

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

**36.**

**Diagnóstico microbiológico  
de las infecciones del  
sistema nervioso central**

**2 0 1 0**

**Coordinador: Guillem Prats**

**Autores: M<sup>a</sup> Gema Codina  
Marina de Cueto  
Juan Emilio Echevarría  
Diego Vicente**



ISBN-978-84-614-3147-2

## INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

### 1. Introducción

### 2. Clasificación y definiciones

### 3. Recogida, transporte y conservación de las muestras

- 3.1 Obtención
- 3.2 Volumen mínimo
- 3.3 Transporte y conservación
- 3.4 Recepción en el laboratorio

### 4. Meningitis bacterianas agudas frecuentes en niños y adultos

- 4.1 Introducción
- 4.2 Etiopatogenia
- 4.3 Manifestaciones clínicas
- 4.4 Epidemiología
- 4.5 Diagnóstico
- 4.6 Diagnóstico microbiológico
  - 4.6.1 Procesamiento de las muestras
  - 4.6.2 Medios de cultivo e incubación

### 5. Meningitis neonatal

- 5.1 Introducción
- 5.2 Manifestaciones clínicas
- 5.3 Etiopatogenia
- 5.4 Diagnóstico de meningitis en el neonato
- 5.5 Detección de portadoras de *Streptococcus agalactiae*

### 6. Meningitis tuberculosa

- 6.1 Diagnóstico microbiológico convencional
  - 6.1.1 Tinciones
  - 6.1.2 Cultivo
- 6.2 Diagnóstico genómico
  - 6.2.1 Técnicas que incluyen la detección del producto amplificado por hibridación en fase sólida
  - 6.2.2 Amplificación en tiempo real

### 7. Infecciones víricas del sistema nervioso central

- 7.1 Introducción
- 7.2 Etiopatogenia
- 7.3 Manifestaciones clínicas
- 7.4 Epidemiología
- 7.5 Diagnóstico
- 7.6 Diagnóstico microbiológico
  - 7.6.1 Técnicas de detección directa. Cultivo
  - 7.6.2 Técnicas de detección directa. Amplificación genómica
  - 7.6.3 Técnicas serológicas

### 8. Meningitis fúngica y amebiana

- 8.1 Meningitis fúngica
  - 8.1.1 Etiopatogenia
  - 8.1.2 Manifestaciones clínicas
  - 8.1.3 Diagnóstico clínico
  - 8.1.4 Diagnóstico microbiológico
    - 8.1.4.1 Tinciones
    - 8.1.4.2 Cultivo
    - 8.1.4.3 Técnicas serológicas
- 8.2 Infecciones por amebas de vida libre

### 9. Infecciones relacionadas con las derivaciones de LCR

- 9.1 Introducción
- 9.2 Etiopatogenia
- 9.3 Manifestaciones clínicas
- 9.4 Diagnóstico clínico
- 9.5 Diagnóstico microbiológico
  - 9.5.1 Tinción de Gram
  - 9.5.2 Cultivo de LCR
  - 9.5.3 Cultivo del catéter de derivación
  - 9.5.4 Técnicas genómicas

## **10. Absceso cerebral**

10.1 Introducción

10.2 Etiopatogenia

10.3 Manifestaciones clínicas

10.4 Diagnóstico

10.4.1 Diagnóstico por técnicas de imagen

10.4.2 Diagnóstico microbiológico

10.4.2.1 Tinción de Gram

10.4.2.2 Cultivo

10.4.2.3 Serología

10.4.2.4 Técnicas genómicas

## **11. Bibliografía**

## **ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS**

**1. PNT-SNC-01. Procesamiento microbiológico de muestras de líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar o a través de sistemas de derivación**

**2. PNT-SNC-02. Procesamiento microbiológico de muestras de absceso cerebral**

**3. PNT-SNC-03. Diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central**

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **36. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. 2010**

**Coordinador: Guillem Prats**

**Autores: M<sup>a</sup> Gema Codina  
Marina de Cueto  
Juan Emilio Echevarría  
Diego Vicente**

## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso puede infectarse por diferentes microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos. La presentación clínica de estas infecciones puede ser aguda, subaguda o crónica dependiendo de la etiología, la virulencia del microorganismo y la localización del proceso infeccioso. En ocasiones se afecta un único órgano o compartimiento como en el caso del absceso cerebral o la meningitis, y en otros se afectan varios de ellos como en las encefalomyelitis o las meningoencefalitis. Los agentes infecciosos pueden invadir los órganos diana a partir de un foco infeccioso cercano como una otitis, por vía hematogena, siguiendo diversas vías nerviosas, o bien ayudados por la existencia de sistemas de derivación del líquido cefalorraquídeo (LCR) colocados en intervenciones de neurocirugía.

## 2. CLASIFICACIÓN Y DEFINICIONES

Se define como meningitis a la inflamación de las leptomeninges. Las meningitis bacterianas agudas están producidas por microorganismos piógenos y adquiridas en su mayoría en la comunidad. Clásicamente se ha citado a *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* como los agentes más frecuentes, pero el uso sistemático de vacunas frente a *H. influenzae* serogrupo b, *N. meningitidis* serogrupo C o la heptavalente para neumococo ha cambiado la epidemiología en los países desarrollados. Actualmente se puede decir que en nuestro medio los microorganismos más frecuentes en los recién nacidos son *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*; en niños y adolescentes los meningococos, en adultos mayores de 30 años los neumococos y en mayores de 50 años e inmunodeprimidos hay que tener en cuenta también a *L. monocytogenes*. Otras infecciones bacterianas como la tuberculosis, la sífilis o las causadas por *Borrelia burgdorferi* afectan las meninges con mucha menor frecuencia y suelen producir procesos subagudos o crónicos.

Los virus son causa frecuente de meningitis y meningoencefalitis agudas. Distintos virus pueden infectar el sistema nervioso, algunos de ellos de distribución mundial y otros localizados exclusivamente en determinadas áreas geográficas. Entre los que tienen un predominio estacional, los más frecuentes en zonas con clima templado son los enterovirus, y entre los que no lo tienen, los herpesvirus. En pacientes inmunodeprimidos hay que tener en cuenta formas de presentación más crónicas de meningoencefalitis producidas por virus como citomegalovirus, polioma virus y otros.

El absceso cerebral es un proceso supurativo localizado en el parénquima cerebral; es poco frecuente y suele producirse a partir de la extensión de un foco infeccioso contiguo en el oído, en los senos paranasales o en la arcada dentaria, o bien por vía hematogena. Aunque pueden ser de causa monomicrobiana, con más frecuencia suelen estar producidos por una microbiota bacteriana mixta en la que habrá que tener en consideración a diversos

microorganismos aerobios (esencialmente estreptococos) y anaerobios. Otras infecciones localizadas en el sistema nervioso central o entre la duramadre y el cráneo, como el empiema subdural, el absceso epidural o la tromboflebitis séptica de los senos venosos, pueden tener las mismas consideraciones etiopatogénicas.

En diversas circunstancias se efectúan derivaciones del LCR, bien por vía interna o al exterior. La tasa de infección de las derivaciones internas o *shunts* es muy variable según diferentes equipos quirúrgicos y el tipo de paciente, pero se suelen cifrar alrededor del 5-10%, y la derivación externa entre un 5 y un 15%. Los microorganismos más frecuentemente implicados pertenecen a la microbiota de la piel como estafilococos, a los que hay que añadir los bacilos gramnegativos en el caso de las derivaciones externas.

## 3. RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El LCR de un paciente con sospecha de meningitis es la muestra clínica de mayor prioridad en un laboratorio de microbiología clínica y debe ser procesado de manera inmediata en todos los casos. Para su procesamiento es aconsejable seguir las recomendaciones detalladas en el Procedimiento de la SEIMC nº 1 (2ª edición): "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología".

La validez de las muestras recibidas en el laboratorio depende del cumplimiento de una serie de normas relacionadas con el procedimiento de obtención, la cantidad de muestra obtenida y el adecuado transporte.

La toma debe realizarse con las máximas condiciones de asepsia, para evitar la contaminación de la muestra, y ésta no debe ponerse nunca en contacto con antisépticos o desinfectantes.

Siempre que sea posible, el LCR, como el resto de muestras clínicas, debe obtenerse antes de la instauración de tratamiento antibiótico, si bien los procedimientos diagnósticos no deben retrasar jamás su comienzo. El recipiente utilizado debe ser estéril, estar cerrado herméticamente y convenientemente identificado con los datos del paciente y el tipo de muestra. Es muy importante que se aporten los datos clínicos, epidemiológicos y tratamientos previos, relacionados con la petición realizada, para orientar los estudios a realizar y la posterior interpretación de los resultados. Además, en la solicitud se debe anotar la fecha y la hora de la toma de la muestra, así como datos de la persona que hace la extracción.

Para el diagnóstico de las meningitis y encefalitis víricas es aconsejable realizar la toma de una muestra de sangre para la obtención de suero en el mismo momento de la toma del LCR a fin de poder realizar estudios serológicos.

En el caso de pacientes con meningismo y fiebre será preceptiva la obtención de hemocultivos.

### 3.1 OBTENCIÓN

La muestra adecuada para el diagnóstico microbiológico de la meningitis es el LCR, que normalmente se obtiene mediante punción lumbar. La punción lumbar se realizará en condiciones de asepsia rigurosa. Se limpiará la piel en la zona de punción abarcando una superficie de unos 10 cm<sup>2</sup> con alcohol y después se aplicará una solución antiséptica como alcohol yodado, povidona yodada o solución alcohólica de clorhexidina al 0,5%, dejando actuar 1 minuto. La punción se realizará de ordinario en los espacios intervertebrales L3-L4 o L4-L5. El LCR se recogerá en tubos estériles, siempre que sea posible se obtendrán dos tubos, uno para análisis citoquímico y otro para estudio microbiológico, seleccionando siempre el más turbio para la realización de pruebas de diagnóstico microbiológico.

Las muestras de LCR obtenidas en punciones traumáticas o las procedentes de pacientes con hemorragia subaracnoidea pueden coagularse debido al alto contenido hemático, dificultando el recuento celular. En ningún caso deben emplearse tubos heparinizados para recoger las muestras de LCR para los análisis microbiológicos.

En las derivaciones externas, el LCR se obtendrá a través del catéter ventricular o lumbar. Para asegurar la esterilidad, se aplicará un antiséptico en la llave antes de realizar la obtención de la muestra y después de la misma.

En las derivaciones internas, el LCR se obtendrá por punción directa del reservorio o de la válvula, o a través del catéter distal externalizado. La punción del reservorio debe realizarse asimismo con todas las medidas de asepsia para evitar la infección iatrogénica o la contaminación de la muestra. Si hay signos de infección, se debe obtener muestra para cultivo de la herida quirúrgica o decúbitos cutáneos del trayecto del catéter.

En algunos procesos infecciosos del sistema nervioso central se deben recoger otras muestras como pus de los abscesos o biopsias.

### 3.2 VOLUMEN MÍNIMO

Dado el bajo número de microorganismos habitualmente presentes en este tipo de muestras, el volumen disponible condiciona de manera muy clara la sensibilidad de las diferentes técnicas diagnósticas, aunque dada la dificultad en la obtención de estas muestras, cualquier cantidad debe ser aceptada para cultivo. Es muy importante especificar claramente las determinaciones que se solicitan: bacterias convencionales, micobacterias, virus, hongos o parásitos. Debe tenerse en cuenta que cada una de ellas precisa de técnicas específicas y consume una parte del producto que ya no va a estar disponible para las otras determinaciones.

Para el estudio de bacterias o virus habituales se necesita 1 ml en cada caso, y si además deben investigarse hongos o micobacterias es necesario disponer de 2 ml adicionales para cada uno de estos estudios, e idealmente llegar a los 10 ml en total.

En caso de no disponer de cantidad suficiente para realizar estos estudios, se priorizan en función de la sospecha etiológica.

### 3.3 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El transporte se realizará de forma inmediata tras la obtención de la muestra, y la entrega siempre se hará en mano, no debiéndose emplear para ello sistemas de transporte automatizados como el tubo neumático. Las muestras deben procesarse de forma inmediata y en caso de que esto no sea posible se conservarán en la estufa a 35°C ± 2°C o a temperatura ambiente hasta su procesamiento en un plazo máximo de 24 horas. Las muestras de LCR para investigación de virus se conservarán refrigeradas a 2-8°C.

### 3.4 RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO

Una vez que la muestra se recibe en el laboratorio hay que comprobar que cumple los requisitos necesarios para su procesamiento, incluyendo una correcta identificación, volumen y condiciones de transporte y conservación. En el caso del LCR, los criterios de rechazo de la muestra deben reducirse al máximo. No deben aceptarse muestras no identificadas o aquellas en las que los datos no coincidan con los de la solicitud. Tampoco se aceptarán las muestras recogidas en recipientes no estériles ni las conservadas en formol u otros aditivos. Estas incidencias se registrarán adecuadamente y se informarán al médico responsable del paciente.

## 4. MENINGITIS BACTERIANAS AGUDAS FRECUENTES EN NIÑOS Y ADULTOS

### 4.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de las vacunaciones, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* son los principales microorganismos causantes de meningitis bacteriana aguda. Estos dos patógenos son responsables de más del 80% de los episodios que se producen en personas de cualquier edad, excluyendo las edades extremas de la vida. *H. influenzae* tipo b, el tercer microorganismo clásicamente implicado en la etiología de la meningitis bacteriana aguda, especialmente en niños pequeños, apenas causa episodios desde la vacunación sistemática de los niños con la vacuna conjugada. Estos tres microorganismos tienen como hábitat natural la faringe del ser humano, donde residen como comensales. Sólo en ocasiones atraviesan ese espacio, invaden el torrente sanguíneo y causan enfermedad. En los adultos mayores y en los ancianos, aún previamente sanos, no hay que olvidar a *L. monocytogenes*, que en la actualidad constituye un agente etiológico relativamente frecuente. En la meningitis bacteriana aguda, la rápida progresión de los síntomas y los potenciales efectos devastadores hacen que sea necesario un reconocimiento rápido de la enfermedad así como la instauración de un tratamiento inmediatamente después de tomadas las muestras para el diagnóstico. A pesar de los progresos diagnósticos y terapéuticos, la mortalidad sigue siendo muy elevada, con frecuencia superior al

10%, sin que haya podido ser reducida de forma significativa en los últimos años. Además la posibilidad de transmisión de estos patógenos con marcada virulencia, tiene importantes implicaciones de salud pública, tanto a la hora de trabajar con los contactos, como en la identificación de brotes o epidemias. La vigilancia epidemiológica por lo tanto es fundamental, más si cabe en el momento actual, en el que la introducción de vacunas frente a los tres microorganismos principales ha modificado sustancialmente la dinámica de la enfermedad tal y como la hemos contemplado durante años.

#### 4.2 ETIOPATOGENIA

La patogénesis de la meningitis bacteriana aguda es el resultado de la combinación de una serie de factores propios del microorganismo y de los mecanismos de defensa del huésped. El proceso comienza con la colonización de la nasofaringe del huésped. Los tres microorganismos principalmente implicados, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, se transmiten por vía respiratoria y se adhieren al epitelio a ese nivel, lo que genera el estado de portador asintomático. Este estado es extraordinariamente frecuente de forma que entre el 10%-50% de la población tiene la faringe colonizada por alguno de ellos. Sin embargo, sólo algunas cepas con capacidad virulenta, atravesarán la pared faríngea, invadirán el torrente circulatorio, y evadiendo los mecanismos de defensa del huésped causarán enfermedad invasiva, en forma de sepsis y/o meningitis. En el caso de *L. monocytogenes*, la vía de entrada habitualmente es la digestiva. Con menor frecuencia los microorganismos pueden alcanzar directamente el sistema nervioso central tras una sinusitis, otitis media (neumococo), malformaciones, fístulas, traumatismos o lesiones neuroquirúrgicas (neumococo, bacilos gramnegativos y estafilococos). En estos microorganismos la cápsula polisacárida es uno de los principales factores implicados en la virulencia. Los anticuerpos anticapsulares, la activación del complemento, la mucosa epitelial y los niveles de IgA secretora son los mecanismos del huésped que se oponen a la infección. Con toda seguridad las citoquinas desempeñan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria y el daño neuronal. Es característico encontrar niveles elevados de TNF-alfa, interleukina 1, interleukina 6 e interleukina 8 en el LCR de pacientes con meningitis aguda. El desarrollo de vacunas que utilizan como inmunógeno el polisacárido capsular ha cambiado radicalmente la epidemiología de la meningitis bacteriana aguda, sobre todo, tras la introducción de vacunas conjugadas que son inmunógenas incluso desde el primer año de vida, inducen memoria inmunológica y previenen no sólo la infección invasiva sino también la colonización faríngea.

#### 4.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La mayoría de los pacientes con meningitis bacteriana aguda presentan alguno de los síntomas típicos de la meningitis, incluyendo fiebre, cefalea y rigidez de nuca. Además pueden aparecer vómitos,

fotofobia o disfunción mental, que varía desde la somnolencia hasta el coma. Otros signos y síntomas neurológicos como la focalidad neurológica, el compromiso de los pares craneales o el edema de papila son menos frecuentes. Muchas veces el cuadro meníngeo viene precedido por una infección respiratoria alta que es interrumpida por la aparición súbita de los signos y síntomas meníngeos. En la presentación aguda, que es la más habitual, los síntomas son de aparición brusca, y son rápidamente progresivos. En ocasiones, la presentación puede ser subaguda, con un inicio más paulatino, donde alguno de los síntomas puede estar presente de forma más tórpida durante los 7 días previos. En los lactantes y ancianos los signos y síntomas suelen ser más sutiles, siendo frecuente que la meningitis se manifieste como un cuadro febril aislado o acompañado de síntomas inespecíficos como irritabilidad, rechazo del alimento, confusión o apatía. La presentación también suele ser atípica en personas neutropénicas y otros inmunodeprimidos (tratamiento inmunosupresor, trasplantados e infectados por el VIH). Aunque no es posible diferenciar clínicamente las meningitis causadas por los distintos microorganismos implicados, algunos datos pueden resultar muy orientativos. La aparición de manchas cutáneas en forma de petequias es muy sugestiva de infección meningocócica. Las petequias suelen comenzar en las extremidades inferiores y pueden extenderse por todo el cuerpo dando lugar a grandes equimosis, y son un signo del cuadro séptico y del trastorno de la coagulación que acompaña habitualmente a la meningitis meningocócica. El antecedente de otitis o sinusitis los días previos al inicio del cuadro meníngeo, y el antecedente de fractura de la base del cráneo acompañada de rinorrea u otorrea de LCR secundaria a la presencia de fístulas, sugiere la etiología neumocócica. La presencia de *H. influenzae* no capsulado o de episodios de meningitis neumocócica de repetición, debe alertar de la presencia de una fístula anatómica a nivel de base de cráneo (fosa anterior, *tegmen timpani* o mastoides), sea de origen congénito o "espontáneo" sea como secuela de un traumatismo craneal o cirugía otorrinolaringológica, aún muy lejanos en el tiempo. Por último, un pequeño porcentaje de casos puede estar causado por bacilos gramnegativos o *Staphylococcus aureus*. El aislamiento de estos microorganismos en el LCR casi siempre está relacionado con procedimientos neuroquirúrgicos o traumatismo previo.

