

Diagnóstico de meningoencefalitis por virus herpes simple tipo 1 mediante PCR anidada en muestras de LCR

Flor Hidalgo, Rafael Cimadevilla, Santiago Melón, María de Oña, Guillermo Viejo, Isabel Blanco y Ana Martínez

Sección de Virología. Servicio de Microbiología I. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

OBJETIVO: El objetivo de este estudio ha sido diagnosticar precozmente las alteraciones neurológicas causadas por el virus herpes simple tipo 1 (VHS-1), utilizando la técnica de PCR anidada en LCR.

PACIENTES Y MÉTODOS: Desde enero de 1994 a octubre de 1995, se estudiaron en nuestro laboratorio 140 LCR pertenecientes a otros tantos pacientes: 95 diagnosticados de meningoencefalitis viral (grupo A) y 45 con otras patologías neurológicas (grupo B). En todos los casos se realizó PCR anidada de VHS-1 y cultivo viral convencional.

RESULTADOS: En el grupo A se obtuvo el diagnóstico de laboratorio en 13 pacientes (13,68%) en 12 (12,63%) se detectó genoma de VHS-1 por PCR anidada y en un paciente se aisló adenovirus.

En el grupo B se detectó genoma de VHS-1 por PCR en 2 pacientes (4,44%).

CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos muestran la utilidad de la PCR anidada de VHS-1 para el diagnóstico de meningoencefalitis herpética en los estadios iniciales de la enfermedad, disponiendo de una única muestra de LCR.

Palabras clave: PCR anidada. VHS-1. Meningoencefalitis. Neuropatía.

Diagnosis of meningoencephalitis by the herpes simplex virus type 1 by anidated PCR in LCR samples

BACKGROUND: The aim of this study was to achieve the early diagnosis of the neurologic alteration caused by the Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) with the anidated PCR technique in LCR.

PATIENTS AND METHODS: From January, 1994 to October, 1995, 140 LCR from 140 patients were studied in our laboratory. Ninety-five were diagnosed with viral meningoencephalitis (Group A) and 45 with other neurologic diseases (Group B). Anidated PCR of HSV-1

and conventional viral cultures were carried out in all the cases.

RESULTS: Laboratory diagnosis was achieved in 13 (13.68%) of Group A patients: in 12 (12.63%) HSV-1 genoma was detected by anidated PCR and in one patient adenovirus was isolated. In Group B, the HSV-1 was detected by anidated PCR in 2 patients (4.44%).

CONCLUSIONS: The results obtained demonstrate the usefulness of anidated PCR in HSV-1 infection for the diagnosis of herpetic meningoencephalitis in initial stages of the disease, from a single LCR sample.

Key words: Anidated PCR. HSV-1. Meningoencephalitis. Neuropathy.

Introducción

El VHS-1 es un virus neurotrópico, que origina alteraciones neurológicas centrales y periféricas¹. Es considerado el agente etiológico de un 10-20% de las meningoencefalitis virales y se cree que puede estar relacionado con otras patologías neurológicas tradicionalmente consideradas idiopáticas²⁻⁹. En las meningoencefalitis herpéticas, su detección precoz es de vital importancia ya que alcanza una tasa de mortalidad superior al 70% sin tratamiento adecuado. La baja sensibilidad del cultivo viral del LCR en estos casos, la tardía aparición de anticuerpos de producción intratecal, cuando se producen, y la agresividad de la biopsia cerebral hacen que la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en LCR sea el método diagnóstico de elección por su alta sensibilidad y por la posibilidad de obtener dicho diagnóstico a partir de una única muestra, desde estadios tempranos de la enfermedad¹⁰⁻¹⁹. En el presente estudio, se compara el cultivo viral convencional con una PCR anidada de VHS-1 basada en el método descrito por Aurelius en muestras de LCR²⁰.

Pacientes y métodos

Desde enero de 1994 a octubre de 1995, se estudiaron 140 LCR pertenecientes a otros tantos pacientes: 95 con sospecha de meningoencefalitis viral (grupo A) y 45 con otras patologías neurológicas (grupo B): 2 mielitis, una enfermedad desmielinizante, 2 polirradiculoneuritis, 1 cerebelitis, 4 accidentes cerebrovasculares, 2 crisis epilépticas, 3 migrañas, un traumatismo craneoencefálico, una neuropatía, una parálisis facial, 3 esclerosis múltiples, una esclerosis lateral amiotrófica, una hipertensión intracraneal benigna, 2 síndromes de Guillain-Barré, 10 encefalopatías por HIV, 2 toxoplasmosis cerebrales, 3 meningitis tuberculosas y 5 meningitis bacterianas. En todas las muestras se realizó PCR anidada de VHS-1 y cultivo viral convencional.

