

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Detección de herpesvirus en pacientes inmunocomprometidos con meningoencefalitis, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Dra. Vivian Kourí,¹ Lic. Carlos Suárez,² Dra. Sonia Resik³ y Téc. Serafina García⁴

RESUMEN

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) múltiple para detectar, en un solo tubo de reacción, la presencia del virus de herpes simple (VHS), Citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la varicela zóster (VVZ) y/o el virus del herpes humano 6 (VHH6). Cincuenta líquidos cefalorraquídeos de pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y con sospecha clínica de meningoencefalitis por el VHS, recibidos en el Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" entre los años 1993 y 1996 fueron analizados; de éstos, 4 resultaron positivos al VHS, 3 a CMV, 2 al VVZ y 1 al VHH6, para 20 % de positividad. Se correlacionaron los resultados de la RCP con los hallazgos clínicos que presentaban los pacientes en el momento que se les realizó la punción lumbar. La introducción de esta técnica en el laboratorio permite contar con una herramienta útil, por su sencillez y rapidez, para el diagnóstico de las meningoencefalitis por herpesvirus.

Descriptor DeCS: REACCION EN CADENA POR POLIMERASA/métodos; MENINGOENCEFALITIS/diagnóstico; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA/líquido cefalorraquídeo; INFECCIONES OPORTUNISTAS RELACIONADAS CON SIDA; INFECCIONES POR HERPESVIRIDAE; HERPESVIRIDAE/aislamiento & purificación.

Se conoce que existen hasta el momento actual 8 herpesvirus que afectan al hombre. Éstos son el virus tipo 1 del herpes simple (VHS1) y el tipo 2 (VHS2), el virus de la varicela zóster (VVZ), el Citomegalovirus (CMV), el virus del herpes humano 6 (VHH6), el virus del herpes humano 7 (VHH7), el virus de Epstein-Barr (VEB) y el herpesvirus humano 8 (VHH8) recientemente descrito y que se encuentra asociado con el Sarcoma de Kaposi.¹⁻³ A pesar de que algunas de las enfermedades causadas por herpesvirus presentan cuadros clínicos bien definidos, en muchas ocasiones diferentes herpesvirus pueden producir un mismo cuadro clínico lo que hace más difícil su diagnóstico.⁴

Esto reviste gran importancia en los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), donde se conoce que las infecciones oportunistas, dentro de las cuales los herpesvirus desempeñan una

función importante, complican el curso de la enfermedad. Se plantea por algunos autores que cerca de la mitad de las enfermedades oportunistas que afectan el sistema nervioso central (SNC) en los pacientes VIH positivos son ocasionadas por virus, éstas incluyen aquéllas causadas por herpesvirus; fundamentalmente el CMV y en menor número los VHS tipos 1 y 2, y el VVZ. El VHH6 puede ser un patógeno importante en pacientes inmunodeprimidos, así como el VEB, que se ha encontrado con una elevada frecuencia en los linfomas primarios de pacientes con sida.⁵⁻⁷

Obtener un diagnóstico de estas enfermedades en pacientes seropositivos o no al VIH es un gran problema por la baja sensibilidad que tienen los métodos convencionales de cultivo para el LCR.⁸ El examen histológico del tejido cerebral requiere un proceder muy invasivo y sólo está indicado en la minoría de los casos.

¹ Master en Ciencias. Especialista de I Grado en Microbiología.

² Licenciado en Microbiología.

³ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Agregada.

⁴ Técnica en Microbiología.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) ha sido propuesta recientemente para el diagnóstico de algunas enfermedades neurológicas.⁹⁻¹¹

En nuestro trabajo nos proponemos estudiar muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con sida y sospecha clínica de meningoencefalitis por el VHS, para ello se usó la técnica de RCP anidada múltiple, que permite detectar en un solo tubo de reacción diferentes herpesvirus según la talla del producto amplificado.

MÉTODOS

Muestras. Se utilizaron 50 LCRs de pacientes con sida y sospecha clínica de meningoencefalitis por el VHS, que fueron recibidos en el Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) en el período comprendido entre los años 1993 y 1996, y que después de ser procesados para aislamiento viral en el momento en que se recibieron, fueron mantenidos a -70 °C hasta su utilización en este estudio.