#### 4.4 EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología de la enfermedad ha cambiado sustancialmente en las dos últimas décadas. La meningitis bacteriana aguda era una enfermedad predominantemente infantil. Sin embargo, la introducción de las vacunas conjugadas en los calendarios de vacunación infantil y la circulación de clones nuevos han desdibujado esta situación, observándose en muchos lugares y en números absolutos, más casos en la población mayor de 14 años que en menores de esta edad.

*N. meningitidis* es la primera causa de meningitis bacteriana en el mundo. En España, como en otros países desarrollados, la enfermedad meningocócica es endémica, con tasas de incidencia anual inferiores a 5 casos por 100.000 habitantes. La meningitis meningocócica es la entidad clínica más común, constituyendo la única forma de meningitis bacteriana que causa epidemias. La sepsis meningocócica grave, aunque es menos frecuente, tiene peor pronóstico que la meningitis, siendo habituales los casos en los que ambas formas, sepsis y meningitis, concurren. La mortalidad de la enfermedad meningocócica es alta, entre el 3%-15%, casi toda ella a causa de la sepsis. En adolescentes y adultos, la mortalidad de la meningitis meningocócica en sí misma no excede del 2%. A pesar de la vacunación, la incidencia más elevada se sigue observando en niños, adolescentes y adultos jóvenes, sin embargo en determinadas zonas el número absoluto de casos es mayor a partir de los 25 años. Aunque todas las personas son susceptibles, las que tienen déficits de factores del complemento, las que reciben tratamiento inmunosupresor y las esplenectomizadas tienen un mayor riesgo. En situación de endemia, aproximadamente el 10% de la población es portador faríngeo asintomático de meningococo. De los trece serogrupos capsulares descritos, cinco (A, B, C, W135 e Y) son los que causan la inmensa mayoría de los episodios de enfermedad. Actualmente se dispone de vacunas útiles frente a cepas de los grupos capsulares A, C, W135 e Y, pero no se dispone de una vacuna eficaz frente al meningococo del grupo B, que es el causante de la mayoría de los casos (>60%) en los países desarrollados. Desde la vacunación sistemática de los niños a partir del año 2000 con la vacuna conjugada frente a meningococo C, los episodios causados por este serogrupo han disminuido considerablemente, pero sin llegar a desaparecer.

*S. pneumoniae* es un colonizador habitual de la faringe. Entre el 5%-10% de los adultos y el 20%-50% de los niños son portadores asintomáticos (en niños que asisten a guarderías es común un porcentaje de portadores superior al 80%). La incidencia de enfermedad neumocócica invasiva, que generalmente se presenta en forma de meningitis o septicemia es más elevada en los extremos de la vida. Al igual que sucede con el meningococo y otras bacterias capsuladas, las personas con trastornos inmunitarios, especialmente déficit de factores del complemento, de la respuesta de anticuerpos o pacientes esplenectomizados, tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad neumocócica invasiva. La diabetes, la malnutrición y el alcoholismo también son factores de riesgo. La mortalidad en la meningitis neumocócica es alta pudiendo superar el 20%, y además el riesgo de secuelas neurológicas (hipoacusia, otros déficits sensoriales y convulsiones) es muy elevado. La administración precoz de dexametasona ha disminuido la alta mortalidad que la meningitis neumocócica tenía en el adulto, persistiendo, no obstante, en alrededor del 15%. En las dos últimas

décadas se ha observado un incremento global en la incidencia de la infección neumocócica invasiva, y en algunos lugares, el neumococo representa la primera causa de meningitis bacteriana aguda. El empleo de la vacuna conjugada heptavalente en los niños ha modificado la epidemiología de la enfermedad. En España la vacunación no ha reducido de forma significativa la incidencia global de la enfermedad invasiva, pero sí ha podido disminuir la tendencia creciente observada en los años precedentes, observándose una llamativa disminución de los serotipos vacunales en los episodios que afectan a la población infantil.

La introducción de la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b en los años 90 ha dado lugar a una desaparición casi absoluta de los portadores faríngeos asintomáticos y de la incidencia de meningitis y otras infecciones invasivas causadas por este agente, de forma que actualmente en nuestro entorno es excepcional la aparición de episodios invasivos. Antes de la introducción de la vacuna, *H. influenzae* tipo b era una causa frecuente de meningitis en niños menores de 5 años. Más del 90% de los episodios asociados a *H. influenzae* estaban causados por este serotipo, mientras que las cepas no capsuladas y las pertenecientes a los otros cinco serotipos descritos causaban infecciones oportunistas en ancianos, o en personas con enfermedades predisponentes. Tras la introducción de la vacuna, los datos recogidos en Europa entre 1995 y 2006 muestran que la incidencia ha disminuido drásticamente, la mayor parte de los escasos episodios de meningitis que se producen están causados por cepas no capsuladas, y afectan sobre todo a adultos, con una mortalidad superior al 10%.

#### 4.5 DIAGNÓSTICO

El examen macroscópico del LCR permite observar el color, la turbidez y la presencia de depósitos y coágulos. El LCR de pacientes con meningitis bacteriana aguda tiene habitualmente un aspecto turbio o purulento y la presión de salida es elevada. El recuento celular muestra la presencia de leucocitos en número variable pero habitualmente cercano a las 1.000 células/mm<sup>3</sup> (valores normales < 5 células/mm<sup>3</sup> en el adulto), con un predominio de los polimorfonucleares (ordinariamente >90%). La meningitis por *L. monocytogenes* constituye una excepción a esta regla, ya que lo más frecuente es que se presente con un LCR claro o ligeramente opalescente, con menos de 1000 células/mm<sup>3</sup> y con un porcentaje significativo, en ocasiones predominante, de linfocitos. Los pacientes con meningitis bacteriana aguda establecida y recuentos celulares bajos (inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>) suelen tener peor pronóstico. El recuento de proteínas es elevado, habitualmente entre 1 y 5 g/L (valores normales <0,45 g/L) y la concentración de glucosa está disminuida en alrededor del 65% de los casos (valores normales 40 mg/dL o aproximadamente el 40% de la glucemia simultánea). Se considera hipoglucorraquia cuando el cociente entre el valor de



la glucosa en el LCR y el suero es inferior a 0,4 (tabla 1).

Algunos parámetros sanguíneos se encuentran alterados. En la sangre periférica se observa leucocitosis con desviación izquierda, niveles elevados de proteína C reactiva y procalcitonina, y especialmente en el caso de la enfermedad meningocócica invasiva es frecuente encontrar alteraciones de las pruebas de la coagulación (plaquetopenia, hipoprotrombinemia o ambas, con o

sin otros datos de coagulación intravascular diseminada).

En principio no está indicado emplear técnicas de imagen para el diagnóstico. Estas se utilizan cuando la duración de los síntomas meníngeos es prolongada, cuando se detecta un foco que puede complicarse con absceso cerebral (como las otitis con colesteatoma, la sinusitis...), cuando existe edema de papila, déficits de vías largas o coma.

**Tabla1.** Hallazgos citoquímicos en el LCR en pacientes con meningitis

Meningitis	Leucocitos (células/mm <sup>3</sup> )	Tipo de leucocitos	Glucosa (mg/dl)	Proteínas (mg/dl)
Vírica	50-100	Mononucleares	>45	<200
Bacteriana	1000-5000	Polimorfonucleares	<40	100-500
Tuberculosa	50-300	Mononucleares	<45	50-300
Criptocócica	20-400	Mononucleares	<40	>45

#### 4.6 DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO

La observación de microorganismos en la tinción de Gram del LCR, aunque es la medida más rápida y directa para orientar el diagnóstico no permite por sí sola confirmar inequívocamente el diagnóstico etiológico.

La confirmación de un caso de meningitis bacteriana aguda se realiza mediante la demostración de la presencia del microorganismo en el LCR, y suele realizarse mediante cultivo o detección del ADN bacteriano. También es posible hacerlo por la detección de antígenos específicos, aunque el empleo de esta técnica para confirmar un episodio es menos recomendable que los dos métodos anteriormente citados. Como ya se ha comentado, en todos los casos sospechosos de meningitis bacteriana aguda, independientemente del resto de medidas, deben obtenerse muestras de sangre para la realización de hemocultivos. La obtención de otras muestras queda sujeta a la presentación clínica de cada caso.

El cultivo del LCR es el método óptimo de confirmación y hoy en día continúa siendo el método de referencia. El aislamiento de la bacteria, además del diagnóstico etiológico, permite la realización de pruebas complementarias, como pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y estudios de tipificación. La principal limitación del cultivo bacteriano es su baja rentabilidad cuando las muestras investigadas provienen de personas que han recibido tratamiento antibiótico previo.

La detección de ADN mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real ha supuesto el mayor avance diagnóstico durante los últimos años. Las técnicas genómicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real no pueden sustituir de momento al cultivo tradicional como método diagnóstico de referencia de las infecciones bacterianas agudas, pero son complementarias, aportando una serie de ventajas respecto a éste que la convierten en una herramienta de uso rutinario en los laboratorios de microbiología.

Las técnicas de PCR en tiempo real permiten identificar y cuantificar el producto amplificado en el momento en que se está produciendo la reacción utilizando marcadores fluorescentes. Las mayores ventajas de esta técnica consisten en la simplificación máxima del procedimiento, la rapidez con que se obtienen los resultados y la virtual eliminación de las contaminaciones de laboratorio, puesto que los tubos con fragmentos amplificados ya no se vuelven a abrir para hacer ningún proceso adicional.

En el diagnóstico de la meningitis bacteriana, la PCR tiene mayor sensibilidad que la del cultivo tradicional, y la administración de antimicrobianos previa a la obtención de la muestra apenas afecta su sensibilidad. Esto es de gran utilidad en una enfermedad en la que la rapidez en la instauración del tratamiento es clave en la evolución posterior. La tercera gran ventaja es la rapidez en la obtención de resultados.

Los principales inconvenientes de los métodos genómicos son la necesidad de personal específicamente entrenado, la falta de estandarización de los protocolos, el coste elevado y sobre todo, el peligro de que existan contaminaciones accidentales si se utiliza PCR convencional. El mejor formato de detección probablemente sea la combinación de sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos con técnicas de amplificación en tiempo real. El futuro de las técnicas genómicas para el diagnóstico de estas infecciones pasa por el desarrollo de sistemas automatizados cerrados, con pocas posibilidades de contaminación y una elevada garantía de calidad.

La detección de antígeno se realiza en pocos minutos y su simplicidad hace de ella una técnica al alcance de cualquier laboratorio de microbiología. La menor sensibilidad es su principal desventaja respecto a los otros métodos diagnósticos como son el cultivo y la detección de ácidos nucleicos. En el contexto de la meningitis neumocócica, las técnicas de inmunocromatografía validadas para detección de *S. pneumoniae* en otras muestras, pueden aportar

buenos resultados cuando son empleadas en el LCR. La principal utilidad de la detección de antígeno se centra en el diagnóstico de los casos tratados cuando no se dispone de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, que actualmente constituyen el método diagnóstico de elección en estas situaciones.

**4.6.1 Procesamiento de las muestras.** Todas las manipulaciones de la muestra deben llevarse a cabo en una cabina de seguridad biológica.

Si se tiene previsto realizar técnicas moleculares se separará una cantidad del LCR en un tubo estéril que se conservará refrigerado a 2-8°C hasta su uso.

La inoculación de los medios de cultivo seleccionados puede hacerse directamente con el LCR o bien tras su concentración por centrifugación.

La centrifugación en citocentrífuga con 0,5-1 ml de LCR ofrece mayor sensibilidad que la convencional, aunque ésta puede realizarse en caso de no disponer de aquella. La centrifugación convencional se debe realizar con un mililitro del LCR durante 10 minutos a 2.000 g. Se aspirará el sobrenadante que se conservará para otros estudios y se resuspenderá el sedimento. Es importante tener en cuenta que el sedimento debe ser resuspendido mediante agitación suave en vórtex. No debe resuspendirse con una pipeta puesto que las bacterias y las células pueden quedarse adheridas a las paredes del tubo.

Una gota del sedimento se empleará para la tinción de Gram y otra para la siembra en un medio de cultivo en caso que no se haya procedido previamente a la siembra directa.

**4.6.2 Medios de cultivo e incubación.** Debido al tipo de bacterias implicadas en la etiología de la meningitis, para el cultivo deben emplearse medios enriquecidos, como el agar sangre y el agar chocolate. Además, en función de los datos aportados por el médico peticionario sobre la muestra y el enfermo, se realizarán procedimientos adicionales si se consideran necesarios. Las placas se incubarán a 35°-37°C en aire y en atmósfera enriquecida con 5% de CO<sub>2</sub>. En aquellos LCR con recuentos celulares muy elevados puede ser útil inocular un mililitro del mismo en una botella de hemocultivo que se introducirá en el sistema automatizado que disponga el laboratorio.

Las placas serán revisadas diariamente, manteniéndose la incubación durante 3-4 días.

## 5. MENINGITIS NEONATAL

### 5.1 INTRODUCCIÓN

Algunas infecciones que afectan al recién nacido como la meningitis bacteriana son la manifestación postnatal de un proceso patológico iniciado antes del parto. La meningitis neonatal ocurre en un 0,3 por 1.000 nacidos vivos y está estrechamente asociada a sepsis, que es hasta cinco veces más frecuente. El conocimiento de este hecho ha conducido a los obstetras a administrar a la gestante antibióticos de amplio espectro ante algunas situaciones perinatales frecuentes asociadas a infección como la fiebre intraparto, la sospecha de corioamnionitis, rotura de membranas ovulares complicada con amenaza de parto prematuro y otras.

### 5.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La clínica de la sepsis y meningitis neonatal es inespecífica y superponible a la de otros procesos patológicos graves, sobre todo en la población de recién nacidos prematuros. Los análisis de la respuesta biológica (reactantes de fase aguda) y hematológica (cifra de leucocitos, recuento diferencial, cifra de plaquetas, etc.) no son suficientemente sensibles ni específicos para identificar de manera segura al recién nacido infectado. Ello conduce a menudo a una utilización innecesaria de antibióticos en el recién nacido durante los dos o tres primeros días del ingreso en la Unidad Neonatal. En la actualidad, un 24-31% de los recién nacidos han recibido antibióticos por vía transplacentaria o durante los primeros minutos de vida.

### 5.3 ETIOPATOGENIA

Desde el final de la década de los ochenta, el microorganismo más frecuentemente aislado en el espectro etiológico de las sepsis y meningitis neonatales es *S. agalactiae* o estreptococo beta-hemolítico del grupo B de Lancefield (EGB). En 1984, Boyer y Gotoff demostraron que la administración intravenosa de antibióticos intraparto reducía la transmisión materno-fetal del EGB y por tanto la colonización e infección neonatal por este microorganismo. Desde entonces numerosas publicaciones han confirmado la eficacia de esta política. En Estados Unidos, los *Centers for Disease Control*, conjuntamente con la *American Academy of Pediatrics* y el *American College of Obstetricians and Gynecologists*, publicaron en 1996 las guías para la prevención de esta infección (*Guidelines for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective*). En España, la Sociedad Catalana de Obstetricia y Ginecología, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica y la Sociedad Española de Pediatría realizaron una reunión de consenso y elaboraron unas recomendaciones que fueron editadas en 1997. Pediatría Catalana. Posteriormente, en 1998 las Sociedades Españolas de Obstetricia y Ginecología (SEGO), de Neonatología (SEN) y de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) publicaron sus recomendaciones en la revista oficial de la SEGO. Desde entonces se ha generalizado en España el estudio sistemático de la colonización vagino-rectal en las gestantes (entre 35-37 semanas de edad gestacional) y la administración de antibióticos intraparto a las mujeres colonizadas. En nuestro medio la tasa de colonización vagino-rectal por EGB en las gestantes de 35-37 semanas es de alrededor del 20% (15-25%). Se aplica, además, profilaxis antibiótica a los recién nacidos pretérmino cuya colonización materna no ha sido estudiada por poseer una edad gestacional <35 semanas (7% de los partos).

*E. coli*, sigue siendo el segundo agente etiológico de sepsis y meningitis neonatales. Las situaciones clínicas relacionadas con la infección neonatal por esta bacteria son distintas a las del EGB. Se

relaciona de forma especial con la prematuridad, el bajo peso al nacer, la prolongación del embarazo tras la rotura prematura de membranas, la exposición previa a los antibióticos y las infecciones urinarias maternas por esta bacteria durante el embarazo. Se han descrito diversos factores de virulencia asociados a este microorganismo, principalmente adhesinas, cápsula, resistencia al suero, toxinas, sistemas quelantes de hierro y proteínas relacionadas con la invasión del endotelio.

El tercer agente más común es *L. monocytogenes*. A diferencia de los dos anteriores, que suelen transmitirse al feto durante el parto, su paso también puede ser transplacentario. Aunque esto último es muy poco frecuente, las consecuencias son muy graves, frecuentemente con muerte fetal.

#### 5.4 DIAGNÓSTICO DE MENINGITIS EN EL NEONATO

El aislamiento del microorganismo a partir de una muestra clínica significativa como el LCR, o la sangre en caso de que haya también bacteriemia, es el método de referencia y el más idóneo para establecer el diagnóstico.

La frecuente administración de antibióticos a la madre no siempre es capaz de evitar el proceso infeccioso del recién nacido, pero con frecuencia inhibe el crecimiento del microorganismo y por tanto es causa de negatividad de los cultivos.

La amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otra técnica facilita la detección de microorganismos presentes en cantidades muy bajas o de difícil crecimiento en los medios usuales así como en aquellos casos en los que el paciente ha recibido tratamiento antibiótico.

