, Briëf MA et al. Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *J Gen Virol*. 1990; 71:1243-1246
44. Chomczynski P, Hulley SB, SR Cummings. *Designing Clinical Research: An epidemiological approach*. Williams and Wilkins: Baltimore, Marylan. 1998; 325-332
45. Chokephaibulkit, Kulkanya M.D.; Kankirawatana, Pongkiat M.D.; Apintanapong, Somchai M.D.; Pongthapisit, Viroj M.Sc.; Yoksan, Sutee M.D.; Kositanont, Uraivan Ph.D.; Puthavathana, Pilaipan Ph.D. Viral Etiologies of encephalitis in Thai Children. ***Pediatr Infect Dis J***. 2001. 20(2):216-218.
46. Davies, L J Brown, J Gonde, D Irish, R O Robinson, A V Swan, J Banatvala, R S Howard, M K Sharief, P Muir, Kristine R. Rittichier, MD, Paul A. Bryan, MD, Kathlene E. Bassett, MD, E. William Taggart, BS, F. Rene Enriquez, David R. Hillyard, MD, Carrie L. Byington, MD: Diagnosis and Outcomes of Enterovirus Infections in Young Infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24: 546–550
47. Fowler, T. Stödberg, M. Eriksson and R. Wickström: Childhood encephalitis in Sweden: Etiology, clinical presentation and outcome. *European Journal of Paediatric Neurology* .12(6), November 2008: 484-490
48. Narkeviciute, I, Vaiciuniene, D.: Outbreak of echovirus 13 infection among Lithuanian children. *Clinical Microbiology & Infection*. 2004;

10(11):1023-1025

49. Silverman, R A; The Pleconaril Pediatric Meningitis Study Group: Frequency of enteroviral meningitis among children presenting to the emergency department with viral/aseptic meningitis by using a PCR assay. *Pediatrics*; 34(4, Part 2) Supplement , October 1999, S9-S10

50. Davis L E, Tyler L K: Molecular diagnosis of CNS viral infections *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1

51. Goyo Rivas J, Correa Vega M, Yañez Saavedra R, Rojas Abán R, Coria Lorenzo JJ, Romero Baizabal BL Un caso fatal de encefalitis por enterovirus revisión de diagnóstico y tratamiento.. *Rev Mex Pediatr* 2003 70(4) 170-184.

52. Muñoz E, Caramuta L, Frenkel S, Cáceres L. Hemiplejía aguda infantil asociada a infección por enterovirus *Arch. Argent. Pediatr.* 2005 103 (4)

ANEXO 1

Se muestran enseguida:

a Polio, poliovirus; Coxs., coxsackievirus; Echo, echovirus; Entero, enterovirus.

b BGM, buffalo green monkey kidney cells; RD, rhabdomyosarcoma cells; HEL, human embryonal lung fibroblasts⁽²³⁾.

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Polio 1 Mahoney BGM | Echo 3 Morrisey RD |
| Polio 2 Mef-3 BGM | Echo4 Dutoit RD |
| Polio 3 Sauke BGM | Echo 5 Noyce RD |
| Coxs A1 Tompkins (TT) | Echo 6 D'Amori RD |
| Coxs A2 Fleetwood RD | Echo 7 Wallace RD |
| Coxs A3 Olson RD | Echo 8 Bryson RD |
| Coxs A4 High Point RD | Echo 9 Heyer RD |
| Coxs A5 Swartz RD | Echo 11 Gregory RD |
| Coxs A6 Gdula RD | Echo 12 Travis 2-85RD |
| Coxs A7 Russian AB IV HEL | Echo 13 4-11- 1D RD |
| Coxs A8 Donovan (CD) HEL | Echo 14 Tow RD |
| Coxs A9 Bozek (PB) BGM | Echo 15 Ch 96-51 RD |
| Coxs A10 Kowalik (MK) RD | Echo 16 Harrington BGM |
| Coxs A11 Belgium-1 HEL | Echo 17 CHHE-29 RD |
| Coxs A12 Texas -12 RD | Echo 18 Metcalf RD |
| Coxs A 13 Flores HEL | Echo 19 Burke RD |
| Coxs A 14 G-14 RD | Echo 20 JV-1 RD |
| Coxs A 16 G-10 RD | Echo 21 Farina 575F RD |
| Coxs A 17 G-12 RheLa | Echo 22 Harris BGM |
| Coxs A 18 G-13 HEL | Echo 23 Williamson BGM |
| Coxs A 19 Dohi | Echo 24 DeCamp RD |
| Coxs A 20 IH-35 HEL | Echo 25 JV-4 RD |
| Coxs A 21 Coe HEL | Echo 26 Coronel RD |
| Coxs A 22 Chulman | Echo 27 Bacon RD |
| Coxs A 24 Joseph HEL | Echo 29 JV-10 RD |
| Coxs B1 Tucson BGM | Echo 30 Bastianni RD |
| Coxs B2 Pretorius BGM | Echo 31 PR Caldwell RD |
| Coxs B3 T.vDee BGM | Echo 32 PR-10 RD |
| Coxs B4 Tilo BGM | Echo 33 Toluca -3 RD |
| Coxs B5 Dekking BGM | Entero 68 Fermon HEL |
| Coxs B6 Schmitt BGM | Entero 69 Toluca-3 RD |
| Echo 1 Farouk RD | Entero 70 Marocco R-20 HEL |
| Echo 2 Cornelis RD | Entero 71 BrCr BGM |