Correspondencia: Dra. F. Hidalgo.
Sección de Virología. Servicio de Microbiología I.
Hospital Central de Asturias.
Celestino Villamil, s/n.
33006 Oviedo. Asturias.

Manuscrito recibido el 11-4-1997; aceptado el 10-9-1997.

Enferm Infecc Microbiol Clin 1997; 15: 532-535.

TABLA 1. Oligonucleótidos del gen de la glucoproteína D del VHS-1

		Situación
BJHSV1.1	5' ATCACGGTAGCCCGGCCGTGTGACA 3'	(19-43)
BJHSV1.2	5' CATACCGGAACGCACCACACAA 3'	(239-218)
BJHSV1.3	5' CCAACCGACCACACCGACGA 3'	(51-71)
BJHSV1.4	5' GGTAGTTGGTCGTTTCGCGCTGAA 3'	(188-166)
BJHSV1 sonda	5' TACGAGGAGGAGGGGTATAACAAAGTCTGT 3'	(96-125)

PCR anidada

Se añadieron 10 µl de LCR previamente tratado con calor a una mezcla reactiva conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de cloruro potásico, 1,5 mM de cloruro magnésico, 1 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Gibco BRL, Paisley, Escocia, RU), 125 µM de cada desoxinucleótido trifosfato y 0,25 µM de cada oligonucleótido externo²⁰ (BJHSV1.1 y BJHSV1.2; estos oligonucleótidos pertenecen al gen de la glucoproteína D del VHS-1) (tabla 1). Cada muestra de LCR fue ensayada en paralelo con la mezcla anteriormente descrita y con una mezcla reactiva idéntica preparada con antelación y almacenada a -20 °C hasta el momento de uso. En todos los ensayos de PCR se tomaron las precauciones y medidas habituales para evitar contaminaciones²¹. La primera amplificación constó de 22 ciclos con un perfil térmico de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hidridación a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 10 min. La segunda amplificación se realizó en el mismo tubo de reacción añadiendo 1 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante y 25 µM de cada uno de los oligonucleótidos internos²⁰ (BJHSV1.3 y BJHSV1.4) (tabla 1), llevándose a cabo la segunda amplificación, con la que se obtiene un fragmento de 138 pb. Esta segunda amplificación constó de 35 ciclos con un perfil térmico de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hidridación a 61 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min. Se sometieron a electroforesis 10 µl del producto final de la PCR anidada en un gel al 3% de agarosa (NuSieve GTG; FMC Bioproducts, EE.UU.) con un bromuro de etidio observándose los resultados con luz ultravioleta (fig. 1).

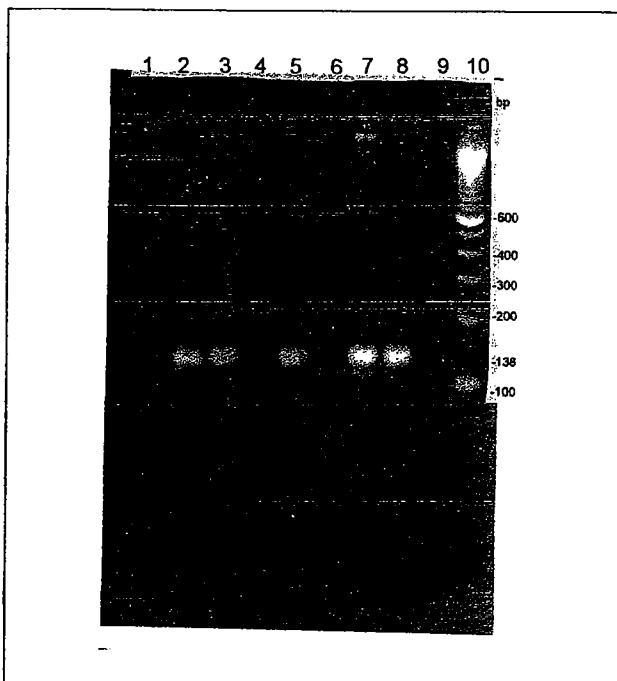


Figura 1. Amplificación por la PCR anidada de VHS-1 en muestras de LCR. En las calles 2, 3, 5 y 7 se observa una banda de 138 pb, que corresponde con el amplificado de VHS-1. En la calle 8 se encuentra el control positivo. En las calles 1, 4 y 6 se encuentran LCR negativos. En la calle 9 se encuentra el control negativo. La calle 10 muestra el control de pesos moleculares 100 pb DNA ladder.