No existen técnicas comercializadas diseñadas específicamente para el diagnóstico de la meningitis neonatal que cubran el diagnóstico de los tres principales agentes bacterianos. Sin embargo, numerosos autores han descrito varios procedimientos. Una aproximación atractiva es la que escoge como diana para la amplificación el gen que codifica el 16S ARNr, común en las bacterias. Cualquier bacteria presente en el LCR dará un resultado positivo, y la identificación de la especie se puede hacer mediante PCR en tiempo real con tres sondas fluorescentes para regiones internas con variabilidad específica para *S. agalactiae*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, o bien por secuenciación. Obviamente, esta estrategia de amplificar una región bacteriana común solo puede realizarse en muestras habitualmente estériles, y su principal inconveniente es que presenta menor sensibilidad que las amplificaciones dirigidas que utilizan iniciadores específicos.

#### 5.5 DETECCIÓN DE PORTADORAS DE *Streptococcus agalactiae*

Como medida de prevención de la sepsis y meningitis neonatal por *S. agalactiae*, se recomienda estudiar la colonización vaginal y rectal en todas las embarazadas durante las semanas 35 a 37 de gestación. Los métodos pueden consultarse en el

Procedimiento nº 13 de la SEIMC (2ª edición): "Microbiología de la infección perinatal".

Actualmente están comercializados métodos de amplificación de ácidos nucleicos por PCR en tiempo real que permiten detectar a portadoras de forma muy sencilla y rápida. Una posible indicación sería aquellas gestantes no controladas durante su embarazo y en las que se tiene que hacer un diagnóstico durante el parto.

La técnica Xpert GBS (Cepheid, Sunnyvale, CA) automatiza todo el proceso, extracción de ácidos nucleicos incluida, de forma que la manipulación técnica es mínima y los resultados están disponibles en menos de dos horas. Cuenta con el marcado CE y tiene unos valores de sensibilidad del 94,6% y de especificidad del 94,8% respecto al cultivo. A pesar de su sencillez, el coste del material y la necesidad de implementar la técnica en la sistemática de urgencias hace difícil su uso generalizado.

### 6. MENINGITIS TUBERCULOSA

La meningitis es una forma clínica poco habitual aunque muy grave de la enfermedad tuberculosa. Puede representar alrededor del 1% de todas las formas y es más frecuente en población de países subdesarrollados, niños y pacientes infectados por el VIH. La localización meníngea puede producirse por vía hematógena durante la primoinfección o la reactivación, o bien por ruptura al espacio subaracnoideo de un foco parameníngeo ya existente. En cualquier caso se produce una inflamación granulomatosa de las meninges basales y pequeños focos tuberculosos (focos de Rich) en las meninges, el cerebro o la médula espinal. Esto se traduce en una clínica que puede ser poco específica y de comienzo insidioso. Los síntomas más frecuentes son fiebre y cefalea de curso subagudo o crónico, añadiéndose posteriormente disminuciones del nivel de conciencia y/o alteraciones de la conducta, otros síntomas y signos de hipertensión intracraneal, afectación de los pares craneales, hidrocefalia, y diferentes formas de alteraciones neurológicas focales.

#### 6.1 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO CONVENCIONAL

Los datos técnicos pueden consultarse en detalle en los Procedimientos de la SEIMC números 9 (1ª edición) y 9a (2ª edición): "Micobacterias".

La detección de los bacilos en LCR mediante tinción y cultivo continúa siendo el método de referencia para hacer el diagnóstico etiológico, aunque la escasa cantidad de los mismos que suele encontrarse en las muestras clínicas condiciona en gran manera la sensibilidad de los diferentes métodos. Para aumentar esta sensibilidad se recomienda en la medida de lo posible trabajar con gran cantidad de muestra (6 ml) o bien disponer de varias muestras obtenidas en momentos diferentes, y utilizar alguna técnica de concentración.

Debido a la capacidad de flotación de las micobacterias, las técnicas de concentración por centrifugación directa de la muestra son poco eficaces, por lo que podría ser recomendable realizar

algún tipo de pretratamiento para su concentración a pesar de tratarse de un líquido estéril. En caso de disponer de un volumen escaso que implique la utilización en su totalidad, no sería necesario realizar el pretratamiento puesto que la posibilidad de contaminación de los cultivos es despreciable. Existen numerosos protocolos para realizar la descontaminación. El más recomendado para la mayoría de sistemas de cultivo en medios líquidos y técnicas de amplificación genómica es el NALC-NaOH (método de Kubica).

**6.1.1. Tinciones.** Las técnicas estandarizadas de tinción con fluorocromos (auramina-rodamina) o carbolfucsina (Ziehl-Neelsen) permiten demostrar la presencia de micobacterias de forma rápida y sencilla. Son capaces de detectar  $10^4$  bacilos/ml, y su sensibilidad en el diagnóstico de la meningitis tuberculosa es del 10%. Ambas técnicas presentan un rendimiento similar. Puesto que la primera requiere un menor tiempo de observación, es preferible en aquellos laboratorios que realizan un número elevado de exámenes. En ocasiones es necesaria la confirmación de un resultado positivo en la tinción de auramina con la técnica de Ziehl-Neelsen, y algunos laboratorios la realizan de forma rutinaria.

La experiencia y el tiempo dedicado por el observador son aspectos importantes que también hay que tener en consideración.

**6.1.2 Cultivo.** El cultivo permite detectar cantidades menores de microorganismos que la tinción, del orden de  $10^2$  bacilos/ml así como realizar la identificación de especie y las necesarias pruebas de sensibilidad fenotípicas. Los medios líquidos de los que se dispone actualmente permiten acortar considerablemente el tiempo necesario para obtener un cultivo positivo. Sin embargo este tiempo varía según el inóculo, de modo que las muestras con bajo inóculo presentan un retraso en el crecimiento respecto a muestras con mayor inóculo. La sensibilidad del cultivo en el diagnóstico de la meningitis tuberculosa es muy variable, y oscila entre un 25 y un 79% según diferentes autores.

## 6.2 DIAGNÓSTICO GENÓMICO

La mayoría de las técnicas genéticas que se emplean para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* directamente en muestra clínica implican la selección de un fragmento específico del ADN del microorganismo y su amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro sistema.

Existen numerosas técnicas descritas en la literatura, en las que se amplifican mediante PCR convencional diferentes regiones genéticas como la secuencia de inserción IS6110, la *hsp65* que codifica la proteína de 65KDA, regiones de la subunidad ribosómica 16S, 23S y otras. En general estos métodos caseros utilizan para la detección del producto amplificado la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, identificándolo por el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) o por secuenciación.

En la actualidad, existen asimismo varios procedimientos comercializados, que son los más

recomendables para realizar el diagnóstico de tuberculosis en muestras clínicas puesto que están estandarizados, los resultados obtenidos se pueden comparar con los de otros laboratorios y cuentan con la validación y aprobación de diferentes organismos internacionales. La mayoría de ellos están validados únicamente en muestras de origen respiratorio, algunos en muestras extrapulmonares como orina, y ninguno en LCR. Aunque diferentes autores hayan realizado estudios con estas técnicas para el diagnóstico de meningitis tuberculosa y se usen en el diagnóstico asistencial en varios laboratorios, en ningún caso deben sustituir a los métodos convencionales de tinción y cultivo, y los resultados obtenidos han de interpretarse conjuntamente y teniendo en cuenta la situación clínica del paciente.

Muchas técnicas comerciales incluyen en el equipo un sistema de extracción de ácidos nucleicos a partir de la muestra clínica, específico para dicho procedimiento y que implica en ocasiones un proceso manual de complejidad variable. A pesar de que en el laboratorio se disponga de alguna técnica de extracción automatizada, no conviene modificar el proceso en este punto puesto que las micobacterias son organismos que ofrecen dificultades especiales para ser lisadas y una técnica no diseñada específicamente para este protocolo puede condicionar un mal rendimiento de la amplificación. Puesto que no hay técnicas validadas para su uso con LCR, ninguna ofrece datos sobre el volumen mínimo de muestra a procesar, pero no debe ser inferior a 500 microlitros.

Otras ventajas que ofrecen los métodos comerciales son que todos ellos incluyen la amplificación simultánea de un control interno que permite monitorizar en cada muestra la existencia de sustancias con acción inhibidora de la polimerasa y, por lo tanto, evitar resultados falsamente negativos. Otros facilitan una automatización del procedimiento en todo o en parte, lo que permite ahorrar tiempo y trabajo técnico, y algunos además ofrecen información sobre aspectos interesantes, como la detección de mutaciones que codifican resistencia a algunos antibióticos.

Aunque los métodos en tiempo real son idóneos para cuantificar los microorganismos, el valor que pueda tener esta cuantificación en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa o en el control de la eficacia de tratamiento está por establecer.

A continuación se presentan las principales características de los sistemas que se han comercializado recientemente y que cumplen la normativa europea (*European in vitro Diagnostic Directive*, marcado CE) (tablas 2 a 4).

**6.2.1 Técnicas que incluyen la detección del producto amplificado por hibridación en fase sólida.** Previa amplificación de una o varias regiones genéticas, se realiza una hibridación reversa con sondas cortas inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa. Estos productos comerciales se comenzaron a usar a partir de micobacterias crecidas en cultivo, pero actualmente las técnicas GenoType (Hain Lifescience, Germany) tienen validación para trabajar con muestras clínicas. La extracción de ácidos

nucleicos y la amplificación son manuales, y la detección en tira está automatizada.

La primera que se comercializó (2004) fue GenoType Mycobacteria Direct. Está validada para muestras respiratorias y extrapulmonares, y permite detectar simultáneamente *M. tuberculosis* complex y otras micobacterias de interés clínico (*Micobacterium avium*, *Micobacterium intracellulare*, *Micobacterium kansasii* y *Micobacterium malmoense*).

Otros dos sistemas están diseñados para detectar la presencia de *M. tuberculosis* complex y también de mutaciones que codifican resistencia a varios antibióticos. Ambos están validados para muestras respiratorias con baciloscopia positiva. GenoType MTBDRplus está disponible desde 2006 y detecta resistencia a rifampicina y resistencia de alto y bajo nivel a la isoniacida. GenoType MTBDRs/ ha sido comercializado en 2009 y detecta la resistencia a las fluoroquinolonas, etambutol, aminoglicósidos y péptidos cíclicos.

En el presente año 2010 se ha desarrollado el sistema GenoQuick MTB, validado para muestras respiratorias y extrapulmonares. La fase de hibridación de esta técnica no está automatizada porque es muy sencilla y rápida, y permite diagnosticar infección por *M. tuberculosis* complex con poco trabajo técnico.

**6.2.2 Amplificación en tiempo real.** El equipo BD ProbeTec ET *Mycobacterium tuberculosis* complex (DTB) direct detection (Becton Dickinson, USA) está disponible desde el año 2001 y utiliza la tecnología de amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA, *Strand Displacement Amplification*) en tiempo real. Está validado para muestras respiratorias, la parte de amplificación y detección está automatizada y permite identificar *M. tuberculosis* complex. Aunque

la tecnología que emplea no sea familiar para la mayoría de microbiólogos, se trata de una amplificación isotérmica sencilla y robusta, no precisa instrumentos complejos y no ofrece dificultades especiales de interpretación.

El sistema COBAS TaqMan MTB (Roche Diagnostics, USA) se basa en una amplificación por PCR en tiempo real y detección de *M. tuberculosis* complex mediante sondas de hidrólisis. Como el anterior, está validado para muestras respiratorias y la extracción de ácidos nucleicos es manual.

Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA) es una PCR en tiempo real con sondas tipo *molecular beacons* validado para muestras respiratorias que permite realizar la detección de *M. tuberculosis* complex y su resistencia a rifampicina. El proceso está automatizado en todas sus etapas, extracción de ácidos nucleicos incluida, por lo que la manipulación de la muestra y el tiempo que se tarda en obtener un resultado son mínimos. Los reactivos están liofilizados dentro de un dispositivo listo para su uso y son muy estables, incluso a temperatura ambiente.

## 7. INFECCIONES VÍRICAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

### 7.1 INTRODUCCIÓN

Los virus son la causa más frecuente de meningitis, encefalitis y meningoencefalitis por delante de bacterias, hongos y parásitos, además de producir ciertos síndromes neurodegenerativos lentos de etiología exclusivamente vírica como la panencefalitis esclerosante subaguda, la leucoencefalopatía multifocal progresiva y la encefalopatía por el VIH.

**Tabla 2.** Técnicas moleculares comerciales para el diagnóstico de tuberculosis. Descripción.

Nombre comercial	Método de amplificación	Región amplificada	Detección
GenoType Mycobacteria Direct	NASBA	23S-ARN	<i>M. tuberculosis</i> complex, <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. Malmoense</i>
GenoType MTBDRplus	PCR	23S- ARN <i>rpoB</i> <i>katG</i> promotor <i>inhA</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex Resistencia a rifampicina e Isoniacida
GenoType MTBDRs/	PCR	23S- ARN <i>gyrA</i> <i>rrs</i> <i>embB</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex Resistencia a fluoroquinolonas, Aminoglucósidos/péptidos cíclicos y etambutol
GenoQuick MTB	PCR	IS6110	<i>M. tuberculosis</i> complex
BD ProbeTec ET	SDA en tiempo real	IS6110	<i>M. tuberculosis</i> complex
COBAS TaqMan MTB	PCR en tiempo real	16S- ARN	<i>M. tuberculosis</i> complex
Xpert MTB/RIF	PCR en tiempo real	<i>rpoB</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex Resistencia a rifampicina

**Tabla 3.** Técnicas moleculares comerciales para el diagnóstico de tuberculosis. Aplicación en el laboratorio.

Nombre comercial	Tipo de muestra	Automatización		Control interno
		Extracción	Amplificación	
GenoType Mycobacteria Direct	Respiratoria y extrapulmonar (no LCR)	NO	NO	SI
GenoType MTBDRplus	Respiratoria con baciloscopia positiva	NO	NO	SI
GenoType MTBDRs/	Respiratoria con baciloscopia positiva	NO	NO	SI
GenoQuick MTB	Respiratoria y extrapulmonar (no LCR)	NO	NO	NO
BD ProbeTec ET	Respiratoria	NO	SI. Tiempo real	SI
COBAS TaqMan MTB	Respiratoria	NO	SI. Tiempo real	SI
Xpert MTB/RIF	Respiratoria	SI	SI. Tiempo real	SI

**Tabla 4.** Técnicas moleculares comerciales para el diagnóstico de tuberculosis. Validación.

Nombre comercial	Resistencia a antimicrobianos	S	E	VPP	VPN
GenoType Mycobacteria Direct		92,9%* 93,7%**	84,5%* 100%**	90,5%* 100%**	88,1%* 90,5%**
GenoType MTBDRplus	Rifampicina Isoniacida	98,1%*** 90,2%***	97,8%*** 100%***		
GenoType MTBDRs/	Quinolonas Aminoglucósidos / péptidos Etambutol	90,6%*** 84,8%*** 69,2%***	100%*** 100%*** 100%***		
GenoQuick MTB		96,7%* 97,7%**	85,2%* 97%**	63,8%* 93,6%**	99%* 99%**
BD ProbeTec ET		90,9%* 91,1%**	97,2%* 97,8%**		
Xpert MTB/RIF	Rifampicina	98%* 96,7%***	98,3%* 98,6%***	95,9%* 93,6%***	96,1%* 99,3%***

S: Sensibilidad. E: Especificidad. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor predictivo negativo

\* Valor de referencia el cultivo

\*\* Valor de referencia el diagnóstico clínico

\*\*\* Valor de referencia la sensibilidad fenotípica

El establecimiento de la etiología vírica mediante diagnóstico de laboratorio es importante, ya que permite orientar el tratamiento con antivíricos específicos en algunos casos como el de los virus de la familia de los herpes y evita el uso innecesario de antibióticos, así como el de ingresos hospitalarios de casos producidos por agentes con buen pronóstico como, por ejemplo los enterovirus, causantes, además, de brotes epidémicos que pueden producir situaciones de sobrecarga en los hospitales.

## 7.2 ETIOPATOGENIA

Una característica de los síndromes neurológicos catalogados como infecciosos por criterios clínicos y

de analítica general, es que en un importante porcentaje de ellos (en torno al 40-60% para las meningitis y el 70% para las encefalitis) no se llega a identificar ningún agente causal. Los virus que se detectan con más frecuencia en meningitis aséptica son los enterovirus (EV), seguidos de virus herpes simple (VHS) y varicela zoster (VZV). Entre los muchos tipos de EV causantes de brotes de meningitis, destacan Echovirus 30, 13, 6, 11 y 9, Coxsackie B5 y Coxsackie A9. Los EV son también la causa principal de meningitis y sepsis neonatal. El virus de la parotiditis solía compartir con los EV el papel de primera causa de meningitis aséptica antes de la inclusión de la vacuna triple vírica en el

calendario obligatorio, pero actualmente su papel es muy limitado, aunque no se puede olvidar que se siguen produciendo brotes de parotiditis que afectan a población vacunada, en el transcurso de los cuales se producen casos de meningitis aséptica.

El principal agente causal de encefalitis víricas es el VHS, aunque algunos estudios revelan que el VZV podría causarla con una frecuencia similar o incluso superior. Los EV rara vez causan encefalitis, aunque un reciente estudio en Finlandia les otorga un valor más relevante. La encefalitis también puede aparecer como complicación de enfermedades víricas que usualmente cursan sin implicación neurológica. Puede ser el caso de la propia varicela o de la gingivo-estomatitis herpética, pero también de otras como el sarampión o en menor medida de la parotiditis, el exantema súbito o la gripe, existiendo publicados casos asociados a otras muchas enfermedades y agentes víricos.

Entre los virus zoonóticos productores de cuadros neurológicos descritos más recientemente en nuestro entorno está el virus Toscana (familia *Bunyaviridae*, género *Phlebovirus*), que es un arbovirus transmitido por un flebotomo (*Phlebotomus perniciosus*) que produce meningitis aséptica y que parece endémico en España. El virus de la coriomeningitis linfocitaria, un arnavirus transmitido por roedores, también es causa esporádica de meningitis en España. Además, se tienen evidencias de la presencia de virus West-Nile en aves, aunque sólo se ha descrito un caso humano. Asimismo, casi todos los años se producen casos importados de rabia canina en Ceuta y Melilla a los que, en ocasiones, se exponen personas que han de recibir inmunoprofilaxis post-exposición. Otro lisavirus capaz de causar rabia en humanos, el lisavirus europeo de murciélagos tipo 1, es endémico en murciélagos en España. Finalmente, existen muchos otros virus transmitidos por artrópodos causantes de enfermedad neurológica característicos de diferentes partes del mundo que se deben tener en cuenta en pacientes con antecedentes de viajes internacionales.