Aislamiento viral. Cada uno de los casos fue inoculado por duplicado en cultivo de células Vero (línea celular derivada de riñón de mono verde africano, subcultivos 129 a 135) y posteriormente se le dieron 3 pases a ciegas, durante todo este período se observaron los tubos inoculados a diario.¹²

Reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó otra alícuota de cada caso para realizar una RCP anidada múltiple que permite detectar en un solo tubo de reacción la presencia de VHS, CMV, VVZ, VEB y VHH6, según la talla de la banda de ADN que se observa; se incluye además, como control interno de la reacción 10 000 copias de un plásmido del virus de la pseudorabia porcina (VPR). Tanto para la extracción del ADN como para la RCP se siguió el protocolo del doctor A. Tenorio y otros, del Instituto de Salud "Carlos III" de Majadahonda, Madrid.¹³ Los juegos de oligonucleótidos empleados también fueron donados de forma gentil por esta misma institución, los cuales amplifican un fragmento del gen de la ADN polimerasa viral.¹³

El producto de la RCP fue observado posteriormente, en un gel de agarosa al 4 % utilizando un patrón de peso molecular preparado por Tenorio y otros con casos positivos para los diferentes herpesvirus, lo que permite detectar los distintos tipos de herpes según la talla de la banda de ADN observada. Se utilizaron 2 controles negativos en cada ensayo, los cuales estaban constituidos por agua, uno se trabajó antes que las muestras y el otro al final, para así descartar cualquier contaminación y sólo se dieron como positivos aquellos casos que, al repetirse el ensayo usando otra alícuota de la muestra, resultaron positivos.

Se correlacionaron los resultados de la RCP con el cuadro clínico que presentaban los pacientes en el

momento en que se les realizó la punción lumbar. Para ello se revisaron las historias clínicas de los pacientes que resultaron positivos mediante la RCP, se prestó particular atención a los síntomas y signos neurológicos, resultado de los análisis convencionales así como en los estudios neurorradiológicos.

RESULTADOS

Los 50 LCRs utilizados para el estudio fueron inoculados en células Vero; éstos se pasaron 3 veces en este mismo sistema celular y no se obtuvo efecto citopatógeno durante el período que fueron observados.

Utilizando otra alícuota de las mismas muestras, se realizó una RCP anidada múltiple, se demostró la presencia de ADN de herpesvirus en el LCR de 10 de los 50 pacientes estudiados, para 20 % de positividad.

El VHS fue el que se encontró con mayor frecuencia en estos pacientes reportándose en 4 casos, seguido por el CMV que se encontró en 3 casos; el VVZ se detectó en 2 pacientes y el VHH6 en 1. En nuestro estudio no se reportó ningún caso positivo al VEB (fig.).

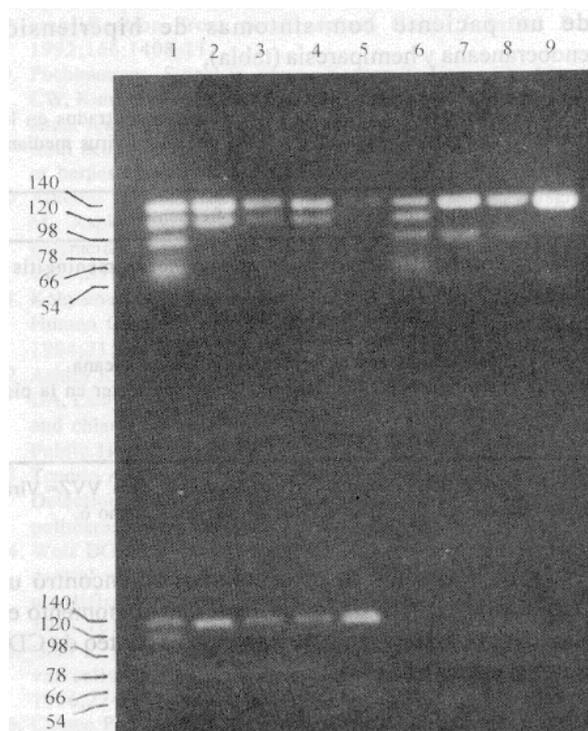


Fig. Resultados de la RCP. Gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio, donde se observan las bandas de ADN correspondientes a los casos que resultaron positivos para los diferentes herpesvirus. VPR 140 pb, VHS 120pb, VVZ 98 pb, CMV 78 pb, VHH6 66 pb y VEB 54 pb. Parte superior: líneas 1 y 6, patrón de peso molecular; líneas 2-5, casos positivos al VHS, líneas 7 y 8, casos positivos al VVZ; línea 9, caso negativo. Parte inferior: línea 1, patrón de peso molecular; líneas 2-4, casos positivos a CMV; línea 5, caso positivo al VHH6.