ANEXO 2

Los iniciadores están formados por 20 a 21 bases con 100% de homología con las secuencias de RNA enteroviral, como se muestra enseguida.

| Oligo-nucleotido | Secuencias | Localización (a) |
|------------------|-----------------------------|------------------|
| Primer 1 | 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3' | 160-180 |
| Primer 2 | 5'-TCCTCCGGCCCCTGAATGCG-3' | 445-464 |
| Primer 3 | 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' | 580-599 |

(a) Las posiciones se refieren a la secuencia de coxsackievirus B1 Iizuka et al.⁽²⁴⁾

La RT-PCR ha demostrado que cuando fallan las técnicas convencionales virológicas para detectar virus en el caso de persistencia viral, la RT-PCR puede ser una herramienta poderosa en el estudio de enfermedades crónicas asociadas con infección enteroviral persistente, y puede utilizarse como una prueba de diagnóstico de rutina para la detección de éstas infecciones enterovirales⁽²³⁾.

ANEXO 3
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
PROTOCOLO

**“DETECCIÓN DE ENTEROVIRUS POR RT-PCR EN LCR DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL”**

Investigadores: Dr. Carlos Juárez Ortiz, Dra. Guadalupe García Elorriaga, Dra. Amalia Esparza García. Dr. Cesar González Bonilla, Dra. Justina Sosa Maldonado. Dr. Guillermo del Rey Pineda

El presente estudio tiene como objetivo identificar a los enterovirus (virus ECHO, coxsackie y otros enterovirus no polio) que causan encefalitis (inflamación del cerebro), meningitis (inflamación de la cubierta del cerebro), y en un pequeño porcentaje estos virus se presentan con crisis convulsivas febriles o fiebre no explicable cuando infectan al sistema nervioso central (cerebro).

Debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas es importante establecer un diagnóstico preciso, por lo que se utilizará una prueba llamada RT-PCR (Transcripción reversa de la reacción de cadena de polimerasa), la cual se efectúa en líquido cefalorraquídeo, que detecta un gran número de enterovirus no polio (ECHO, coxsackie y otros enterovirus). Estos virus en los países que disponen de pruebas para identificar virus, son los principales causantes de meningitis, encefalitis, y fiebre inexplicable.

La RT-PCR en líquido cefalorraquídeo ha demostrado ser superior a otras pruebas utilizadas para la identificación de virus (serología y cultivo viral), es de ayuda en la confirmación de casos sospechosos de meningitis, encefalitis o fiebre inexplicable por enterovirus.

La RT-PCR es una prueba cuya realización es rápida, y en casos de ser positivo el resultado para enterovirus, descarta infección bacteriana y apoyaría el retiro racional de medicamentos que se emplean cuando se sospecha de infección bacteriana. En ausencia de complicaciones en la evolución de casos confirmados con esta prueba RT-PCR enteroviral puede acortarse la estancia en el hospital.