En meningitis y encefalitis víricas se pueden distinguir cuatro mecanismos patogénicos alternativos. El más general sería la colonización del sistema nervioso central (SNC) a través de diseminación hematológica del virus durante la primoinfección vírica. En el caso de los alfa herpesvirus un segundo mecanismo, cuyo ejemplo más típico sería la encefalitis herpética, consistiría en la invasión del SNC tras reactivación de la infección latente desde los ganglios nerviosos regionales a través de las fibras nerviosas. En el caso de la rabia, el virus infecta las neuronas motoras en el lugar de la mordedura del animal, alcanzando el sistema nervioso central tras un lento proceso de transporte neuronal. Finalmente, en las encefalitis post-infecciosas como la que ocurre después del sarampión o la varicela, el daño neuronal se produce por mecanismos inmunopatogénicos inducidos por la respuesta inmune al virus y no directamente por el efecto de su replicación en células nerviosas.

En los pacientes inmunodeprimidos los herpesvirus linfotropos y muy particularmente el citomegalovirus

son causa importante de meningoencefalitis y mielitis. La invasión del SNC, en este caso, sobreviene por diseminación hematológica tras la reactivación de los virus desde su reservorio linfóide.

En cuanto a los síndromes de curso lento, la panencefalitis esclerosante subaguda es una complicación de baja frecuencia del sarampión (1 caso por millón) que se está dejando de ver ya que la tasa actual de sarampión está por debajo de un caso por 100.000 habitantes. Con más razón, tampoco se ven casos asociados a virus de la rubéola que ya eran muy raros en la era epidémica. La leucoencefalopatía multifocal progresiva está causada por el poliomavirus JC, virus de elevada prevalencia que permanece latente en el riñón con frecuentes reactivaciones asintomáticas en las que se produce excreción del virus con la orina, lo que es más frecuente en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, en algunos casos tras la reactivación se produce viremia e invasión del SNC causando leucoencefalopatía multifocal progresiva. Finalmente, el propio VIH se considera el causante del complejo de demencia asociado a sida.

### 7.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

A diferencia de las de etiología bacteriana, las meningitis víricas suelen ser autolimitadas y no dejan secuelas. Sin embargo, las encefalitis víricas constituyen una enfermedad grave, que dependiendo de su etiología pueden causar la muerte o dejar secuelas en los supervivientes. En concreto, la encefalitis herpética, generalmente causada por el virus herpes simple tipo 1, en ausencia de tratamiento es mortal en la mayoría de los casos, y aún con el tratamiento adecuado deja graves secuelas en muchos de los supervivientes, debido, principalmente, a la dificultad de su diagnóstico precoz.

La panencefalitis esclerosante subaguda es un cuadro progresivo, lento, que suele darse en la infancia y adolescencia y que se caracteriza por un deterioro mental progresivo que comienza con alteraciones de conducta seguidas de afectación motora que en un plazo de uno a tres años acaba dejando al paciente en estado vegetativo y produciéndole la muerte. Se produce por una infección defectiva y persistente del virus del sarampión en el SNC y es más frecuente en niños que contraen el sarampión en los dos primeros años de vida.

La leucoencefalopatía multifocal progresiva se produce por una destrucción de oligodendrocitos causada por efecto de la replicación del poliomavirus JC, causando desmielinización. El cuadro clínico se caracteriza por un déficit focal neurológico y deterioro cognitivo progresivo que suele acabar con la vida de paciente en cuestión de meses. Esta enfermedad afecta a pacientes inmunodeprimidos, especialmente con sida pero también a transplantados. Más recientemente se ha asociado al uso de agentes inmunosupresores selectivos para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Finalmente, en los estadios finales del sida, los pacientes pueden sufrir un cuadro de deterioro

cognitivo progresivo conocido como complejo de demencia del sida o encefalopatía asociada al VIH que se considera causado por el propio VIH.

#### 7.4 EPIDEMIOLOGÍA

A pesar de la importancia clínica de estos síndromes, existe la percepción de que no se tiene un conocimiento adecuado de su etiología y por consiguiente de su epidemiología, en parte debido a la ausencia de definiciones de caso armonizadas y de métodos de diagnóstico estandarizados. Dentro del complejo elenco de virus causantes de enfermedad neurológica, hay agentes con patrones de circulación epidemiológica endémica, epidémica y endemo-epidémica. Aunque existe una base constante de casos de meningitis linfocitaria causada por VHS, VZV y ciertos EV de patrón endémico, se producen con frecuencia picos epidémicos causados por diversos EV que suelen ser más frecuentes en primavera-verano. Durante estos brotes los casos de meningitis linfocitaria que llegan al hospital no son más que la punta del iceberg de una circulación masiva entre la población infantil causando cuadros febriles leves o asintomáticos. El serotipo implicado cambia con el tiempo y suele causar brotes concomitantes en países circundantes. Antes de la vacunación con la vacuna triple vírica se observaban también brotes de meningitis asociados a los de parotiditis, pero el escaso tamaño de los actuales en la población vacunada no parece producir un aumento significativo en los casos de meningitis, aunque sí que se siguen produciendo. En el caso de la encefalitis, sin embargo, no se observan brotes, ya que la mayoría se producen por reactivaciones de infecciones latentes por VHS y VZV. Finalmente, sí que se observa una clara estacionalidad en la meningitis por virus Toscana asociada a la mayor actividad del vector durante los meses de verano.

#### 7.5 DIAGNÓSTICO

Ante un paciente con un cuadro neurológico, antes que nada, procede realizar un diagnóstico clínico a fin de clasificarlo dentro de alguno de los síndromes conocidos, y una punción lumbar para establecer de forma tentativa si la etiología es vírica o bacteriana. Ello permitirá la instauración de un tratamiento presuntivo a la espera de los resultados microbiológicos. Un líquido cefalorraquídeo claro u opalino, con predominio de linfocitos, sin disminución de la concentración de glucosa y con elevación discreta de proteínas apunta hacia una etiología de tipo vírica (tabla 1). En los casos de encefalitis o encefalopatías, las técnicas de imagen completarán la información necesaria para el establecimiento del diagnóstico presuntivo.

En el examen clínico, además de la valoración de los propios signos y síntomas neurológicos, deberán buscarse otros síntomas asociados que pueden proporcionar información muy relevante sobre la identidad del agente implicado, tales como la presencia de exantemas vesiculares (herpes labial, herpes zoster, varicela, síndrome de boca-mano-pie), exantemas morbiliformes (sarampión, exantema súbito...), inflamación de las glándulas parótidas o

presencia de lesiones producidas por picaduras de insectos o mordeduras de animales. Finalmente, en la anamnesis se deberá preguntar sobre posibles cuadros infecciosos o vacunaciones en los días precedentes, casos similares en su entorno y existencia de antecedentes de viajes internacionales, exposiciones conocidas o potenciales a picaduras de insectos y contacto con animales, muy especialmente con murciélagos.

#### 7.6 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico de los síndromes neurológicos víricos, para ser útil en el tratamiento del paciente, requiere rapidez, ya que se trata de cuadros agudos de evolución rápida. En este sentido, sería fundamental que las técnicas diagnósticas de los patógenos más frecuentes estuviesen implantadas en todos los servicios de microbiología hospitalaria. El incremento en la oferta comercial de equipos de diagnóstico basados en técnicas genómicas que se viene experimentando en los últimos años está facilitando enormemente la consecución de este objetivo, perfectamente justificable, por otra parte, no solo por la mejora de la calidad asistencial, sino también por su balance económico a través del ahorro potencial en tratamientos antibióticos en unos casos y en ingresos hospitalarios en otros, siempre que se conozca la naturaleza del virus implicado en el cuadro con suficiente premura.

El diagnóstico microbiológico de los síndromes neurológicos víricos se basa esencialmente en el análisis del LCR y debe hacerse tanto por detección directa como por serología siempre que sea posible si se quiere obtener la máxima sensibilidad, ya que serán unas u otras técnicas las que brindarán el resultado positivo dependiendo del tiempo de evolución del cuadro clínico: en momentos tempranos las técnicas directas y en cuadros más evolucionados las serológicas. Habida cuenta de que las pruebas serológicas aplicadas al líquido cefalorraquídeo requieren del análisis del estado de la barrera hematoencefálica a través del examen en paralelo de LCR y suero, esta última muestra, siempre deberá tomarse de forma coetánea a la punción lumbar. Además, en los casos en que el examen clínico y la anamnesis apunten hacia una complicación de una enfermedad vírica como causa del cuadro, el diagnóstico descansará fundamentalmente en el de la enfermedad de base por detección de IgM en el suero. En el caso de sospecha clínica de rabia o en todo caso de encefalitis con antecedente de exposición a murciélagos o mordeduras de animales se tomará muestra de LCR, saliva, suero y biopsia de piel de la nuca conteniendo folículos pilosos y se procederá a su envío al laboratorio de referencia autonómico o directamente al nacional (Centro Nacional de Microbiología) si no hubiese en la Comunidad Autónoma correspondiente.

**7.6.1 Técnicas de detección directa. Cultivo.** Las cargas víricas en el LCR suelen ser bastante bajas y además, el propio LCR es un medio poco adecuado para la conservación de la infectividad,



especialmente para virus envueltos, por esta razón, sólo el cultivo de EV ofrece una sensibilidad adecuada para el diagnóstico. Pueden también obtenerse aislamientos en un número significativo de casos asociados a virus de la parotiditis o Toscana, pero el rendimiento es casi nulo para VHS y VZV.

Las diferentes especies de EV tienen diferentes requerimientos de líneas celulares para su crecimiento, de forma que si se quieren cubrir el máximo de ellos con eficacia hay que inocular necesariamente varias de ellas, sin que exista actualmente un acuerdo sobre cual es la mejor combinación. Algunas de las líneas más comúnmente empleadas son los fibroblastos (pulmón fetal, MRC5), RD, BGM y A549. Las células Vero permiten el crecimiento del virus de la parotiditis siendo también sensibles para muchos EV. Existen en el mercado anticuerpos monoclonales de amplio espectro que reaccionan con casi todos los tipos de EV, facilitando la confirmación de los efectos citopáticos observados y permitiendo el cultivo rápido (*shell vial*), que adelanta el resultado y mejora la sensibilidad. No obstante, las técnicas de amplificación genómica proporcionan mayor sensibilidad y rapidez, al tiempo que son más sencillas de realizar, por lo que están tendiendo a desplazar al aislamiento en cultivo. Las muestras en las que se aísle EV y parotiditis pueden enviarse al Centro Nacional de Microbiología para la identificación del serotipo y/o genotipo contribuyendo así a la vigilancia epidemiológica de estos agentes.

#### **7.6.2 Técnicas de detección directa.**

**Amplificación genómica.** Existen actualmente equipos diagnósticos comerciales con marcado CE disponibles para amplificación genómica de los patógenos más relevantes como EV, HSV y VZV, la mayoría basados en PCR a tiempo real y algunos altamente automatizados, estando en este momento la oferta comercial en expansión. Además, desde hace tiempo hay también disponibles en el mercado métodos múltiples capaces de detectar en un solo ensayo todos los herpesvirus de interés clínico, tanto en formato de PCR anidada seguida de electroforesis en gel como en PCR simple con detección por hibridación en microplaca. Existen también métodos múltiples descritos en la bibliografía que incluyen herpesvirus y EV permitiendo realizar de forma simultánea el cribado de los agentes más importantes. Asimismo, hay varios sistemas de extracción automática de ácidos nucleicos que facilitan la adaptación de estos métodos al laboratorio asistencial.

En ausencia de antecedentes clínicos o epidemiológicos relevantes que apunten claramente hacia un determinado agente, debería de hacerse cribado para EV, VHS y VZV. Si se desea hacerlo de forma secuencial se debería de comenzar por los EV en las meningitis y por VHS y VZV en las encefalitis y meningoencefalitis. En pacientes inmunodeprimidos procedería incluir en el cribado al citomegalovirus y al virus de Epstein-Barr, agentes para los que también existe oferta comercial de equipos de diagnóstico. Durante los meses de actividad del vector del virus Toscana el estudio podría

completarse con PCR para este virus y en caso de antecedente de parotiditis o sarampión con PCR para estos agentes. En las encefalitis con antecedente de mordedura por murciélago, debería de hacerse RT-PCR de rabia en LCR, saliva y biopsia de piel de nuca. Finalmente, en caso de antecedente de viaje internacional se habrán de considerar los agentes relevantes en el área geográfica de procedencia, incluido el virus de la rabia si hay antecedente de mordedura por animal susceptible en zona endémica. En los casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva, la única técnica capaz de proporcionar un diagnóstico es la PCR para virus JC en LCR, sin embargo, para la panencefalitis esclerosante subaguda no hay trabajos que muestren un buen rendimiento de la RT-PCR en LCR, aunque sí en material de autopsia, permitiendo, además, el establecimiento del genotipo del virus. Para aquellos agentes para los que no existe oferta comercial de equipos de amplificación pueden utilizarse métodos publicados en la bibliografía o acudir al laboratorio de referencia.

La interpretación de un resultado positivo en el LCR es muy fácil, ya que cualquier hallazgo debe de considerarse significativo. Sin embargo, hay que considerar que las cargas víricas suelen ser muy bajas, frecuentemente cercanas a los umbrales de detección de las técnicas. Por esta razón, para obtener un rendimiento diagnóstico aceptable en el líquido cefalorraquídeo, es imprescindible combinar una amplificación genómica de exquisita sensibilidad con un alto rendimiento en la extracción de ácidos nucleicos, por lo que al seleccionar unas u otras técnicas es imprescindible comprobar que han sido evaluadas específicamente para este uso. En cualquier caso, a los valores negativos no hay que concederles un valor predictivo elevado.

**7.6.3 Técnicas serológicas.** Cuando la toma de muestra se retrasa puede ocurrir que ya no haya virus viable ni genoma del mismo en el LCR, quedando el diagnóstico serológico como única alternativa. En síndromes post-infecciosos de patogenia inmunitaria como la encefalitis post-varicela o post-sarampión debido a la propia naturaleza del mecanismo patogénico, el diagnóstico de la infección aguda mediante detección de IgM en el suero es la técnica de elección. Ocurre lo mismo para los otros casos en los que el síndrome neurológico, aun no siendo generado por este mecanismo patogénico, también está ligado a la infección primaria por agentes víricos de los que también se puede sospechar por la historia clínico-epidemiológica del paciente, tales como la meningitis por virus Toscana, la coriomeningitis linfocitaria o la encefalitis asociada a exantema súbito o mononucleosis infecciosa. Este era también el caso de la meningitis por virus de la parotiditis en la era pre-vacunal, pero actualmente un porcentaje significativo de los casos ocurren en individuos vacunados, muchos de los cuales no responden con IgM, habiendo disminuido mucho la eficacia de este marcador. Existen equipos comerciales disponibles para la detección de IgM o IgG frente a todos estos agentes por lo que resulta sencillo hacerlo. Para el

diagnóstico de rabia, la presencia de IgG en suero en ausencia de antecedente de vacunación se considera diagnóstico.

En ausencia de antecedentes clínico-epidemiológicos relevantes que apunten a la infección aguda por algún agente, procede complementar a las técnicas de detección directa con la búsqueda de anticuerpos de producción intratecal para VHS y VZV. Para ello no basta la detección de IgG frente a estos agentes en el LCR, ya que estos pueden proceder del torrente sanguíneo si la barrera hematoencefálica se ha permeabilizado por el propio efecto de la reacción inflamatoria. Por ello es necesario apoyar el resultado demostrando la integridad de la barrera hematoencefálica. Esto se consigue a través de índices basados en la comparación de los títulos de anticuerpos (índice de anticuerpos), de la concentración de albúmina (índice de albúmina), o una combinación de ambos parámetros (índice de anticuerpos-albúmina) entre el LCR y un suero tomado al mismo tiempo. El utilizado más frecuentemente es el índice de albúmina LCR/suero con un valor de corte de 0,0075 por debajo del cual pueden considerarse como diagnósticos los hallazgos positivos de IgG específica en LCR. La detección de IgG intratecal frente al virus del sarampión es la técnica de elección para el diagnóstico "ante-mortem" de la panencefalitis esclerosante subaguda. Lamentablemente no existen pruebas serológicas fiables válidas para todos los EV, los cuales constituyen un grupo excesivamente complejo como para poder plantear el diagnóstico mediante pruebas serológicas individuales frente a los numerosos tipos potencialmente implicados en patología neurológica, a pesar de que técnicamente es posible hacerlo mediante técnicas de neutralización, por otra parte bastante complejas de realizar.

## 8. MENINGITIS FUNGICA Y AMEBIANA

### 8.1 MENINGITIS FÚNGICA

*Cryptococcus neoformans* representa la causa más frecuente de infección fúngica del SNC. La mayoría de los casos se presentan en pacientes inmunodeprimidos, especialmente con infección por el VIH. Otros factores de riesgo son el trasplante de órganos, neoplasias hematológicas (sobre todo leucemia mieloide aguda) y otras neoplasias y el tratamiento con corticoides u otros inmunosupresores. Excepcionalmente se presenta la infección en pacientes aparentemente inmunocompetentes. La forma de presentación puede ser aguda, subaguda o crónica, en este caso, las manifestaciones clínicas se instauran de forma insidiosa, progresivamente a lo largo de semanas. *Cryptococcus gattii* causa con mayor frecuencia infección en personas inmunocompetentes; esta especie es propia de zonas tropicales y subtropicales y su presencia se describió inicialmente en Australia. Recientemente, el brote comunicado en la isla de Vancouver (British Columbia, Canadá) afectó tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos, y ha abierto la reflexión sobre su

distribución geográfica. Cuando produce afectación del SNC, se asocia con complicaciones como hidrocefalia y parálisis de pares craneales.

*Candida* spp. es una causa excepcional de meningitis; generalmente, la candidiasis diseminada da lugar a abscesos cerebrales múltiples y sólo en recién nacidos de muy bajo peso, en pacientes con inmunodepresión grave o sometidos a cirugía neurológica, la infección del SNC se presenta como meningitis. Otras infecciones fúngicas como, blastomicosis, esporotricosis o coccidioidomicosis pueden cursar con meningitis, pero no son autóctonas en nuestro medio.