Las formas clínicas que más frecuentemente se encontraron asociadas con el VHS fueron la encefalitis (2 casos) con manifestaciones de hipertensión endocraneana y en 1 de ellos con trastornos del lenguaje y el pensamiento, así como la meningitis y mielitis que fueron constatadas en los otros 2 casos. De los 4 pacientes estudiados, 3 tenían lesiones genitales activas por el VHS.

De los 3 casos reportados como positivos para el CMV sólo pudimos recuperar los datos clínicos en 2, donde las manifestaciones clínicas que se presentaron eran de retinitis por CMV y en 1 de ellos había además un diagnóstico clínico presuntivo de citomegalovirus generalizada. Estos pacientes presentaban en el momento de la punción lumbar manifestaciones de hipertensión endocraneana.

Los 2 casos que resultaron positivos al VVZ presentaban manifestaciones de meningoencefalitis, y en 1 de ellos aparecieron varios días antes de presentarse el cuadro encefálico, lesiones en la cara y el cuello sugestivas de ser producidas por el VVZ o el VHS. En 1 caso se pudo demostrar la presencia del VHH6 en el LCR, éste se trataba de un paciente con síntomas de hipertensión endocraneana y hemiparesia (tabla).

TABLA. Hallazgos clínicos más frecuentes encontrados en los pacientes que resultaron positivos a los diferentes virus mediante la RCP

Virus	Manifestaciones clínicas más frecuentes
VHS	Encefalitis, hipertensión endocraneana meningitis y mielitis Lesiones genitales activas por el VHS
CMV	Retinitis, citomegalovirus generalizada Manifestaciones de hipertensión endocraneana
VVZ	Meningoencefalitis, lesiones de herpes zóster en la piel
VHH6	Hipertensión endocraneana y hemiparesia Criptococosis cerebral previa

VHS= Virus del herpes simple. CMV= Citomegalovirus. VVZ= Virus de la varicela zóster. VHH6= Virus del herpes humano 6.

En todos los casos estudiados se encontró un gran deterioro físico de los pacientes en el momento en que se les realizó la punción lumbar y el conteo de CD4 también estaba muy bajo.

DISCUSIÓN

Utilizando el aislamiento viral en el cultivo de los LCRs no se pudo detectar la presencia de ningún caso positivo al VHS, lo cual ha sido reportado previamente,¹⁴⁻¹⁶ ya que es conocido que en los casos de encefalitis sin

toma meníngea puede no detectarse virus en el LCR;¹⁴ además, cuando éste está presente se encuentra en muy bajas concentraciones, lo que dificulta el diagnóstico por esta vía. Por otra parte, el CMV y el VVZ no crece bien en células Vero sino en fibroblastos, y el VHH6 en células de origen linfóide. Se utilizaron las células Vero porque los casos habían sido enviados a nuestro laboratorio con sospecha de meningoencefalitis por el VHS y este sistema celular es el empleado para el aislamiento de este virus; sin embargo, al realizar la RCP pudimos demostrar que las manifestaciones clínicas que presentaban los pacientes no habían sido producidas, en todos los casos, por el VHS. Otro factor que puede influir en que los casos positivos al VHS hayan resultado negativos por cultivo, es el hecho de que una parte de estas muestras se encontraban congeladas a -70 °C desde hacía varios años; no obstante, se debe señalar que en el momento en que se recibieron y se inocularon también habían resultado negativas.

El porcentaje de positividad encontrada al realizar la RCP (20 %) coincide con lo reportado por otros autores en estudios previos.^{16,17}

El virus que más frecuente se encontró fue el VHS seguido por el CMV y el VVZ, lo cual no coincide en su totalidad con lo reportado por la mayoría de los autores. Se plantea que en inmunodeprimidos el herpesvirus aislado con mayor frecuencia es el CMV, seguido por el EBV y el VVZ, y en último lugar está el VHS.¹⁶ El herpes 6 también se ha reportado en pacientes inmunodeprimidos afectando el SNC,^{6,16} aunque existen otros estudios donde aparece el VHS como el virus aislado el mayor número de veces en el LCR de pacientes con encefalitis, seguido por el CMV y el VVZ.¹⁷

En nuestro estudio no diferenciamos entre los VHS tipos 1 y el 2, pero por los hallazgos clínicos encontrados, en 2 de los casos habían manifestaciones con predominio encefálico, las cuales son producidas de forma general por el herpes tipo 1,¹⁸ por lo que pensamos que en estos 2 pacientes, el virus causante de la encefalitis pudiera ser el VHS tipo 1. En los otros 2 casos, las manifestaciones eran principalmente de tipo meníngeo y con toma medular; que se encuentran más asociadas al tipo 2,¹⁸ además, se detectó la presencia de lesiones activas por VHS en estos pacientes, esto nos hace pensar que en estos 2 pacientes el cuadro se deba al VHS tipo 2.