Esta prueba no la realiza el laboratorio clínico del Hospital, por lo que es necesario si esta de acuerdo la autorización para realizarla. Si esta de acuerdo se pedirá a alguno de los padres proporcionen información para la realización de la historia clínica completa del paciente. A todos los pacientes con diagnósticos de probable infección del sistema nervioso central se les realiza en forma rutinaria de no existir contraindicación alguna, punción lumbar, procedimiento necesario para el diagnóstico; y consiste en la extracción de líquido cefalorraquídeo, con el fin de obtener muestras que son necesarios para establecer el diagnóstico, como son cultivo, coagulación, tinción de gram, y citoquímico de LCR para bacterias; y se tomarán 10 gotas de LCR para la prueba de RT-PCR y 1ml para carga viral en LCR.

La punción lumbar será realizada por personal capacitado y con experiencia, la presencia de complicaciones son extraordinariamente raras y se han referido: hematoma (colección de sangre en el sitio de punción), infección en el sitio de la punción, y lesión medular, en caso de ocurrir será manejada la complicación. El resultado de la RT-PCR se le informará y no tiene ningún costo adicional para usted

Esta prueba posiblemente ayudará a tomar medidas más tempranas para realizar el diagnóstico, y es posible que no produzca un beneficio inmediato y que el resultado junto con el de otros pacientes sirva para revisar su utilidad.

Otros estudios al ingreso son: biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos, pruebas de funcionamiento renal, algunos pacientes serán candidatos para su diagnóstico de Tomografía de cráneo o/y resonancia magnética y EEG (electroencefalograma) durante su ingreso o estancia hospitalaria. Las anteriores pruebas y estudios excepto la prueba de RT-PCR forman parte del estudio de pacientes con infección del sistema nervioso central.

Puede no participar en el estudio y al paciente se le tomarán los estudios que indique el médico tratante, sin embargo si decide participar puede ser que el resultado ayude al diagnóstico y tratamiento del paciente.

Se informará a los padres de los resultados de las pruebas del estudio, y toda la información obtenida será confidencial y será usada solo para efectos de investigación. La identidad del paciente será mantenida en anonimato en la medida en que la ley lo permita.

_____ colaborador del proyecto me ha explicado y contestado mis dudas del protocolo, se ha ofrecido contestar, en caso de tener más preguntas, en el hospital o por vía telefónica en el teléfono 57 82-20-88 extensión __23907_____

La participación del paciente es voluntaria y es libre de rehusar a tomar parte o abandonar en cualquier momento el estudio, sin afectar o poner en peligro la atención futura del paciente.

Consiento en participar en el estudio. He recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo.

Padre o madre del paciente

Testigo

Testigo

ANEXO 4

“Detección de enterovirus por RT-PCR en LCR de pacientes pediátricos con infección del sistema nervioso central”

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

NOMBRE _____

EDAD _____

SEXO: Femenino Masculino

Afiliación _____

FECHA DE INGRESO _____

FECHA DE EGRESO _____

Meningitis Viral

Caso confirmado Caso sospechoso Caso probable

ENCEFALITIS ENTEROVIRAL AGUDA

| | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Fiebre > 38° C | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Alteración en el estado de conciencia por más de 24 horas | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Cambios en la personalidad | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Cambios en el comportamiento | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Alucinaciones | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Crisis convulsivas focales o generalizadas | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Sin signos neurológicos de focalización | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Antecedente de enfermedad respiratoria | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Antecedente de enfermedad gastrointestinal | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |

FIEBRE SIN CAUSA EXPLICABLE

| | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Fiebre > 38° C por más de 24 horas sin causa aparente | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Paciente menor de un año de edad | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Irritabilidad de más de 24 horas | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| LCR anormal | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| LCR normal | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |

LIQUIDOCEFALORRAQUIDEO (LCR)

| | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Citoquímico normal | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| LCR anormal : pleocitosis a expensas de mononucleares y glucosa baja | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| LCR alterado: pleocitosis secundaria a polimorfonucleares con glucosa normal o baja | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| LCR con hiperproteínorraquia | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| LCR con pleocitosis e hiperproteínorraquia | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |

CRISIS CONVULSIVAS FEBRILES

| | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Fiebre > 38° C sin causa aparente | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Paciente menor de 6 años de edad | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Crisis convulsivas generalizadas | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| TIPO DE CRISIS EPILEPTICA | | |
| TEMPERATURA CON LA QUE CONVULSIONO | | |
| DURACION DE LA CRISIS | | |
| NUMERO DE CRISIS | | |
| RT-PCR enteroviral en SNC | POSITIVO <input type="checkbox"/> | NEGATIVO <input type="checkbox"/> |