**8.1.1 Etiopatogenia.** En la mayoría de los pacientes con infección por el VIH, la meningitis criptocócica se produce como consecuencia de la reactivación de una infección latente, localizada inicialmente en el pulmón. La infección comienza tras la inhalación del microorganismo, pero la sintomatología en el pulmón es generalmente escasa o nula. El estado de inmunosupresión del individuo permite que la infección no sea controlada en dicha puerta de entrada y por vía hematogena se disemine, sobre todo, al SNC. Entre los factores de virulencia se encuentran la termotolerancia, la cápsula polisacárida, la síntesis de melanina y la secreción de enzimas extracelulares, fosfolipasas, proteinasas y ureasa. Entre los factores del huésped, la inmunidad mediada por anticuerpos no es protectora y tanto un déficit de complemento como las alteraciones de la inmunidad celular, favorecen la infección primaria, la reactivación y la diseminación de la infección.

**8.1.2 Manifestaciones clínicas.** La forma de presentación más frecuente es una meningitis o meningoencefalitis subaguda, los síntomas más precoces incluyen cefalea y fiebre con presencia de signos meníngeos sólo en el 30% de los pacientes. Durante la evolución se produce un deterioro progresivo del nivel de conciencia, hidrocefalia, hipertensión intracraneal, afectación de pares craneales y déficits neurológicos focales en los estadios más avanzados. La meningitis o meningoencefalitis criptocócica asociada a la infección por el VIH se presenta generalmente en pacientes con recuentos de CD4 inferiores a 100 /  $\mu$ l. En estos pacientes se ha descrito un nuevo síndrome asociado al tratamiento antirretroviral de alta eficacia (TARGA) y la reconstitución parcial de la inmunidad, caracterizado por la presentación aguda de una meningitis, como consecuencia de una respuesta inmunitaria al polisacárido capsular en una criptococosis latente.

Los pacientes inmunocompetentes infectados por *C. gattii* y excepcionalmente por *C. neoformans*, pueden presentar tumoraciones cerebrales únicas o múltiples denominadas criptocomas, sin desarrollar meningoencefalitis.

**8.1.3 Diagnóstico clínico.** La clínica de la meningitis criptocócica es muy dispar y, por tanto, la sospecha en este tipo de pacientes es muy importante. Tanto las manifestaciones clínicas como las pruebas analíticas habituales son inespecíficas. El 10% de los pacientes presentan lesiones cutáneas que preceden

la aparición de los síntomas meníngeos y su presencia puede ayudar al diagnóstico. El LCR no suele mostrar proteínas muy elevadas y/o disminución de la glucosa, aunque un LCR con hiperproteíorraquia e hipoglucorraquia orienta hacia esta etiología. La pleocitosis es variable, oscilando entre 20- 400 células/mm<sup>3</sup> con predominio generalmente de linfocitos. Las pruebas de imagen, TAC y resonancia magnética, son normales en el 50% de los casos y cuando existen alteraciones no son patognomónicas. En pacientes con sida el hallazgo más frecuente es la hidrocefalia y en ocasiones, la existencia de lesiones parenquimatosas que pueden corresponder a criptocomas, linfomas o representar lesiones de una segunda infección oportunista como toxoplasmosis o nocardiosis.

**8.1.4 Diagnóstico microbiológico.** El diagnóstico microbiológico se basa en la tinción de Gram, tinción de contraste con tinta china, cultivo y la detección del antígeno capsular en una muestra de LCR. También deben obtenerse hemocultivos que especialmente en pacientes con sida pueden ser positivos hasta en el 50% de los casos.

**8.1.4.1 Tinciones.** La tinción de Gram del sedimento del LCR revela la presencia de levaduras, sin embargo, el método más rápido y específico para el diagnóstico de meningitis criptocócica es la tinción de contraste con tinta china. Esta tinción permite observar sobre un fondo negro la cápsula refringente de la levadura. El 80% de las infecciones en pacientes con sida y el 50% de las no relacionadas con el VIH pueden ser diagnosticadas con esta técnica.

La tinción se realiza con tinta china comercial, mezclando una gota del sedimento de la muestra con un volumen igual de tinta. Puede haber falsos negativos cuando el número de levaduras presentes en la muestra es inferior a 10<sup>3</sup> UFC/ml; los falsos positivos se producen por confusión con artefactos o linfocitos.

La tinción fluorescente de calcofluor no es específica para criptococo, sin embargo, puede poner de manifiesto la existencia de levaduras en la muestra cuando el inóculo es muy escaso.

**8.1.4.2 Cultivo.** El cultivo de la muestra de LCR establece el diagnóstico definitivo. Los medios de cultivo empleados habitualmente en el procesamiento de muestras de LCR, permiten el crecimiento de los criptococos al cabo de 48-72 horas de incubación en aerobiosis. Puede emplearse también agar Sabouraud dextrosa sin cicloheximida. En pacientes con tratamiento, los cultivos deben reincubarse hasta 30 días.

**8.1.4.3 Técnicas serológicas.** La detección del antígeno polisacárido capsular en una muestra de LCR y en el suero se realiza con técnicas de aglutinación de látex o ELISA que presentan una sensibilidad y especificidad superior al 90%.

La cuantificación del título de antígeno tiene valor pronóstico, de forma que títulos superiores a 1/1024 se relacionan con un alto inóculo de levaduras, una pobre respuesta inmunitaria y mayor probabilidad de un fallo terapéutico. Igualmente, durante el

seguimiento, la disminución progresiva del título de antígeno indica buena respuesta al tratamiento y mejor pronóstico.

**8.2 INFECCIONES POR AMEBAS DE VIDA LIBRE**  
Progresivamente se va conociendo la importancia de diversos géneros y especies de amebas de vida libre, tales como *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia*, como agentes causales de diferentes procesos patológicos como queratitis, meningoencefalitis, encefalitis granulomatosa y enfermedad sistémica granulomatosa.

Una de las formas más sorprendentes de estas infecciones es la meningoencefalitis causada por *Naegleria fowleri*, que se produce en niños y jóvenes sanos en los que al bañarse en aguas de balsas y charcas la ameba atraviesa la lámina cribiforme del etmoides alcanzando el SNC y produciendo una meningoencefalitis rápidamente mortal.

Afortunadamente, en nuestro medio las infecciones del SNC por estos microorganismos son muy raras. Para su descripción detallada se recomienda el trabajo de Koshy, Blackburn y Singh.

## **9. INFECCIONES RELACIONADAS CON LAS DERIVACIONES DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR)**

### **9.1 INTRODUCCIÓN**

Los sistemas de derivación de LCR se utilizan para disminuir la presión del LCR en pacientes con hidrocefalia y es uno de los procedimientos neuroquirúrgicos más frecuentes.

Las infecciones de estos sistemas se producen fundamentalmente durante la cirugía y conllevan alta morbilidad y mortalidad. Actualmente representan el 45%- 50% de las meningitis / ventriculitis nosocomiales en adultos.

Pueden ser de dos tipos: derivaciones internas o *shunts* y derivaciones externas para drenaje ventricular o lumbar externo.

**Derivaciones internas o shunts.** Son sistemas permanentes internalizados; constan de un catéter con extremos proximal y distal multiperforados y una válvula unidireccional entre ambos que se encuentra alojada junto a un reservorio que permite la obtención de muestras de LCR y la administración local de fármacos.

Existen varios tipos según donde se alojen los catéteres proximal y distal. Las más utilizadas son, con mucho, las derivaciones ventrículo peritoneales (DVP), que drenan a la cavidad peritoneal. Las derivaciones ventrículo atriales (DVA) se utilizan con menor frecuencia, en este caso, el LCR es drenado a la aurícula derecha. Por último, en ocasiones, se emplea la derivación lumboperitoneal (DLP), similar a la DVP pero de origen en el espacio espinal.

La incidencia de infección de las derivaciones internas de LCR es variable, oscila entre el 5% y 10%, según las series. Los factores de riesgo de infección están relacionados con el paciente (edad, patología de base, lesiones cutáneas), con la cirugía (duración de la intervención, técnica quirúrgica) y con la propia derivación (tipo de *shunt*, neurocirugía previa, infección previa del *shunt*).

Derivaciones externas. Son sistemas de drenaje temporales, utilizan un catéter que pone en comunicación el espacio subaracnoideo o ventricular con el exterior, generalmente con un trayecto subcutáneo tunelizado y sin sistema valvular. La principal complicación de las derivaciones externas es la infección, cuya incidencia es de alrededor del 5%-15%. En el 3% de los casos, se aprecian signos de infección en el punto de inserción del catéter.

## 9.2 ETIOPATOGENIA

Derivaciones internas. Los microorganismos implicados en la infección de las derivaciones internas son los propios de la microbiota cutánea. Estafilococos coagulasa negativa, principalmente *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* son los agentes causales más frecuentes, seguidos por *Corynebacterium* spp y *Propionibacterium acnes*. La infección se produce, generalmente, por contaminación del catéter con la microbiota de la piel del propio paciente durante el acto quirúrgico y aparece a las pocas semanas de la intervención. Otras posibles vías de infección son: contigüidad a partir de la infección de la herida quirúrgica de inserción o de decúbitos de la piel, vía hematogena y vía ascendente a partir de la microbiota del colon. En este último caso, la infección suele ser polimicrobiana y predominan las enterobacterias.

Derivaciones externas. Los agentes causales más frecuentes son estafilococos coagulasa negativa, *S. aureus* y estreptococos (25-50% de casos). El resto son enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros patógenos nosocomiales, en ocasiones multirresistentes, aislados fundamentalmente en pacientes ingresados en las UCIs. La infección raramente ocurre durante la inserción del catéter, sino en los días posteriores. Los microorganismos progresan por la superficie externa del catéter hasta llegar al LCR ventricular o por vía intraluminal si se ha manipulado el sistema. El riesgo de infección aumenta a partir de los 5-7 días de la inserción del catéter.

## 9.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas son variables en relación con el mecanismo patogénico, el tipo de *shunt*, la localización anatómica de la derivación y la virulencia del microorganismo implicado.

En las derivaciones internas, la forma de presentación más habitual es el denominado síndrome de malfuncionamiento del *shunt*, que cursa con cefalea, náuseas o vómitos, alteraciones de la conducta o disminución progresiva del nivel de conciencia, con o sin fiebre. Los signos meníngeos son infrecuentes, ya que el LCR infectado de los ventrículos no está en contacto con las meninges. En las infecciones de DVP, la clínica abdominal es frecuente (40% de los casos), presentándose a menudo dolor con o sin signos de irritación peritoneal; también, pueden presentarse cuadros agudos por perforación intestinal o pseudo-obstrucción.

La infección de la DVA se manifiesta principalmente por fiebre y puede originar

complicaciones graves como endocarditis tricuspídea o embolismos pulmonares sépticos. Se presenta síndrome meníngeo en alrededor de un tercio de los casos, siendo la rigidez de nuca especialmente frecuente en los casos de infección de DLP.

La infección del catéter de derivación externa origina siempre una ventriculitis que se manifiesta por fiebre y alteración del nivel de conciencia con o sin meningitis. En ocasiones se observan signos de infección en el punto de inserción del catéter.

En cuanto a los agentes etiológicos, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., y bacilos gramnegativos nosocomiales originan una clínica más aguda. Estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp. y sobre todo, *P. acnes*, dan lugar a una clínica más larvada que dificulta y retrasa el diagnóstico.

En ambos tipos de derivación, el LCR puede ser citoquímicamente normal en fases iniciales, pero posteriormente muestra pleocitosis neutrofílica, hipoglicorraquia e hiperproteorraquia.

## 9.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La sospecha clínica es fundamental, y ante todo paciente portador de una derivación que presente signos de malfunción valvular, febrícula o fiebre intermitente de origen no aclarado, alteración del nivel de conciencia, irritabilidad, somnolencia o molestias abdominales inespecíficas se requiere descartar infección del *shunt*. El diagnóstico se realiza cuando existe una clínica compatible, alteraciones citoquímicas en el LCR y cultivo positivo de LCR. Aunque, la pleocitosis elevada se correlaciona bien con la existencia de infección, la ausencia de pleocitosis o alteraciones en la bioquímica del LCR no permiten excluir una infección del sistema de derivación; en este sentido, aún con parámetros bioquímicos normales, es imprescindible realizar el estudio microbiológico del LCR.

## 9.5 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico se basa en la tinción de Gram y el cultivo del LCR. Como ya se ha comentado, deben obtenerse hemocultivos si el paciente está séptico; aunque, su positividad es menor del 20% en las DVP, alcanza hasta el 95% en el caso de DVA.

La rentabilidad de los cultivos de LCR obtenido por punción del reservorio o de los catéteres es más elevada que la de los cultivos de muestra obtenida por punción ventricular.

En pacientes con malfunción valvular y un cultivo de LCR positivo, sin otra clínica, se recomienda realizar una nueva punción para comprobar si se repite el aislamiento, a fin de diferenciar entre contaminación, colonización e infección del sistema. Contaminación se define por un solo aislamiento en el LCR ó tinción de Gram positiva, en ausencia de síntomas de infección y de alteraciones bioquímicas del LCR. La colonización del catéter se define por la existencia de más de un cultivo o tinción de Gram positivos con el mismo patógeno, con LCR con bioquímica normal y en ausencia de clínica de infección. En la ventriculitis se presenta pleocitosis progresiva con o sin hipoglicorraquia o

hiperproteínoorraquia, y tinción Gram y/o cultivo del LCR ventricular positivos. Sin embargo, en infecciones causadas por *P. acnes*, el LCR puede ser normal.

**9.5.1 Tinción de Gram.** La tinción de Gram del LCR es positiva sólo en el 30% de los casos; sin embargo en estos casos, proporciona una información diagnóstica inmediata que permite orientar el tratamiento antibiótico.

**9.5.2 Cultivo de LCR.** Además del cultivo convencional, el procesamiento de muestras de LCR para diagnóstico de infección de derivaciones debe incluir siempre medios de cultivo y atmósfera para el desarrollo de bacterias anaerobias manteniendo la incubación de los cultivos durante 7-14 días. El 50% de los aislamientos de *P. acnes* se obtienen a los 7-10 días de incubación por lo que debe incluirse siempre un caldo de enriquecimiento para bacterias anaerobias en el procesamiento de la muestra (caldo tioglicolato o similar). Para el procesamiento correcto de la muestra, resulta de la mayor importancia conocer el diagnóstico clínico de sospecha y el origen de la muestra.

El cultivo de LCR obtenido por punción lumbar suele ser negativo en pacientes con *shunts* ventriculares y no se recomienda su obtención por su baja rentabilidad y el riesgo de enclavamiento en hidrocefalias no comunicantes; por el contrario, en pacientes con derivación lumboperitoneal el cultivo del LCR lumbar resulta positivo en el 80-90% de los casos de infección.

Los aislamientos en el LCR de bacterias poco virulentas como *P. acnes*, *Corynebacterium* spp., o estafilococos coagulasa negativa, en principio deben ser considerados como posibles agentes etiológicos de la infección y es necesario realizar una nueva punción para comprobar que se repite el aislamiento.

**9.5.3 Cultivo del catéter de derivación.** En el 5%-10% de los casos sólo se obtiene el aislamiento en el cultivo del catéter, una vez retirado. Sin embargo, aunque numerosos autores recomiendan el cultivo de los extremos del catéter, no existen estándares de procesamiento para este tipo de muestras y tampoco se ha definido el valor umbral a partir del cual un catéter se considera colonizado.

Diferentes autores recomiendan distintos tipos de procesamiento según su propia experiencia, siendo los métodos más extendidos el cultivo del material obtenido de la irrigación intraluminal, o tras la sonicación de los dos extremos del catéter. Esta última técnica parece mejorar el resultado, al desprenderse partículas de la biocapa con bacterias, que, de otra forma no se cultivarían. El cultivo en medio líquido presenta mayor rendimiento, sin embargo, facilita el crecimiento de un bajo número de bacterias que pueden colonizar el *shunt* en el momento de la retirada, por lo que resulta difícil la valoración de los resultados.

**9.5.4 Técnicas genómicas.** Se ha evaluado la PCR, para detectar la presencia de ADN bacteriano, en muestras de LCR de pacientes con derivaciones externas e internas y sospecha clínica de infección y en algunas series, ha demostrado un alto valor predictivo negativo que permitiría excluir la existencia

de infección. Sin embargo, de momento, existen pocos datos en cuanto al valor diagnóstico de estas técnicas.

## 10. ABSCESO CEREBRAL

### 10.1 INTRODUCCIÓN

El absceso cerebral es una infección focal del parénquima cerebral, que puede ser originado por bacterias, hongos, protozoos o helmintos. Se presenta inicialmente como una zona de edema (cerebritis) que evoluciona hasta convertirse al cabo de unos 10-14 días en una colección purulenta envuelta por una cápsula fibrosa. Otras infecciones focales que comparten características clínicas y etiopatogénicas con el absceso cerebral son el empiema subdural, el absceso epidural, las lesiones quísticas de origen infeccioso y algunas formas de encefalitis focal con necrosis o inflamación granulomatosa como toxoplasmosis y tuberculosis.

Es una entidad clínica infrecuente, con una incidencia aproximada, según las series, de 1/10.000 ingresos; su frecuencia es mayor en varones que en mujeres en una proporción de 1,5-3:1 con una media de edad de 30-45 años. Alrededor del 25% de los casos se presentan en niños de 4 a 7 años y se originan, generalmente, a partir de focos óticos o en relación con cardiopatías congénitas. En las series más recientes se observa un incremento de los casos en pacientes inmunodeprimidos y en relación con procedimientos neuroquirúrgicos.

A pesar de los avances en las técnicas diagnósticas y en la terapéutica, las cifras de mortalidad siguen siendo elevadas (5%-20%) con secuelas neurológicas importantes en los supervivientes.

### 10.2 ETIOPATOGENIA

El absceso cerebral se puede desarrollar por diferentes mecanismos: 1) por extensión por contigüidad desde focos próximos de infección, especialmente localizados en oído medio, mastoides, senos paranasales, y con menor frecuencia focos odontógenos. Estos abscesos se localizan fundamentalmente en el lóbulo temporal o en el cerebelo. 2) Por diseminación hematógena a partir de infecciones pulmonares, cardiopatías congénitas con *shunt* derecha-izquierda, infecciones dentales o endocarditis bacteriana; en este caso, suelen originarse múltiples abscesos localizados principalmente en el territorio de distribución de la arteria cerebral media, en la unión cortico-subcortical. 3) Por inoculación directa como consecuencia de traumatismos craneales o procedimientos neuroquirúrgicos. En el 10%-30% de los casos no se encuentra ningún factor predisponente.