En 2 de los 3 casos asociados con el CMV se constató la presencia de lesiones retinianas por CMV. *Cinque* y otros, *Wolf* y otros, y *Roedel* y otros, han reportado la alta frecuencia de infecciones del SNC por CMV en pacientes positivos al VIH, y en Cuba se ha encontrado de forma reiterada como hallazgo de necropsia en pacientes con sida.^{14,16,19,20}

Los 2 casos positivos al VVZ tenían manifestaciones de meningoencefalitis, lo cual ha sido reportado por otros autores.^{16,17,21} Las lesiones en la piel causadas por el VVZ pudieron ser constatadas en 1 de los pacientes que resultaron positivos a este virus en LCR. En el otro caso no aparecieron lesiones en la piel, lo que ha sido reportado con anterioridad.²¹⁻²³

En los reportes de otros autores se ha encontrado la presencia del VHH6 en el LCR, tanto de individuos sanos como de pacientes con afecciones del SNC,²⁴ en especial en individuos inmunodeprimidos, produciendo cuadro de encefalitis,^{6,25} en nuestro caso el paciente presentaba manifestaciones neurológicas que pudieran ser compatibles con las causadas por este virus aunque este paciente también presentaba una criptococosis cerebral diagnosticada previamente, que pudiera haberse reactivado en este momento.

Es de señalar que para tener un diagnóstico certero de la enfermedad, se debe detectar la producción intratecal de anticuerpos, pero para ello es necesario hacer de forma previa un índice de albúmina que nos permita conocer si la barrera hematoencefálica se encuentra o no dañada, con lo cual tendría o no valor el título de anticuerpos en el LCR. En nuestro caso no fue posible realizar esta prueba ya que, como el estudio fue retrospectivo, no contábamos con sueros de estos pacientes tomados en el mismo momento en que se les realizó la punción lumbar, por lo que resultaba imposible determinar el índice de albúmina.

Este trabajo nos permite demostrar la gran importancia de la técnica de RCP para el diagnóstico de las meningoencefalitis causadas por herpesvirus, ya que sin dudas, esta técnica posibilita contar con una herramienta muy útil para el diagnóstico de estas entidades, que con las técnicas habituales de cultivo son prácticamente imposibles de diagnosticar. Además, el hecho de poder hacer el diagnóstico de diferentes herpesvirus en una misma reacción de amplificación, nos permite tener un resultado en 24 h de cualquier afección ocasionada por estos virus, para imponer la terapéutica específica, y evitar así la muerte del paciente.

SUMMARY

The multiple polymerase chain reaction technique was used to detect in a single assay tube the presence of herpes simplex virus (HSV), Citomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV), varicella zoster virus (VZV), and/or human herpes virus-6 (HHV6). 50 cerebrospinal fluids from patients with AIDS and clinically suspected to have meningoencephalitis due to HSV were received and analyzed at the laboratories of Sexually Transmitted Diseases of the Virology Department of the "Pedro Kourí" Tropical Medicine Institute from 1993 to 1996. 4 of them were positive to HSV, 3 to CMV, 2 to VZV, and 1 to HHV6 for a positivity of 20 %. The results of the PCR were correlated to the clinical findings presented by the patients at the time of the lumbar

puncture. The introduction of this technique in the laboratory allows to have an easy, fast and useful tool for the diagnosis of meningoencephalitis due to herpesvirus.