IDENTIFICACION DE ENTEROVIRUS EN LCR POR RT-PCR PANVIRAL

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| RT-PCR en liquido cefalorraquídeo | SI <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|

TIEMPO EN QUE SE REPORTO LA PRUEBA RT-PCR

| | |
|---|--|
| Fecha de recepción de la muestra de liquido cefalorraquídeo | |
| Fecha de entrega del resultado de RT-PCR en LCR | |
| Total de días | |

TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA (TAC):

| Fecha de realización del estudio | Tipo de alteración |
|----------------------------------|--------------------|
| | |
| | |
| | |

ELECTROENCEFALOGRAMA (EEG)

| | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Interpretación del estudio | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| Normal <input type="checkbox"/> | Anormal <input type="checkbox"/> |

ESTANCIA HOSPITALARIA

| | |
|----------------------------|--|
| Fecha de ingreso al HICMLR | |
| Fecha de egreso del HICMLR | |
| Total de días | |

Tabla 1. Manifestaciones clínicas y hallazgos de los estudios de gabinete en los casos de encefalitis por enterovirus

| Paciente | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------------------------|--------|-----------------------|--------------------------------|--------|---|---|--------|
| Fiebre >38° | No | Si | No | Si | Si | Si | Si |
| Alteración del estado de conciencia | Si | No | Si | Si | Si | Si | No |
| Cambios en el comportamiento | Si | No | Si | No | No | Si | No |
| Alucinaciones | Si | No | No | No | Si | Si | No |
| Crisis convulsivas | | | | | | | |
| focales | | | | Si | Si | Si | No |
| generalizadas | Si | Si | Si | | | | |
| Déficit neurológico | Si | Si | Si | No | Si | Si | Si |
| Tomografía computada | Normal | Trombosis seno venoso | Infartos múltiples bilaterales | Normal | Normal | Imagen hipodensa pedunculo cerebeloso | Normal |
| Electroencefalograma | NR* | NR* | NR* | NR* | muy bajo voltaje enmascara ritmo de fondo. Trazo desorganizado lento, paroxismos polipuntas complejas p-o 1.5 Hz. | Paroxismos puntas polipuntas en hemisferio izquierdo en region frontotemporal y occipital predominantemente | NR* |

*NR: No reportado

Tabla 2. Líquido cefalorraquídeo inicial en pacientes con encefalitis

| Paciente | Edad (años) | Aspecto | Células (mm ₃) | Proteínas (mg/dl) | Glucosa (mg/dl) | Eritrocitos (mm ₃) | DHL (mg/dl) |
|----------|-------------|--------------|----------------------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|-------------|
| 1 | 7 | Turbio | 5 | NR* | 50 | 3+ | 47 |
| 2 | 5 | Agua Roca | 2 | 15 | 75 | 0 | NR* |
| 3 | 3 | Transparente | 4 | 30 | 90 | 0 | NR* |
| 4 | 8 | Transparente | 3 | 46 | 70 | 0 | NR* |
| 5 | 4 | Agua roca | 10 | 46 | 104 | 0 | 47 |
| 6 | 13 | Transparente | 4 | 35.1 | 73 | 0 | 25 |
| 7 | 9 | Transparente | 13 | 0.1 | 46 | 0 | 18 |

*NR: no reportado

TABLA 3. Resultados de PCR cuantitativa y cualitativa en pacientes con encefalitis

*Unidades por microlitro

| PCR | Pacientes | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>CMV</i> | | | | | | | |
| <i>No detectable</i> | x | | | | | | |
| <i>Muestra insuficiente</i> | | | | x | | | |
| <i>< 600 copias*</i> | | x | X | | x | x | X |
| <i>Epstein Barr</i> | | | | | | | |
| <i>No detectable</i> | | | | | | | |
| <i>Muestra Insuficiente</i> | | | | x | | | |
| <i>< 125 copias*</i> | X | x | X | | x | x | X |
| <i>Herpes Simple 1 y 2</i> | | | | | | | |
| <i>Positivo</i> | | | | | | | |
| <i>Negativo</i> | X | x | X | x | x | x | x |