El foco de origen responsable de la formación del absceso y las características del huésped orientan, generalmente, la etiología del absceso cerebral.

Los estreptococos, y fundamentalmente los estreptococos del grupo *milleri* (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*) son los agentes causales más frecuentes de abscesos cerebrales originados por contigüidad a partir de otitis media y mastoiditis (70% de los casos) y frecuentemente se

encuentran formando parte de una infección polimicrobiana (30-60% de los casos).

Las bacterias anaerobias, *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., ocupan también un lugar destacado en la etiología de los abscesos cerebrales, casi siempre en relación con otitis media crónica y mastoiditis, formando parte de una microbiota mixta junto a enterobacterias. Otros anaerobios menos frecuentes son *Fusobacterium* spp., *Actinomyces* spp. y *Propionibacterium* spp.

*S. aureus* y distintos estreptococos del grupo *viridans* se encuentran como agentes etiológicos en abscesos secundarios a traumatismos craneales, endocarditis bacteriana o cardiopatías congénitas. Distintas enterobacterias y *P. aeruginosa* pueden causar abscesos por contigüidad a partir de focos óticos de infección o ser secundarios a bacteriemias o cirugía neurológica.

En pacientes inmunodeprimidos, determinados patógenos oportunistas son la causa principal de abscesos cerebrales. *Toxoplasma gondii* es, con diferencia, la primera causa de absceso cerebral en pacientes con sida, en general, las lesiones presentan un efecto masa que no constituye propiamente un absceso o colección supurada. Otros patógenos oportunistas que pueden producir abscesos en estos pacientes son *M. tuberculosis* y *C. neoformans*. En pacientes transplantados y en neutropénicos con neoplasias hematológicas, además de los anteriores, otras causas de absceso cerebral son *Aspergillus* spp., *Nocardia* spp., *Candida* spp., *L. monocytogenes* y agentes de la mucormicosis. En los países en vías de desarrollo, *Taenia solium*, el agente causal de la neurocisticercosis y protozoos como *Trypanosoma cruzi* y *Entamoeba histolytica* son causas esporádicas de abscesos cerebrales.

### 10.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas y los signos neurológicos de los pacientes con absceso cerebral varían según la localización, el tamaño, el número de lesiones, el estado inmunitario y el poder patógeno del agente causal. En general predominan las manifestaciones clínicas secundarias a la lesión ocupante de espacio y quedan en lugar secundario las manifestaciones propias de la infección. Los síntomas suele desarrollarse en menos de dos semanas aunque, en ocasiones, la presentación puede ser indolente o aguda y fulminante. El síntoma más frecuente es la cefalea que esta presente en el 70% de los casos, mientras que aparece fiebre en menos de la mitad. Se presentan crisis convulsivas en el 25%-45% de los casos y más de la mitad de los pacientes presentan déficits neurológicos focales (hemiplejía, trastornos visuales, hipertensión intracraneal, síndrome cerebeloso). Edema de papila y rigidez de nuca se observan sólo en el 25% de los casos. Los signos y síntomas del foco primario de infección son identificables en el 80% de los casos.

### 10.4 DIAGNÓSTICO

La presencia de déficit neurológico, cefalea de más de 48 horas de evolución, papiledema, y la

existencia de un foco infeccioso potencialmente causante de absceso cerebral establecen la sospecha clínica del proceso infeccioso. Los hallazgos de laboratorio son inespecíficos. Existe leucocitosis en el 55% de los casos y VSG elevada en el 75%-90%.

Dado el riesgo de herniación está contraindicada la realización de punción lumbar hasta disponer de una prueba de imagen que, actualmente constituyen la base del diagnóstico del absceso cerebral.

**10.4.1 Diagnóstico por técnicas de imagen.** La tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM) con contraste son las técnicas diagnósticas de elección y han reemplazado a las técnicas isotópicas, aunque en situaciones puntuales, los estudios tomográficos con marcadores radioactivos (PET, SPECT-Talio) pueden ser útiles para el diagnóstico diferencial con tumores.

La TAC craneal con contraste tiene una sensibilidad diagnóstica próxima al 100%, aunque puede haber resultados falsos negativos en estadios muy precoces de la infección. En la fase inicial de cerebritis se observan en la TAC hipodensidades mal definidas con mayor o menor grado de realce tras la administración de contraste. En fases posteriores aparece la imagen característica de lesión hipodensa rodeada de un anillo intenso, a su vez rodeado de una zona también hipodensa e irregular de edema, realzando la intensidad del anillo tras la administración de contraste. Esta imagen no es patognomónica de absceso cerebral y es necesario realizar un diagnóstico diferencial con neoplasias, especialmente metástasis, granulomas, infarto cerebral y hematoma en resolución, si bien la imagen de realce en anillo es más fina y regular en la cerebritis y el absceso que en los otros procesos.

La toxoplasmosis, en pacientes con sida, muestra habitualmente lesiones múltiples y bilaterales, localizadas preferentemente en la unión corticomedular y en los ganglios basales.

La RM con contraste de gadolinio es más sensible que la TAC en estadios precoces de cerebritis. La imagen característica es un anillo de señal hiperintensa en imágenes diferenciadas en T1, con un centro hipointenso.

Las pruebas de imagen, además de facilitar el diagnóstico precoz, proporcionan información de gran importancia para el planteamiento terapéutico y el seguimiento y permiten la evaluación de los focos parameningeos.

**10.4.2 Diagnóstico microbiológico.** Los hemocultivos son positivos en el 10%-20% de los casos de absceso cerebral, en relación con la bacteriemia que da lugar a los abscesos hematógenos, tromboflebitis craneal supurada concomitante o ventriculitis o meningitis por ruptura del absceso. El LCR es sólo excepcionalmente positivo y como se ha mencionado, por el riesgo de herniación, la punción lumbar está en general contraindicada.

El cultivo del material del absceso, obtenido mediante punción-aspiración dirigida o mediante cirugía abierta, es el método de referencia para establecer el diagnóstico etiológico. La muestra debe

ser obtenida, siempre que sea posible, antes de iniciar tratamiento antibiótico y dada la frecuencia de bacterias anaerobias es imprescindible utilizar un medio de transporte adecuado (contenedor tipo Portagerm o similar) y enviar la muestra al laboratorio inmediatamente.

El estudio microbiológico del material del absceso debe incluir una tinción de Gram, realizada de forma urgente y siembra en medios de cultivo convencionales con incubación en atmósferas aerobia y anaerobia. La realización de tinciones y cultivos especiales dependerá de los diagnósticos diferenciales considerados, según las características del paciente y del potencial foco de origen, responsable de la formación del absceso.

**10.4.2.1 Tinción de Gram.** Proporciona una información diagnóstica inmediata que permite orientar el tratamiento antibiótico. La sensibilidad de la tinción de Gram en muestras de abscesos cerebrales, aunque variable según las series, oscila entre el 75% y 95%.

**10.4.2.2 Cultivo.** El cultivo del material obtenido es el método definitivo para el diagnóstico etiológico, por lo que esta muestra debe ser rutinariamente enviada al laboratorio tras su obtención y procesada inmediatamente, tras su recepción en el laboratorio.

En pacientes que no han recibido previamente tratamiento antibiótico, la sensibilidad del cultivo es próxima al 90%. Sin embargo, la ausencia de resultados positivos en la tinción de Gram y el cultivo, no excluye una etiología infecciosa. Si existe sospecha clínica de etiología fúngica o por patógenos oportunistas, se realizarán cultivos, tinciones y otras técnicas de diagnóstico microbiológico adecuados a la sospecha: tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo de micobacterias, tinción de Ziehl-Neelsen modificada si se sospecha infección por *Nocardia* spp., cultivo y tinciones específicas para hongos (calcofluor, Giemsa), o bien, técnicas serológicas (diagnóstico de toxoplasmosis y criptococosis) o moleculares.

**10.4.2.3 Serología.** En pacientes inmunodeprimidos con sospecha de infección por *T. gondii*, las pruebas serológicas pueden ser de gran ayuda diagnóstica. En pacientes con sida, la toxoplasmosis del SNC ocurre como consecuencia de la reactivación de una infección latente y más del 90% de los pacientes presentan títulos de IgG anti-toxoplasma más o menos elevados. El valor predictivo de un resultado serológico positivo en pacientes con alteraciones típicas en los estudios de imagen se sitúa alrededor del 80% y en general, en pacientes con anomalías radiológicas y serología positiva se considera indicado el inicio de un tratamiento específico anti-toxoplasma.

**10.4.2.4 Técnicas genómicas.** La PCR en tiempo real se ha aplicado a muestras de sangre o LCR para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral, demostrando una sensibilidad del 50% con una especificidad próxima al 100%; sin embargo, la utilidad de esta técnica, de momento, no está bien establecida. La identificación bacteriana mediante amplificación y secuenciación del gen que codifica el 16S ARN bacteriano, se ha aplicado directamente en muestras

de abscesos en las que se observan microorganismos en la tinción de Gram y presentan cultivo negativo y ha demostrado, en algunos estudios, buenos resultados. Como hemos citado anteriormente en general se prefiere el empleo de PCR específicas, para detectar microorganismos concretos cuando hay datos que permiten sospechar el agente etiológico, al empleo de PCR universales o multiplex, que presenta mucha menor sensibilidad. El principal problema que presentan las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de los abscesos cerebrales es la frecuencia de infecciones polimicrobianas que son detectadas como una superposición de secuencias que hace muy difícil la lectura e interpretación de los resultados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andreu A, Ortega E, Planes A, Salcedo S. Evolución de la sepsis perinatal por *Escherichia coli*, en la era de la profilaxis del estreptococo del grupo B. Med Clin (Barc) 2001; 117: 521-4.
2. Bennett JE. Chronic meningitis. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) Principles and practice of infectious diseases 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2010. Pp. 1237-1242.
3. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. J Med Virol 1999; 57:145-151.
4. Donoso O, Vaheer A, Ambrose H, Koopmans M, de Ory F, Sélér H, Beyrer K, Windorfer A, Niedrig M. Representing the European Network for Diagnostics of 'Imported' Viral Diseases (ENIVD) Working Group for Viral CNS Diseases. Analysis of the surveillance situation for viral encephalitis and meningitis in Europe. Eurosurveillance 2008;13:1-10.
5. Fernández Viladrich P, Cabellos Minguez C. Infecciones del sistema nervioso central. In: Ausina V, Moreno S, editors. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Buenos Aires, Madrid. Editorial Médica Panamericana. 2005. Pp. 343-361.
6. Hazen KC, Howell SA. Candida, Cryptococcus, and other yeast of medical importance. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of clinical microbiology 9<sup>th</sup> ed. Washington D.C. ASM Press. 2007. Pp. 1762-1788.
7. Honda H, Warren DK. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess. Infect Dis Clin North Am 2009; 23:609-23.
8. Ihekwa U, Kudesia G, McKendrick M. Clinical features of viral meningitis in adults: significant differences in cerebrospinal fluid findings among Herpes Simplex Virus, Varicella Zoster Virus, and Enterovirus Infections. Clin Infect Dis 2008; 47:783-789.
9. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th edition, vol. 1. Section 2: Specimen collection, transport, and acceptability. Washington D.C. ASM Press. 2004.
10. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th edition, vol. 1. Section 3: Aerobic Bacteriology. Washington D.C. ASM Press. 2004.
11. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th edition, vol. 1. Section 4.2: Anaerobic Bacteriology. Collection and transport of clinical specimens for anaerobic culture. Washington D.C. ASM Press. 2004.
12. Jarvis JN, Harrison TS. HIV – associated cryptococcal meningitis. AIDS 2007; 21:2119-2129.
13. Jiménez-Mejías ME, García-Cabrera E. Infecciones relacionadas con los sistemas de drenaje de líquido

- cefalorraquídeo. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:240-251.
14. Kennedy PG. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis and management. *J Neurol neurosurg Psychiatry* 2004; 75:i10-i15.
15. Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett K, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:17258-17263.
16. Koshy AA, Blackburn BG, Singh U. Free-living amebas In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Seventh ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2010. p. 3427-3436.
17. Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME; European Union Invasive Bacterial Infection Surveillance participants. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis* 2010;16:455-463.
18. Pérez-Ruiz M, Vicente D, Navarro-Marí JM. Autochthonous acute viral and bacterial infections of the central nervous system (meningitis and encephalitis). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; Suppl 9:8-14.
19. Pérez-Trallero E, Marimon JM, Ercibengoa M, Vicente D, Pérez-Yarza EG. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children and older adults in the north of Spain before and after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:731-738.
20. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) Principles and practice of infectious diseases 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2010. Pp. 3287-3303.
21. Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO). Sociedad Española de Neonatología (SEN). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ). Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria (SEMFYC). Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21:417-423.
22. Thomson RB. Jr. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of clinical microbiology 9<sup>th</sup> ed. Washington D.C. ASM Press. 2007. Pp. 291-333.
23. Trallero G, Avellon A, Otero A, de Miguel T, Pérez C, Rabella N, Rubio G, Echevarria JE, Cabrerizo M. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J Clin Virol* 2010; 47:170-176.
24. Tunkell AR. Brain abscess. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) Principles and practice of infectious diseases 7<sup>th</sup> ed Philadelphia. Churchill Livingstone. 2010. Pp. 1265 – 1278.
25. Tunkell AR, Drake JM. Cerebrospinal fluid shunt infection. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) Principles and practice of infectious diseases 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia. Churchill Livingstone. 2010. Pp. 1231-1236.
26. Tunkell A, Scheld W. Acute Meningitis. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Sixth ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2005. Pp. 1083-1086.
27. Yogev R, Bisno AL. 2000. Infections of central nervous system shunts. In Waldvogel FA, Bisno AL (eds) 3rd ed. Washington D.C. ASM. 2000. Pp. 231-246.



**PNT-SNC-01**

**PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO  
OBTENIDO POR PUNCIÓN LUMBAR O A TRAVÉS DE SISTEMAS DE DERIVACIÓN**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Procesamiento microbiológico de muestras de líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar o a través de sistemas de derivación</b>	<b>PNT-SNC-01</b>	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenidas por punción lumbar o a través de sistemas de derivación internas o externas para realizar el diagnóstico etiológico de estas infecciones, así como los criterios de interpretación de los cultivos.

## 2. FUNDAMENTO

Las meningitis bacterianas agudas están producidas por microorganismos piógenos y adquiridos en su mayoría en la comunidad.

Las infecciones de los sistemas de derivación de LCR son procesos frecuentes que conllevan alta morbilidad y mortalidad y se producen fundamentalmente durante la cirugía. Algunos de los agentes etiológicos de estas infecciones pueden tener requerimientos especiales y es necesario conocer la sospecha clínica y la procedencia de la muestra para realizar un procesamiento correcto que permita el aislamiento de estos patógenos.

El diagnóstico de certeza sólo se alcanza cuando ante una clínica y unas alteraciones citoquímicas del LCR compatibles, se aísla un microorganismo en el cultivo de LCR.

En el presente procedimiento se describe el método a seguir para el procesamiento correcto de LCR obtenidos por punción lumbar y a través de derivación. Estos últimos presentan diferencias, en algunos aspectos, con el cultivo convencional de LCR.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Aguado JM, Almirante B, Fortún J. 2008. Protocolos Clínicos SEIMC II. Infecciones del sistema nervioso central.

- Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition, vol. 1. 2004. Section 3.7: Aerobic Bacteriology. Cerebrospinal fluid cultures. ASM Press. Washington D.C.

- Jiménez-Mejías ME, García-Cabrera E. Infecciones relacionadas con los sistemas de drenaje de líquido cefalorraquídeo. Enf Infecc Microbiol Clin 2008; 26:240-251.

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe estar correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente: los datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), fecha, servicio de procedencia y datos del médico que realiza la petición. Datos de la muestra (tipo de muestra y técnica de obtención), determinaciones

microbiológicas solicitadas. Datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo).

### 4.2. OBTENCION DE LA MUESTRA

La muestra debe obtenerse, siempre que sea posible, antes de iniciar el tratamiento antibiótico. La punción lumbar se realizará en condiciones de asepsia rigurosa. Se limpiará la piel en la zona de punción abarcando una superficie de unos 10 cm<sup>2</sup> con alcohol y después se aplicará una solución antiséptica como alcohol yodado, povidona yodada o solución alcohólica de clorhexidina al 0,5%, dejando actuar durante 1 minuto. La punción se realizará en el espacio intervertebral L3-L4, L4-L5, ó L5-S1. El LCR se recogerá en tubos estériles. Siempre que sea posible se obtendrán dos tubos, uno para análisis bioquímico y otro para estudio microbiológico, seleccionando siempre el más turbio para los análisis microbiológicos.

En las derivaciones externas, el LCR se obtendrá a través del catéter ventricular o lumbar, con las máximas condiciones de asepsia, aplicando un antiséptico en la llave antes de realizar la obtención de la muestra y después de la misma.

En las derivaciones internas, el LCR se obtiene por punción directa del reservorio o de la válvula, o en ocasiones, a través del catéter distal externalizado. La punción del reservorio debe realizarse con todas las medidas de asepsia para evitar la infección iatrogénica o la contaminación de la muestra. En general, la obtención de LCR por punción del reservorio o del catéter externo, permite obtener un gran volumen de muestra.

El volumen de LCR aspirado debe ser inoculado en un contenedor estéril con tapa de rosca que permita un cierre hermético.

### 4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

Es necesario transportar la muestra al laboratorio de modo inmediato, ya que se trata de una situación clínica urgente, que requiere el informe rápido de la tinción de Gram y la siembra inmediata de la muestra. Si la muestra no se procesa inmediatamente, se debe conservar en la estufa a 35°C ± 2°C o a temperatura ambiente. Nunca se debe refrigerar la muestra.

### 4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Deben considerarse criterios de rechazo los siguientes:

- Defectos en la identificación de la muestra y/o volante de petición (etiquetado erróneo, que no permite la identificación correcta del paciente).
- Conservación inadecuada (temperatura o medio de transporte inadecuado).
- Muestras derramadas.