Hibridación

Se trataron 5 µl del producto amplificado con 200 µl de un tampón de NaOH 0,4 y EDTA 10 mM durante 15 min a temperatura ambiente para desnaturalizar el DNA. Transcurrido este tiempo las muestras se trasladaron a una membrana de nailon por el método *dot blot*, que posteriormente fue lavada en 2X SSC, fijada con luz ultravioleta durante 30 min y mantenida a 4 °C hasta el momento de la hibridación. Antes de realizar la hibridación, la membrana se incubó en tampón de prehibridación (un 2% de dodecil sulfato sódico, 2X PBS, 5X de solución de Denhardt, 1 mM EDTA, 40 µg DNA de esperma de salmón/ml) a 65 °C durante 30 min y posteriormente se hibridó durante 60 min a 59 °C en tampón de hibridación (un 2% de dodecil sulfato sódico, 2X PBS, 5X de solución de Denhardt, 1 mM EDTA, sonda 4 µM) con la sonda marcada con fósforo radiactivo²⁰ (tabla 1). Realizada la hibridación la membrana se lavó cuatro veces consecutivas: la primera a temperatura ambiente durante 10 min con 2X PBS y 1mM EDTA; la segunda y tercera vez a la temperatura de hibridación durante 10 min cada una con 2X PBS, 1 mM EDTA y un 1% dodecil sulfato sódico, y la cuarta vez a temperatura ambiente durante 5 min con PBS. Finalmente, la membrana fue autorradiografiada durante 24 h a -70 °C con una película Kodak XRP (fig. 2).

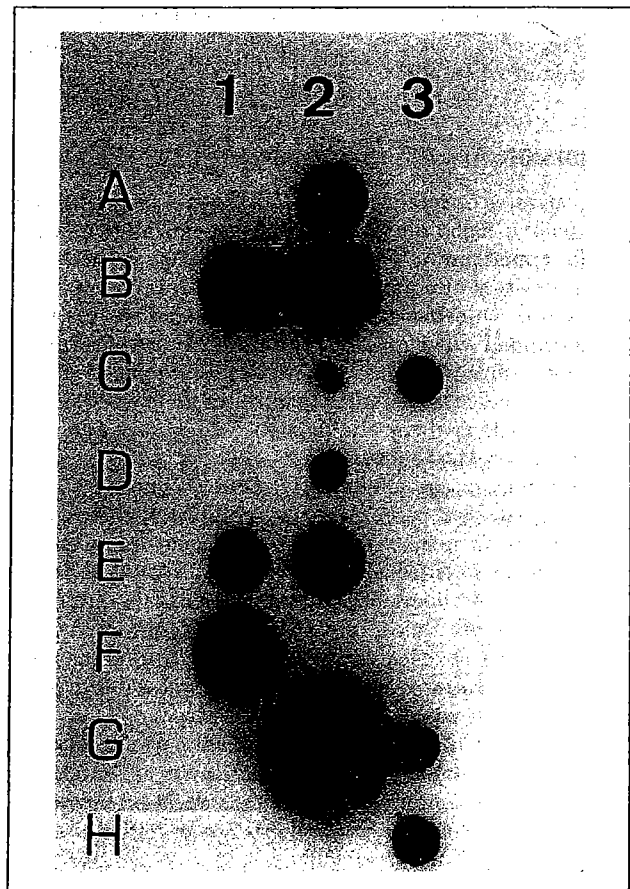


Figura 2. Resultados de muestras de LCR del grupo A amplificadas por PCR anidada tras la hibridación con la sonda radiactiva.

Cultivo viral

Se inocularon en 2 líneas celulares 300 µl de LCR: células diploides de fibroblastos humanos (MRC-5; Vircell-Ingelheim Diagnostic, Granada, España) y células de riñón de mono verde (Vero; Vircell-Ingelheim Diagnostic, Granada, España). Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, siendo examinados cada 72 h. Cuando se observó el efecto citopático (ECP), se procedió a realizar una inmunofluorescencia para identificar el aislado viral. El cultivo viral se consideró negativo cuando después de 21 días de incubación no se observó ECP.