Subject headings: POLYMERASE CHAIN REACTION/methods; MENINGOENCEPHALITIS/diagnosis; ACQUIRED IMMUNO-DEFICIENCY SYNDROME/cerebrospinal fluid; AIDS-RELATED OPPORTUNISTIC INFECTIONS; HERPESVIRIDAE INFECTIONS; HERPESVIRIDAE/isolation & purification.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roizmann B, Descroiers RC, Fleckenstein B, López C, Minson AC, Studdert MJ. The family herpesviridae: an update. *Arch Virol* 1992;123:425-49.
2. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Identification of herpesvirus like sequences in AIDS-associated Kaposi sarcomas. *Science* 1994;226:1865-9.
3. Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus like DNA sequences in patients with those without HIV infection. *N Engl J Med* 1995;332:1181-5.
4. WHO Meeting. Diagnosis of human herpesviruses: Memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1991;69:277-83.
5. Petit CK, Cho ES, Lemann W, Navia BA, Price RW. Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an autopsy review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;45:635-46.
6. Knox KK, Carrigan DR. Active human herpesvirus 6 (HHV-6) infection of the central nervous system in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviruses* 1995;9:69-73.
7. Mc Mahon EME, Glass JD, Hayward SD. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991;338:969-73.
8. Cinque P, Vago L, Brytting M, Castagna A, Accordini A, Sundqvist V, et al. Cytomegalovirus infection of the central nervous system in patients with AIDS: diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992;166:1408-11.
9. Puchhammer- Stöckl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mandl CW, Kunz C. Detection of varicella-zoster DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chicken pox or herpes-zoster. *J Clin Microbiol* 1991;29:1513-6.
10. Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Staland Å, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1991;337:189-92.
11. Kohyama J, Kajiwara M, Shimohira M, Iwakawa Y, Okawa H. Human CMV DNA in cerebrospinal fluid. *Arch Dis Child* 1994;71:414-8.
12. Ashley RL. Herpes simplex viruses. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette E, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 6 ed. Washington DC: American Public Health Association, 1995:375-95.
13. Tenorio A, Echevarría JE, Casas I, Echevarría JM, Tabarés E. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993;44:261-9.
14. Wolf DG, Spector SA. Diagnosis of human cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992;166:1412-5.
15. Gold E. Serologic and virus isolation studies of patients with varicella or herpes zoster infection. *N Engl J Med* 1996;274:181-5.

16. Cinque P, Vago L, Dahl H, Brytting M, Terreni MR, Fornara C, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic disease of the central nervous system in HIV infected patients. *AIDS* 1996;10:951-8.
17. Bergstrom T, Olofsson S, Studahl, M, Kyllerman M, Darin N, Martinell J, et al. Gene amplification in viral CNS infection. Rapid diagnostic identification of herpesviruses. *Lakartidningen* 1995;92:427-32.
18. Shoji H, Koga M, Kusuhara T, Kaji M, Ayabe M, Hino H, et al. Differentiation of herpes simplex virus 1 and 2 in cerebrospinal fluid of patients with Herpes simplex virus encephalitis and meningitis by stringent hybridization of PCR-amplified DNAs. *J Neurol* 1994;241:526-30.
19. Roedel C, Grob R, Ruef C. Clinical value of a polymerase chain reaction on CMV DNA in cerebrospinal fluid in HIV patients with neurological symptoms *Schweiz Med Wochenschr* 1995;125:846-53.
20. Pérez J, Torres R, Terry H. HIV infection in Cuba. *AIDS und HIV Infektionen II Erg Lfg* 1993;8:1-9.
21. Shoji H, Honda Y, Murai I, Sato Y, Oizumi K, Hondo R. Detection of varicellazoster virus DNA by PCR in CSF of patients with herpes zoster meningitis. *J Neurol* 1992; 239:69-70.
22. Casas I, Tenorio A, Ory F de, Lozano A, Echevarría JM. Detection of both Herpes simplex and Varicella-Zoster viruses in cerebro-spinal fluid from patients with encephalitis. *J Med Virol* 1996;50:82-92.
23. Echevarría JM, Casas I, Tenorio A, Ory F de, Martínez-Martín P. Detection of varicella-zoster virus specific DNA sequences in cerebrospinal fluid from patients with acute aseptic meningitis and no cutaneous lesions. *J Med Virol* 1994;43:331-5.
24. Luppi M, Barozzi P, Maiorana A, Marasca R, Trovato R, Fano R, et al. Human Herpesvirus-6: a survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neurological tumors. *J Med Virol* 1995;47:105-11.
25. Knox KK, Harrington DP, Carrigan DR. Fulminant human herpesvirus six encephalitis in a human immunodeficiency virus infected infant. *J Med Virol* 1995;45:288-92.

Recibido: 28 de agosto de 1997. Aprobado: 2 de febrero de 1998.
 Dra. *Vivian Kourí*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí",
 Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.