Estas incidencias deben ser comunicadas al clínico correspondiente, indicando el procesamiento o no de

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Procesamiento microbiológico de muestras de líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar o a través de sistemas de derivación</b>	<b>PNT-SNC-01</b>	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

la muestra e incidiendo en la interpretación de los resultados si se llevara a cabo el mismo.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 5.1 MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Caldo de enriquecimiento para anaerobios (caldo tioglicolato o similar) para muestras de LCR de derivaciones externas o internas

### 5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS:

- Colorantes para tinción de Gram
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera específica (5-7% de CO<sub>2</sub> y anaerobiosis)

## 6. APARATOS Y MATERIALES

- Contenedores estériles de cierre hermético y tapa de rosca
- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Citocentrífuga
- Centrífuga
- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Asas de siembra estériles
- Portaobjetos
- Estufa de aerobiosis a 35°C
- Jarras de incubación o cámaras de CO<sub>2</sub>
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se procesarán tan pronto como se reciban en el laboratorio.

El procesamiento se llevará a cabo en cabina de bioseguridad tipo II.

**7.1.1. Tinción de Gram.** Con pipeta Pasteur estéril, aspirar de 0,5 a 1 ml de la muestra y depositarlo en una cámara de citocentrífuga. Centrifugar a continuación la muestra siguiendo las instrucciones del fabricante.

Realizar tinción de Gram del botón obtenido en el portaobjetos.

Alternativamente, la tinción de Gram puede prepararse a partir del sedimento obtenido por centrifugación convencional (10 minutos a 2000 g) ; sin embargo, la citocentrifugación aumenta hasta 100 veces la sensibilidad de la tinción, comparada con la centrifugación convencional o la tinción de muestras no centrifugadas.

**7.1.2. Cultivo.** Si hay volumen suficiente, inocular 1 ml de la muestra en el caldo de cultivo si se va a utilizar (LCR de derivaciones).

Centrifugar el resto de la muestra (10 minutos, 2000 g).

Con pipeta Pasteur estéril, retirar el sobrenadante, hasta dejar 0,5 ml para resuspender el sedimento.

Agitar bien en vortex para conseguir resuspender completamente el botón.

Con pipeta Pasteur estéril, inocular 2 ó 3 gotas en los medios de cultivo indicados.

### 7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Agar sangre, Agar chocolate (5-7% CO<sub>2</sub>): 5 días.

Caldo tioglicolato (aerobiosis 35°C): 14 días.

### 7.3. LECTURA DE CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### Tinción de Gram

Los resultados de la observación microscópica de las extensiones (ausencia o presencia de leucocitos polimorfonucleares y ausencia o presencia de uno o varios morfotipos bacterianos) se informarán al clínico peticionario y quedarán registrados en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra.

#### Cultivo

Examinar las placas cada 24 horas, hasta un total de 5 días. Examinar el caldo cada 24 horas, para la detección de crecimiento macroscópico (turbidez), hasta un total de 14 días.

Si los cultivos presentan crecimiento:

1. Correlacionar los aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram.
2. Trasladar al facultativo peticionario un informe preliminar con la identificación presuntiva.
3. Identificar los aislados a nivel de especie y realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos según las normas estandarizadas vigentes (CLSI, EUCAST).
4. Si el crecimiento se produce sólo en los caldos de cultivo y no en las placas, realizar subcultivo del caldo en medios sólidos (agar sangre, agar chocolate) y correlacionar el aislado con el morfotipo observado en la tinción de Gram.
5. Cuando en un caldo crecido se observe por tinción de Gram microorganismos que no crecen en el subcultivo, proceder a subcultivar en medios nutricionalmente más ricos y en diferentes condiciones de incubación.

### 7.4. CONTROL DE CALIDAD

1. Comprobar según el "Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media: Approved Standard. 3 Edition M22-A3 (antes CLSI)" que el control de los medios convencionales está asegurado por la empresa manufacturadora y por lo tanto están exentos de otros controles.
2. Comprobar que los medios de cultivo se encuentran dentro de la fecha de caducidad.
3. Participar en ejercicios de intercomparación (Programa de Control de Calidad de la SEIMC).

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los cultivos negativos se informan como "Cultivo negativo". Los cultivos positivos se informarán con la identificación a nivel de especie y el antibiograma de

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Procesamiento microbiológico de muestras de líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar o a través de sistemas de derivación</b>	<b>PNT-SNC-01</b>	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

cada uno de los aislados, tal y como se detalla en el apartado anterior.

### 9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante.

La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras.

El personal técnico del laboratorio de microbiología es responsable de los procedimientos microbiológicos de identificación y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como del registro de resultados.

El personal facultativo es responsable de la valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, transcripción correcta de los resultados al ordenador, comunicación telefónica de los resultados preliminares, validación y emisión de informes preliminares y definitivos, archivo de hojas de trabajo y de responder a las interconsultas.

### 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El procesamiento de las muestras de LCR siempre debe ser considerado como una urgencia clínica y microbiológica. Se deben realizar los procedimientos microbiológicos que proporcionen información clínica relevante en el menor tiempo posible.

No se recomienda rechazar o no procesar ninguna muestra (por ejemplo, derramamiento durante el transporte) sin consultar previamente con el clínico responsable del paciente. Se procesará, indicando en el informe sobre la posibilidad de contaminación debida al estado de la muestra a la llegada al laboratorio.

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede dar lugar a cultivos negativos.

Un volumen reducido de muestra puede dar lugar a cultivos negativos.

### 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th edition, vol. 1. 2004. Section 3: Aerobic Bacteriology. ASM Press. Washington DC.
2. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th edition, vol. 1. 2004. Section 2: Specimen collection, transport, and acceptability . ASM Press. Washington DC.
3. Jiménez-Mejías ME, García-Cabrera E. Infecciones relacionadas con los sistemas de drenaje de líquido cefalorraquídeo. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:240-251.
4. Thomson RB. Jr. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of clinical microbiology* 9<sup>th</sup> ed. 2007. ASM Press. Washington DC. Pp. 291-333.
5. Tunkell AR, Drake JM. Cerebrospinal fluid shunt infection. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) 2010. *Principles and practice of infectious diseases* 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone. Philadelphia. Pp. 1231-1236.
6. Yogev R, Bisno AL . Infections of central nervous system shunts. In Waldvogel FA, Bisno AL (eds) 3rd ed. 2000. ASM press. Washington DC. Pp. 231-246.

---

DOCUMENTO TÉCNICO

---

**PNT-SNC-02**  
**PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE ABSCESO CEREBRAL**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Procesamiento microbiológico de muestras de absceso cerebral</b>	<b>PNT-SNC-02</b>	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento de las muestras obtenidas de abscesos cerebrales para el diagnóstico microbiológico de estas infecciones, así como los criterios de interpretación de los cultivos.

## 2. FUNDAMENTO

El diagnóstico etiológico del absceso cerebral se basa, generalmente, en el aislamiento del microorganismo responsable a partir de muestras del material del absceso. La obtención de la muestra se realiza por punción aspiración dirigida o tras craneotomía, para escindir el absceso. La muestra debe obtenerse, siempre que sea posible, antes de iniciar tratamiento antibiótico y dada la frecuencia de bacterias anaerobias es imprescindible utilizar un medio de transporte adecuado (contenedor tipo portagerm o similar) y enviar la muestra al laboratorio inmediatamente. Un procesamiento rápido y una adecuada interpretación de los resultados de los cultivos son fundamentales para el éxito del tratamiento. En el presente procedimiento se describen los métodos a seguir para el procesamiento de este tipo de muestras

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th edition, vol. 1. 2004. Section 4.2: Anaerobic Bacteriology. Collection and transport of clinical specimens for anaerobic culture. ASM Press. Washington DC.

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe ser correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente los datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), fecha, servicio de procedencia y datos del clínico que realiza la petición. Datos de la muestra (tipo de muestra, localización anatómica de la muestra), determinaciones microbiológicas solicitadas. Datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo).

### 4.2. OBTENCION DE LA MUESTRA

Debe realizarse siempre que sea posible antes de iniciar tratamiento antibiótico. El material del absceso se obtiene por punción aspiración dirigida (punción esterotáxica) o mediante cirugía abierta. Se seguirán estrictas medidas de asepsia, para evitar la contaminación con microbiota de la piel.

La muestra obtenida se inoculará, previa desinfección del tapón de goma, en un tubo para transporte de anaerobios (Portagerm o similar) o en un contenedor estéril sin conservantes.

### 4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

Es necesario transportar la muestra al laboratorio de modo inmediato, ya que se trata de una situación clínica urgente, que requiere el informe rápido de la tinción de Gram y la siembra inmediata de la muestra.

### 4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Deben considerarse criterios de rechazo los siguientes:

- Defectos en la identificación de la muestra y/o volante de petición: etiquetado erróneo.
- Conservación inadecuada (temperatura o medio de transporte inadecuado).
- Muestras recogidas en torundas.
- Muestras derramadas.
- Muestras recogidas en contenedor no estéril.

Todas estas incidencias deben ser comunicadas al clínico correspondiente, indicando el procesamiento o no de la muestra e incidiendo en la interpretación de los resultados si se llevara a cabo el mismo.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 5.1 MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar colistina-nalidíxico (CNA)
- Agar Brucella o agar Schaedler o similar
- Agar sangre lisada con kanamicina y vancomicina o agar alcohol fenil etílico o similar
- Agar MacConkey o Eosina azul de metileno
- Agar Sabouraud (optativo)
- Caldo de enriquecimiento (tioglicolato o similar)

### 5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS:

- Sistemas de transporte para anaerobios
- Colorantes para tinción de Gram
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera específica (5-7% de CO<sub>2</sub> y anaerobiosis)

## 6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Asas de siembra estériles
- Portaobjetos

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Procesamiento microbiológico de muestras de absceso cerebral</b>	<b>PNT-SNC-02</b>	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

- Estufa de aerobiosis a 35°C
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis
- Jarras de incubación o cámara de CO<sub>2</sub>

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se procesarán tan pronto como se reciban en el laboratorio.

El procesamiento se llevará a cabo en cabina de bioseguridad tipo II.

Antes de realizar la siembra, el contenedor de transporte debe agitarse en un vortex para homogeneizar bien la muestra.

Si la muestra es muy escasa, añadir al contenedor de transporte 1 ml. de caldo tioglicolato y agitar en vortex para homogeneizar.

Si la muestra se envía en torunda, es preferible inocular la torunda en 0,5 ml de caldo tioglicolato y sembrar a partir de este medio. Cuando se realiza siembra directa con la torunda, la tinción de Gram pierde calidad por agotamiento de la muestra en los medios de cultivo sembrados previamente.

Se realizará la siembra por agotamiento con asa estéril en los medios de cultivo indicados (apartado 5).

Por último, se preparará la extensión sobre un portaobjetos para realizar la tinción de Gram.

En caso de petición de cultivo de microorganismos especiales (micobacterias, hongos) se inocularán medios específicos y se realizarán las tinciones adecuadas.

### 7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Agar sangre, Agar chocolate (5-7% CO<sub>2</sub>) 35°C, aerobiosis: 5 días.

Agar Brucella (anaerobiosis): 7 días.

Agar MacConkey (35°C, aerobiosis): 48 horas.

Caldo tioglicolato: (35°C, aerobiosis): 5 días.

En caso de sospecha de infección por hongos prolongar la incubación.

### 7.3. LECTURA DE CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

**7.3.1 Tinción de Gram.** Los resultados de la observación microscópica de las extensiones (ausencia o presencia de leucocitos polimorfonucleares y ausencia o presencia de uno o varios morfotipos bacterianos) se informarán al clínico peticionario y quedarán registrados en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra.

**7.3.2 Cultivo.** Examinar todas las placas y caldo cada 24 horas, y hasta un total de 5 días, para la detección de crecimiento macroscópico.

Si no hay crecimiento visible, reincubar.

Si los cultivos presentan crecimiento:

1. Correlacionar los aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram.
2. Notificar al facultativo peticionario un informe preliminar con la identificación presuntiva.

3. Identificar los aislados a nivel de especie y realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos según las normas vigentes estandarizadas (CLSI, EUCAST).

4. Si el crecimiento se produce sólo en los caldos de cultivo (turbidez) y no en las placas, realizar subcultivo y correlacionar el aislado con el morfotipo observado en la tinción de Gram.

5. Cuando en un caldo crecido se observen por tinción de Gram microorganismos que no crecen en el subcultivo, proceder a subcultivar en medios nutricionalmente más ricos y en diferentes condiciones de incubación.

### 7.4. CONTROL DE CALIDAD

1. Comprobar según el "Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media: Approved Standard. 3 Edition M22-A3 (antes CLSI)" que el control de los medios convencionales está asegurado por la empresa manufacturadora y por lo tanto están exentos de otros controles.

2. Comprobar que los medios de cultivo se encuentran dentro de la fecha de caducidad.

3. Participación en ejercicios de intercomparación (Programa de Control de Calidad de la SEIMC).

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los cultivos negativos se informan como "Cultivo negativo". Los cultivos positivos se informarán con la identificación a nivel de especie y el antibiograma de cada uno de los aislados, tal y como se detalla en el apartado anterior

## 9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante.

La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras.

El personal técnico del laboratorio de microbiología es responsable de los procedimientos microbiológicos de identificación y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como del registro de resultados.

El personal facultativo es responsable de la valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, transcripción correcta de los resultados al ordenador, comunicación telefónica de

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Procesamiento microbiológico de muestras de absceso cerebral</b>	<b>PNT-SNC-02</b>	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

los resultados preliminares, validación y emisión de informes preliminares y definitivos, archivo de hojas de trabajo y de responder a las interconsultas.

#### **10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO**

El procesamiento de las muestras obtenidas de abscesos cerebrales siempre debe ser considerado como una urgencia clínica y microbiológica. Se deben realizar los procedimientos microbiológicos que proporcionen información clínica relevante en el menor tiempo posible.

No se recomienda rechazar o no procesar ninguna muestra (por ejemplo, derramamiento durante el transporte) sin consultar previamente con el clínico responsable del paciente. Se procesará, indicando en el informe sobre la posibilidad de contaminación debida al estado de la muestra a la llegada al laboratorio.

#### **11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede dar lugar a cultivos negativos.

Las muestras recogidas con torundas tienen muy escaso volumen y pueden dar lugar a resultados falsos negativos.

Un volumen reducido de muestra obliga a establecer prioridades con el clínico peticionario.

#### **12. BIBLIOGRAFÍA**

1. Honda H, Warren DK. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess. *Infect Dis Clin North Am.* 2009; 23: 609-623.
2. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2th edition, vol. 1. 2004. Section 3: Aerobic Bacteriology. ASM Press. Washington DC.
3. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2th edition, vol. 1. 2004. Section 4.2: Anaerobic Bacteriology. Collection and transport of clinical specimens for anaerobic culture. ASM Press. Washington DC.
4. Thomson RB. Jr. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of clinical microbiology* 9<sup>th</sup> ed. 2007. ASM Press. Washington DC. Pp. 291-333.
5. Tunkell AR, Drake JM. Brain abscess. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) 2010. *Principles and practice of infectious diseases* 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone. Philadelphia. Pp. 1265-1278.



**PNT-SNC-03**  
**DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES VÍRICAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

**COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....**

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central</b>	<b>PNT-SNC-03</b>	
		Edición Nº 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento de las muestras obtenidas en pacientes con síndromes neurológicos, en los que se sospecha etiología vírica a la vista del aspecto y la analítica general del líquido cefalorraquídeo, para realizar el diagnóstico etiológico de estas infecciones, así como los criterios de interpretación de los resultados.

## 2. FUNDAMENTO

Los virus son los agentes etiológicos más frecuentemente implicados en meningitis aséptica, encefalitis y meningoencefalitis aunque hay algunas infecciones bacterianas que se asocian a una analítica general similar y que precisan de diagnóstico diferencial para un adecuado tratamiento del enfermo, ya que en unos casos el tratamiento ha de hacerse con antibacterianos o antifúngicos y en otros con antivíricos.

Cuando la sintomatología neurológica se asocia a la infección primaria por algún virus, el diagnóstico de esta por detección de IgM en el suero es la técnica de elección, complementada por la detección directa en el LCR y otras muestras adicionales. Sin embargo, en la situación más común, estos cuadros infecciosos están causados por virus para los que, o bien no hay ensayos de IgM para el diagnóstico de la infección aguda, como los enterovirus, o bien no producen el cuadro clínico durante o tras la infección primaria, sino durante el transcurso de reactivación de infecciones latentes, como en el caso de virus de la familia herpes. En esta situación, la más general, el diagnóstico se basa en el análisis del LCR y para obtener una sensibilidad máxima deben de combinarse tanto métodos de detección directa (aislamiento, detección de genomas), como detección de anticuerpos de producción intratecal, ya que en momentos tempranos de la infección hay presencia de virus en LCR en ausencia de anticuerpos, apareciendo estos posteriormente al tiempo que los viriones se llegan a hacer indetectables. La valoración de anticuerpos de producción intratecal siempre precisa de la realización de un ensayo que permita evaluar la integridad de la barrera hematoencefálica.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología nº 10, 1ª edición. SEIMC. 2000.

Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- RD 664/1997, de 12 de mayo sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. BOE sábado 24 de mayo de 1997.

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe ser correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente los datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), fecha, fecha de comienzo de síntomas, servicio de procedencia, juicio clínico del médico que realiza la petición, tipo de muestra y aspecto y analítica general del líquido cefalorraquídeo. Asimismo, deberán figurar los siguientes datos clínico-epidemiológicos: existencia de enfermedad de base actualmente o en los últimos 15 días, situación o no de inmunodepresión, presencia o no de exantemas, presencia o no de parotiditis, presencia actual o antecedentes de picaduras de insectos o mordeduras de animales (particularmente murciélagos) y viajes recientes.

### 4.2. OBTENCION DE LA MUESTRA

La muestra de elección es siempre el líquido cefalorraquídeo, que debe haberse obtenido en fase aguda y siempre que sea posible, antes de iniciar tratamiento antibiótico y antivírico. Si esto no es posible y el cuadro está muy evolucionado es imprescindible realizar estudio serológico. La punción lumbar se realizará en condiciones de asepsia y evitando la contaminación hemática que puede falsear el resultado. El volumen de LCR aspirado no debe ser inferior a 1 ml si se desea realizar toda la batería de pruebas y debe de disponerse en un contenedor tapa de rosca y cierre hermético, y nunca de vidrio, para evitar accidentes de laboratorio.

En todos los casos debe de recogerse un suero el mismo día de la punción lumbar. Cuando haya antecedentes de exantema u otro síntoma que permita sospechar que el cuadro observado es una complicación de la infección primaria por algún virus, se tomarán las muestras adicionales adecuadas para cada caso. Por ejemplo, en las sospechas de meningitis urliana se tomará saliva y orina, en las de encefalitis post-sarampión exudado faríngeo y orina y en las asociadas a varicela aspirado o hisopo vesicular. Los hisopos habrán de ir en medio de transporte de virus, de los cuales hay disponibilidad comercial, a fin de eliminar la carga bacteriana y fúngica, en ningún caso en medios que favorezcan su crecimiento.