Resultados

En el grupo A se obtuvo el diagnóstico etiológico en 13 de los 95 pacientes estudiados (13,68%): en 12 (12,63%) se detectó VHS-1 por PCR anidada y en un caso (1,05%) se aisló adenovirus.

En el grupo B se detectó genoma de VHS-1 por PCR anidada en 2 de los 45 pacientes estudiados (4,4%), clínicamente diagnosticados de parálisis facial y mielitis transversa idiopáticas. En los 43 casos restantes, con afectación neurológica central y/o periférica de tipo vascular, traumático, idiopático e infeccioso, tanto la PCR anidada de VHS-1 como el cultivo viral fueron negativos.

Se obtuvieron idénticos resultados con la mezcla reactiva preparada con antelación y almacenada a -20 °C que con la mezcla reactiva preparada inmediatamente antes de realizar la PCR anidada.

En ninguna ocasión la hibridación de los productos de la PCR anidada aumentó la sensibilidad de la misma, siendo coincidentes los resultados obtenidos por hibridación con los observados mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Discusión

La meningoencefalitis herpética puede presentar un gran polimorfismo clínico, al tiempo que existen patologías que la mimetizan²³⁻²⁶. Representa un 10-20% de las encefalitis virales y, aunque se dispone de un tratamiento antiviral eficaz, en estos casos sigue manteniéndose una tasa de mortalidad superior al 30% y más del 50% de los supervivientes sufren secuelas^{8,26}. Una técnica diagnóstica sensible y específica en estadios tempranos de la enfermedad nos permitiría realizar el diagnóstico de certeza e instaurar un tratamiento adecuado.

Hasta hace pocos años, las técnicas diagnósticas eran agresivas (biopsia cerebral), poco sensibles (cultivo viral, detección de antígeno viral en LCR) o sólo útiles en etapas avanzadas de la enfermedad (producción intratecal de anticuerpos, seroconversión). Actualmente, las técnicas de amplificación genómica parecen ofrecer la solución a estos problemas por ser técnicas sensibles y de resultados rápidos^{10-15,22}. En nuestro estudio, en los pacientes del grupo A la PCR anidada realizada sobre una muestra de LCR obtenida en la fase inicial de la enfermedad, permitió el diagnóstico de meningoencefalitis herpética en un 12,63% de los casos, cifra similar a las recogidas en la bibliografía⁸, pero en ningún caso el cultivo viral nos permitió el aislamiento del VHS-1, correspondiendo el único cultivo viral positivo a un aislamiento de adenovirus. Por lo tanto, la mayor sensibilidad de la PCR anidada frente a los métodos diagnósticos tradicionales y ante una sospecha de me-

ningoencefalitis viral de etiología herpética debemos considerar la utilización de esta técnica en el diagnóstico.

Ya mencionamos anteriormente la existencia de neuropatías de etiología incierta como la parálisis facial, el síndrome de Guillain-Barré o la mielitis, que se han relacionado con infecciones virales, habiéndose demostrado experimentalmente en el caso de la parálisis facial una relación con la infección por el VHS-1²⁻⁷.

En nuestro caso, en 2 de los 45 pacientes del grupo B se detectó genoma de VHS-1 por PCR anidada: uno de ellos con parálisis facial y el otro con mielitis transversa. En ambos casos los estudios radiológicos y los parámetros bioquímicos en sangre, orina y LCR fueron normales, descartándose infección por virus varicela-zoster, virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus influenza, HIV y *Borrelia burgdorferi*. Hay que destacar en los antecedentes personales en el caso de la parálisis facial una lúes detectada 3 años antes del cuadro neurológico actual y tratada correctamente.

Por lo tanto, en patologías neurológicas no filiadas y con posible relación con esta infección viral debería plantearse la realización de una PCR anidada de VHS-1 con el fin de obtener el diagnóstico etiológico e instaurar un tratamiento si fuese oportuno. Por otra parte, los resultados obtenidos en la técnica de PCR con una mezcla de reacción almacenada a -20 °C y con la misma mezcla preparada inmediatamente antes de su utilización fueron idénticos, por lo que creemos que disponer de tubos listos para la realización de la PCR simplifica su manejo, evita contaminaciones y acorta el tiempo de obtención de resultados. En nuestro caso, estos hechos se ven reforzados al no ser necesaria la realización de la hibridación con un producto radioactivo.

En resumen, ante alteraciones neurológicas, tanto centrales como periféricas, de posible etiología herpética, consideramos de gran importancia la utilización de la PCR anidada de VHS-1 en una rutina diagnóstica de los laboratorios clínicos, ya que se pueden obtener resultados en estadios muy precoces de la enfermedad disponiendo de una única muestra de LCR¹⁶⁻¹⁹.