Si hay sospecha de rabia o es una encefalitis con antecedente de mordedura de animal, especialmente murciélago, además de LCR y suero, se tomará saliva y biopsia de piel de nuca conteniendo folículo piloso.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central</b>	<b>PNT-SNC-03</b>	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

#### 4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Es necesario transportar la muestra al laboratorio de modo inmediato, ya que se trata de una situación clínica urgente. Si la muestra no es procesada inmediatamente, conservar en nevera. Si la muestra ha de enviarse fuera del hospital, deberá de hacerse refrigerada con acumuladores de frío y en contenedores adecuados para sustancias infecciosas.

#### 4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Deben considerarse criterios de rechazo los siguientes:

- Defectos en la identificación de la muestra y/o volante de petición (etiquetado erróneo, que no permite la identificación correcta del paciente).
- Conservación inadecuada (temperatura o medio de transporte inadecuado).
- Muestras derramadas.
- Volumen insuficiente. Puede dar lugar a rechazo total o parcial de determinadas pruebas.

La punción lumbar es un procedimiento invasivo que se practica de forma rutinaria pero que no está exento de riesgos, por lo que solo se deben rechazar muestras de LCR bajo circunstancias muy justificadas y siempre tras consulta con el médico responsable del paciente.

### 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

#### 5.1 CULTIVO CELULAR:

En general debe de utilizarse una combinación de líneas que cubra a todos los agentes esperados. Por ejemplo, MRC5 y RD cubren a los enterovirus más comunes y a los herpesvirus, aunque estos son muy difíciles de aislar. Si hay antecedente de parotiditis puede añadirse Vero y si lo hay de sarampión, Vero Slam o B95. Las líneas celulares pueden producirse en el laboratorio, aunque ya hay disponibilidad comercial de frascos de cultivo para preparación de tubos de cultivo e incluso de tubos listos para uso.

Tanto para la producción de tubos de cultivo, como para el mantenimiento de los inoculados, son necesarios medios de cultivo de tejidos enriquecidos con glutamina y suero bovino fetal y tratados con solución antibiótica (penicilina-estreptomina). Las muestras no estériles se deben tratar con solución de descontaminación a base de antibióticos y antifúngicos.

Para la identificación de los efectos citopáticos observados se habrán de emplear reactivos inmunológicos (anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales) específicos de cada uno de los virus de los que se sospecha marcados con fluoresceína.

#### 5.2 DETECCIÓN DE GENOMAS (PCR):

Actualmente existen equipos comerciales para detección de genomas de los agentes más comunes como HSV, VZV, enterovirus o CMV, la mayoría

basados en tecnología de PCR a tiempo real. Asimismo, están también disponibles comercialmente métodos de detección múltiple para virus de la familia herpes (VHS, VZV, CMV, HHV6, EBV) basados en PCR anidada más electroforesis o en una sola amplificación más hibridación en microplaca.

La mayoría de estos métodos comerciales no incluyen sistemas de extracción de ácidos nucleicos, pero para ello existen diversas plataformas automáticas. Existe ya una técnica de detección de ARN de enterovirus que incluye todo el proceso de extracción y amplificación en un formato totalmente automático.

Para otros agentes de menor demanda analítica o para los que no existe oferta comercial de equipos diagnósticos puede optarse por adaptar al laboratorio alguno de los publicados o enviar las muestras a un laboratorio de referencia. Si se opta por lo primero habrá que disponer de los reactivos y el material indicado en el trabajo de referencia y si se decide enviar a un laboratorio de referencia, se deberá hacer siguiendo las normas de seguridad indicadas para el transporte de sustancias infecciosas.

#### 5.3 SEROLOGÍA:

Existe disponibilidad comercial de equipos de diagnóstico de detección de IgM e IgG basados en enzimoimmunoensayo para todos los agentes indicados, así como de métodos de detección de albúmina por turbidimetría para evaluar el estado de la barrera hematoencefálica. La mayoría se presentan en plataformas automatizadas.

### 6. APARATOS Y MATERIALES

El trabajo debe de hacerse bajo condiciones de riesgo biológico 2.

- Cabina de seguridad biológica tipo II.
- Centrífuga.
- Estufa de 37°C.
- Baño termostatzado de laboratorio.
- Microscopio invertido.
- Microscopio de fluorescencia.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Frascos y tubos de cultivo de tejidos
- Portaobjetos para fluorescencia.
- Cabina de flujo laminar para PCR.
- Extractor automático de ácidos nucleicos (muy recomendable).
- Microcentrífuga.
- Termociclador convencional o de tiempo real.
- Equipamiento de electroforesis si no se emplea PCR a tiempo real.
- Tubos, placas o capilares especiales para PCR, según la plataforma empleada.
- Procesador de ELISA (lavador y espectrofotómetro).
- Placas de ELISA.
- Micropipetas y puntas con y sin filtro.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central</b>	<b>PNT-SNC-03</b>	
		Edición Nº 01	Página 4 de 6

## 7. PROCESAMIENTO

### 7.1. PROTOCOLO GENERAL

Se propone el siguiente esquema ideal de trabajo, teniendo en cuenta que el aislamiento en cultivo celular no sería necesario si se realiza PCR para los virus sospechados, ya que su sensibilidad es menor. Para diagnóstico de infecciones por VHS y VZV, se propone realizar detección directa y serología para obtener la mayor sensibilidad posible.

#### 7.1.1 Caso de meningitis, meningoencefalitis o encefalitis sin antecedentes clínico-epidemiológicos relevantes:

- LCR: RT-PCR enterovirus, PCR VHS, PCR VZV, cultivo de virus, albúmina

- Suero: albúmina

- Si el índice de albúmina es correcto y las amplificaciones genómicas son negativas, entonces IgG VHS, IgG VZV

En casos de meningitis linfocitaria y especialmente en contexto epidémico y/o niños, puede darse prioridad en el cribado a la RT-PCR de enterovirus en LCR.

#### 7.1.2 Caso de meningitis, meningoencefalitis o encefalitis con antecedente de parotiditis, varicela u otro tipo de exantema:

- Suero, IgM virus de la parotiditis, VZV o virus del sarampión, según proceda.

- Si la serología es negativa, analizar el LCR y otras muestras según proceda (exudado faríngeo, saliva, orina, exudado vesicular) por cultivo y PCR de virus de la parotiditis, VZV o virus del sarampión, según proceda.

- Si todo es negativo, procesar como en 7.1.1.

- Si todo es negativo, pueden investigarse otros virus productores de exantema que producen cuadros neurológicos de forma excepcional como HHV6, EBV, adenovirus, parvovirus B19 o virus de la rubéola.

#### 7.1.3 Caso de meningitis, meningoencefalitis o encefalitis con antecedente de inmunodepresión:

- Procesar como en 7.1.1 añadiendo PCR de citomegalovirus en LCR y PCR de EBV si hay indicación clínica específica.

#### 7.1.4 Caso de meningitis, meningoencefalitis o encefalitis con antecedente de viaje, picaduras de insectos, exposición a roedores o mordedura de animal:

Procesar como 7.1.1 y enviar a un laboratorio de referencia para determinación de patógenos especiales. Los patógenos a considerar dependerán del lugar de origen en caso de viajes. Serán virus Toscana y West Nile junto con rickettsias si hay antecedente de picaduras de insectos, virus de la coriomeningitis linfocitaria si hay exposición a roedores y rabia si hay animales susceptibles y especialmente murciélagos.

#### 7.1.5 Sospecha de leucoencefalopatía multifocal progresiva:

PCR de poliomavirus JC en LCR.

#### 7.1.6 Sospecha de panencefalitis esclerosante subaguda:

Determinación de producción intratecal de anticuerpos a virus del sarampión y PCR a virus del sarampión en LCR.

#### 7.1.7 Sospecha de rabia:

Enviar a laboratorio de referencia.

### 7.2. AISLAMIENTO EN CULTIVO

#### 7.2.1 Preparación de tubos de cultivo de tejidos.

A partir de frascos de cultivos mantenidos en el laboratorio o adquiridos comercialmente listos para uso.

**7.2.2 Preparación de la muestra.** Los LCR pueden inocularse directamente en los tubos de cultivo de tejidos. Las orinas se deben neutralizar con NaOH comprobando la neutralidad del pH con papel indicador. Las orinas neutralizadas y los exudados, se deben tratar con solución de descontaminación con antibióticos y antifúngicos antes de su inoculación.

**7.2.3 Inoculación en tubo de cultivo.** Inocular 200 microlitros de muestra tratada por tubo, a las 24 horas, retirar el medio con el inóculo y cambiarlo por medio fresco.

**7.2.4 Mantenimiento y observación de tubos de cultivo.** Dos o tres veces a la semana, cambio de medio y observación al microscopio para búsqueda de efecto citopático, si no se observa efecto citopático en 21 días, desechar como negativo, si hay sospecha de virus del sarampión o virus de la parotiditis, realizar un subcultivo a otro tubo fresco y observar durante otros quince días.

**7.2.5 Observación de efecto citopático.** Si se observa efecto citopático, raspar la monocapa celular, centrifugar, lavar el sedimento con PBS y hacer un porta con las células sedimentadas que se someterá a detección de antígenos por inmunofluorescencia frente a anticuerpos específicos de los virus que se sospechen.

### 7.3 DETECCIÓN DE GENOMAS.

Para realizar con garantías de especificidad las técnicas de amplificación genómica, el laboratorio debe de contar con áreas de trabajo separadas para preparación de mezclas de reacción (pre-extracción), y extracción de ácidos nucleicos e inoculación de extracto de tubos de amplificación (pre-amplificación). Si no se emplea PCR a tiempo real y se va a realizar detección de los amplificados a tiempo final, será necesaria otra zona separada (post-amplificación), para realizar la electroforesis o hibridación en microplaca. El uso de PCR anidada requiere una cuarta zona previa a la de post-amplificación para inocular los tubos de segunda reacción a partir de los primeros amplificados. Cada una de las zonas debería de disponer de material de laboratorio específico y no intercambiable con las otras.

No obstante y a pesar de todas las precauciones, no hay que olvidar que ese está utilizando una

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central</b>	<b>PNT-SNC-03</b>	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

técnica de extremada sensibilidad y que es difícil excluir totalmente la posibilidad de falsos positivos por contaminación puntual, por lo que hay que considerar seriamente la posibilidad de confirmar los resultados positivos.

**7.3.1 Extracción de ácidos nucleicos.** Pueden utilizarse tanto métodos específicos para ADN y ARN que se emplearán de acuerdo a la naturaleza del virus que se va a estudiar, como otros que extraen ácidos nucleicos totales y sirven para todos, pero es fundamental estar seguros de que el método que se está empleando es el adecuado para el virus a estudiar.

Se recomienda utilizar métodos automatizados para evitar manipulaciones y por tanto contaminaciones. A la hora de seleccionar el método de extracción automática hay que considerar cuestiones de bioseguridad y asegurarse de que el procedimiento no contemple en ningún momento el manejo de recipientes abiertos con muestras sin inactivar fuera de la cabina de bioseguridad, ya que se están tratando muestras de pacientes con procesos infecciosos graves.

Se debería hacer pasar el plásmido de control interno de amplificación a través del proceso de extracción para monitorizarlo en cada tubo, muy especialmente si se utilizan métodos manuales con pasos de precipitación en los que hay riesgo de absorber accidentalmente los sedimentos al retirar los sobrenadantes.

Las cargas víricas en LCR suelen ser extremadamente bajas, por lo que la sensibilidad es un factor crítico. Por esta razón se debe de tratar de utilizar el mayor volumen de muestra posible, llevándola a la menor cantidad de extracto final que permita el método, de forma que se introduzca el máximo factor de concentración posible y acabar cargando en la reacción de amplificación el mayor equivalente de volumen de muestra que se pueda.

**7.3.2. Amplificación.** Si se utiliza un método comercial, lo cual es recomendable, se seguirán las instrucciones del fabricante. En general, los métodos en tiempo real son los más seguros, ya que no precisan de la manipulación de productos de amplificación, sin embargo, todavía no está suficientemente desarrollada la amplificación múltiple basada en esta tecnología para cribar varios agentes de forma simultánea con suficiente sensibilidad, lo cual solo es posible de hacer, al menos con métodos comerciales, basándose en técnicas clásicas de amplificación a punto final. En cualquier caso, no se debe olvidar, a la hora de escoger método, que la detección en LCR requiere de una sensibilidad exquisita que habrá de ser adecuadamente garantizada. Es imprescindible para asegurar la ausencia de resultados falsos negativos emplear métodos con control interno de amplificación.

#### 7.4 SEROLOGÍA

Para realizar la detección de anticuerpos de clase IgM y/o IgG en suero frente a virus neurotrofos, se

puede acudir a la variada oferta de métodos comerciales existentes.

Antes de hacer serología en LCR hay que estar seguros de la integridad de la barrera hematoencefálica ya que, de no ser así, los anticuerpos detectados podrían proceder de torrente sanguíneo, no pudiéndose asegurar que sean de producción intratecal y por tanto reflejen infección en SNC. Para ello se pueden usar varios índices, siendo el de albúmina el de uso más extendido. Se determinará la albúmina por métodos comerciales de turbidimetría en el LCR y en un suero tomado el mismo día, calculando a continuación la relación entre el valor en LCR y el valor en suero, que deberá ser <0,0075. Si esta condición se cumple, entonces se procederá a la determinación de IgG específica en LCR, que será indicativa de infección por el virus en cuestión.

#### 7.5. CONTROL DE CALIDAD

1. Comprobar que los ensayos comerciales empleados tienen marcado CE.
2. Participación en ejercicios de intercomparación (Programas QCMD, "Quality Control for Molecular Diagnosis", <http://www.qcmd.org>)

### 8. OBTENCION Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los cultivos se informarán como negativos o positivos indicando en este caso el virus aislado. Asimismo, se dará el resultado de contaminado o tóxico cuando no pueda mantenerse el sustrato celular durante el período de observación por contaminación bacteriana o fúngica o toxicidad, respectivamente. Se orientará al clínico en el sentido de que el valor predictivo del resultado negativo en LCR es bajo pero aceptable en enterovirus, poco aceptable para parotiditis y muy bajo o casi nulo para el resto de los agentes.

Los resultados de PCR se darán por agente ensayado como positivo o negativo. Si no hay señal de control interno se debería de repetir, ya que la mayoría de las veces se debe a errores de manipulación. Si el resultado persiste, se informará con una nota indicando que no es posible emitir el resultado debido a la presencia de inhibidores inespecíficos de amplificación en la muestra. La cuantificación de la carga vírica no es relevante en este tipo de patología, ya que cualquier valor en LCR es significativo y la presencia de genomas suele ser efímera, no dando lugar al estudio de la evolución temporal de los valores de carga. Sin embargo, si se emiten resultados de carga vírica, habrá que exigirle al fabricante, o establecer en el propio laboratorio por uno mismo si se trata de técnicas de desarrollo propio, los rangos normales de variación inherentes a la propia técnica a fin de poder calcular los intervalos de confianza de los resultados numéricos, sin los cuales no debería de emitirse resultado numérico alguno.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central</b>	<b>PNT-SNC-03</b>	
		Edición Nº 01	Página 6 de 6

Los resultados de la serología se emitirán según las instrucciones del fabricante como presencia de anticuerpos (positivo), ausencia de anticuerpos (negativo) o indeterminado (dudoso). Cuando no pueda hacerse determinación en LCR por no ser válido el valor del índice de albúmina, habrá que indicar esta circunstancia para justificar la ausencia de resultado.

### 9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante.

La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes o al laboratorio de referencia es responsabilidad del laboratorio de microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras.

El personal técnico del laboratorio de microbiología es responsable de la recepción y almacenamiento de las muestras, la realización de las técnicas, así como del registro de resultados a falta de validación por el facultativo.

El personal facultativo es responsable de la selección de los métodos comerciales a utilizar o de la puesta a punto de métodos de desarrollo propios, supervisión del trabajo del personal técnico, validación de ensayos y de resultados individuales registrados por los técnicos, la comunicación telefónica de resultados preliminares y la emisión de informes preliminares y definitivos, archivo de hojas de trabajo y de orientar a los facultativos receptores de los resultados en cuanto a su correcta interpretación. Asimismo, deberá ser el interlocutor con los responsables técnicos de las casas comerciales proveedoras de equipos de detección y otros reactivos para la resolución de problemas técnicos.

### 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El procesamiento de las muestras de LCR siempre debe ser considerado como una urgencia clínica y microbiológica. Se deben realizar los procedimientos microbiológicos que proporcionen información clínica relevante en el menor tiempo posible.

La punción lumbar es un procedimiento invasivo que se practica de forma rutinaria pero que no está exento de riesgos, por lo que solo se deben rechazar muestras de LCR bajo circunstancias muy justificadas y tras consulta con el médico responsable del paciente. En niños pequeños el volumen de muestra puede ser muy limitado y en ocasiones muy inferior al establecido como mínimo, por lo que deben de establecerse prioridades y en ocasiones, incluso, procesar volúmenes menores de lo establecido, lo cual puede afectar a la sensibilidad de las técnicas, circunstancia que habrá de reflejarse en el informe de resultados.

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Aún después de haberse realizado un cribado muy completo e intensivo, el porcentaje de casos que quedan sin diagnóstico etiológico en este tipo de síndromes es muy elevado, especialmente en las encefalitis y meningoencefalitis.

### 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Matas L, Alonso-Tarrés C, Echevarría JM. Diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En: Ausina V y Moreno S (eds). 2005. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid.
- 2.- Fernández P, Cabellos C. Infecciones del Sistema Nervioso Central. En: Ausina V. y Moreno S. (eds). 2005. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid.
- 3.- Griffin D. Encefalitis, mielitis y neuritis. En: Mandell GL, Bennet JE y Dolin R (eds). 2008. Enfermedades infecciosas. 2007. Principios y práctica. Elsevier España. Madrid.
- 4.- Tunkel AR, Scheld WM. Meningitis aguda. En: Mandell GL, Bennet JE y Dolin R (eds). Enfermedades infecciosas. 2007. Principios y práctica. Elsevier España. Madrid
- 5.- Johnston RT. Viral infections of the nervous system, 2nd ed. 1998. Lippincott-Raven. Philadelphia, PA.