Bibliografía

1. Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (second of two parts). *N Engl J Med* 1986; 314: 749-757.
2. Adour KK, Bell DN, Hilsinger RL Jr. Herpes simplex virus in idiopathic facial paralysis (Bell palsy). *JAMA* 1975; 233: 527-530.
3. Spruance SL. Bell palsy and herpes simplex virus [editorial]. *Ann Intern Med* 1994; 120: 1.045-1.046.
4. Murakami S, Mizobuchi M, Nakashiro Y, Doi T, Hatu N, Yanagihara N. Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle. *Ann Intern Med* 1996; 124: 27-30.
5. Llorente JL, Suárez C, De Oña M, Martínez A, Melón S. Herpes simplex virus and experimental facial paralysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 489 S1: 490.
6. Kumagami H. Experimental facial nerve paralysis. *Arch Otolaryngol* 1972; 95: 305-312.
7. Sugita T, Murakami S, Yanagihara N, Fujiwara Y, Hirata Y, Kurata T. Facial nerve paralysis induced by herpes simplex virus in mice: an animal model of acute and transient facial paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 574-581.
8. Whitley RJ. Viral encephalitis. *N Engl J Med* 1990; 323: 242-250.
9. Whitley RJ, Schlitt M. Encephalitis caused by hyperviruses, including B virus. En: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT, editores. *Infections of the central nervous system*. Nueva York: Raven Press, 1991; 41-86.

10. Bos CA, Olding-Stenlvist E, Wilterdink JB, Scheffeer AJ. Detection of viral antigens in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex virus encephalitis. *J Med Virol* 1987; 21: 169-178.
11. Lakeman FD, Koga J, Whitley RJ. Detection of antigen to herpes simplex virus in cerebrospinal fluid from patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis* 1987; 155: 1.172-1.178.
12. MacCallum FO, Chinn IJ, Gostling JVT. Antibodies to herpes-simplex virus in the cerebrospinal fluid of patients with herpetic encephalitis. *J Med Microbiol* 1974; 7: 325-331.
13. Forsberg P, Kam-Hansen S, Fryden A. Production of specific antibodies by cerebrospinal fluid lymphocytes in patients with herpes zoster, mumps meningitis and herpes simplex virus encephalitis. *Scand J Immunol* 1986; 24: 261-271.
14. Fishman RA. No, brain biopsy need not be done in every patients suspected of having herpes simplex encephalitis. *Arch Neurol* 1987; 44: 1.291-1.292.
15. Hanley DF, Johnson RT, Whitley RJ. Yes, brain biopsy should be a prerequisite for herpes simplex encephalitis treatment. *Arch Neurol* 1987; 44: 1.289-1.290.
16. Aslanzadeh J, Osmon DR, Wilhelm MP, Espy MJ, Smith TF. A prospective study of the polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid submitted to the clinical virology laboratory. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 367-373.
17. Klapper PE, Cleator GM, Dennett C, Lewis AG. Diagnosis of herpes encephalitis via southern blotting of cerebrospinal fluid DNA amplified by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1990; 32: 261-264.
18. Rozenberg F, Lebon P. Amplification and characterization of herpes virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2.412-2.417.
19. Puchhammer-Stöckl E, Heinz FX, Kundi M et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of herpes simplex virus encephalitis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 146-148.
20. Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1991; 337: 189-192.
21. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature (Londres)* 1989; 339: 237-238.
22. Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, Wolinsky SM. Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990; 335: 440-441.
23. Laurent B, Allegri RF, Michel D, Trillet M, Naegele-Faure B, Foyatier N et al. Encephalitis herpétiques a predominance unilaterale. Etude neuropsychologique an long cours de 9 cas. *Rev Neurol (Paris)* 1990; 146: 671-681.
24. Dubas F, Penisson-Besnier I, Pouplard-Barthelaix A, Le Gall D, Emile J. Un cas clinico-pathologique d'encephalite herpetique lentement progressive sans necrose temporale. *Rev Neurol (Paris)* 1989; 145: 808-810.
25. Brochet B, Henry P, Piquemal-Balnard A, Dupasquier P. Encephalitis herpetique a rechutes. *Rev Neurol (Paris)* 1990; 146: 450-454.
26. Lakeman FD, Whitley RJ and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* 1995; 171: 857-863.