

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



36.a Diagnóstico Microbiológico de la Meningoencefalitis

Editores

Maria Isabel Sánchez Romero
Jordi Vila Estapé

Coordinadora

Carmen Muñoz-Almagro

Autores

M^a Ángeles Marcos
Manuel Ponce
Marta Rua
Carmen Muñoz-Almagro



ISBN: 978-84-09-83869-1

EDITORES:

Maria Isabel Sánchez Romero. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Jordi Vila Estapé. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic de Barcelona, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona e Instituto de Salud Global de Barcelona. Barcelona.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Marcos MA, Ponce M, Rúa M, Muñoz-Almagro C. Diagnóstico microbiológico de la Meningoencefalitis. 2026. Carmen Muñoz-Almagro (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Sánchez-Romero MI, Vila Estapé, J (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2026.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org” .

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Maria Isabel Sánchez Romero
Jordi Vila Estapé

36a. Diagnóstico Microbiológico de la Meningoencefalitis

Coordinadora:

Carmen Muñoz-Almagro^{1,2,3}

Autores:

M^a Ángeles Marcos^{4,5,6}
Manuel Ponce^{6,7}
Marta Rúa^{8,9}
Carmen Muñoz-Almagro^{1,2,3}



¹ Departamento de I+D+I Microbiología, Hospital Sant Joan de Déu. Institut de Recerca Sant Joan de Déu; ² Departamento de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya; ³ CIBER de Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, ⁴ Departamento de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona, Institut de Salut Global, ISGlobal, ⁵ Departamento de Fundamentos Clínicos, Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona, ⁶ CIBER de Enfermedades Infecciosas, CIBERINFEC, ⁷ Departamento de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, ⁸ Departamento de Microbiología, Clínica Universitaria de Navarra, ⁹ Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain.

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
2.	MENINGITIS BACTERIANA.....	6
	2.1. Introducción.....	6
	2.2. Epidemiología.....	7
	2.3. Consideraciones clínicas.....	7
	2.4. Recogida de la muestra.....	8
	2.5. Transporte y conservación de la muestra.....	8
	2.6. Manejo de la muestra en su recepción.....	8
	2.7. Procesamiento de la muestra en el laboratorio de Microbiología.....	8
	2.8. Selección de medios y condiciones de incubación para el cultivo bacteriano.....	9
	2.9. Criterios para interpretación de resultados.....	10
	2.10. Procedimientos adicionales en situaciones especiales.....	10
	2.11. Información de resultados.....	11
	2.12. Nuevas Técnicas rápidas de diagnóstico.....	11
	2.13. Procedimientos no aceptables.....	12
3.	MENINGOENCEFALITIS VÍRICA.....	13
	3.1 Introducción.....	13
	3.2 Etiopatogenia, epidemiología.....	13
	3.3 Manifestaciones clínicas.....	14
	3.4 Diagnóstico.....	14
	3.5 Diagnóstico microbiológico.....	15
	3.5.1 Cultivo celular.....	15
	3.5.2 Técnicas serológicas.....	16
	3.5.3 Amplificación genómica.....	17
4.	MENINGITIS TUBERCULOSA.....	18
	4.1 Introducción.....	18
	4.2 Consideraciones clínicas.....	18
	4.3 Recogida de la muestra.....	19
	4.4 Procesamiento de la muestra.....	19
	4.5 Criterios para la interpretación de resultados.....	19
	4.5.1 Tinciones.....	19
	4.5.2 Cultivos.....	20
	4.5.3 Técnicas moleculares.....	20
	4.5.3.1 Técnicas de amplificación mediante PCR convencional.....	21
	4.5.3.2 Técnicas de amplificación mediante PCR en tiempo real.....	21
	4.5.3.3 Técnicas de PCR digital en gota.....	22
	4.5.3.4 Técnicas de amplificación e hibridación reversa en fase sólida.....	23
	4.5.3.5 Técnicas de amplificación isotérmica.....	23
	4.5.3.6 Técnicas de amplificación basadas en microchips.....	23
	4.5.3.7 Secuenciación del genoma completo (metagenómica) y dirigida.....	23
	4.5.4 Detección de antígeno de lipoarabinomano.....	23
5.	MENINGITIS FÚNGICA.....	24
	5.1 Introducción.....	24
	5.2 Consideraciones clínicas.....	25
	5.3 Procesamiento de la muestra en el laboratorio de Microbiología.....	25
	5.3.1 Procesamiento.....	25
	5.3.2 Selección de medios y condiciones de incubación.....	26
	5.4 Criterios para la interpretación de resultados.....	26
	5.4.1 Tinciones.....	26
	5.5. Cultivos.....	26
	5.6. Detección del Antígeno.....	27
	5.7. Técnicas moleculares.....	28

INDICE DE CONTENIDOS

6. INFECCIONES POR AMEBAS DE VIDA LIBRE.....	28
6.1 Introducción.....	28
6.2 Consideraciones clínicas.....	28
6.3 Recogida de muestra.....	28
6.4 Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de Microbiología.....	29
6.5 Procesamiento de la muestra.....	29
6.5.1 Examen microscópico e inoculación en medios de cultivo.....	29
6.5.2 Selección de medios y condiciones de incubación.....	29
6.6 Criterios para la interpretación de resultados y procedimientos adicionales.....	29
6.6.1 Examen microscópico.....	29
6.6.2 Cultivo de amebas.....	30
6.6.3 Diagnóstico genómico.....	30
7. INFECCIONES RELACIONADAS CON LAS DERIVACIONES DE LÍQUIDO	
CEFALORRAQUIDEO (LCR).....	30
7.1 Introducción.....	30
7.2 Epidemiología.....	31
7.3 Consideraciones clínicas.....	31
7.4 Recogida de muestra.....	31
7.5 Transporte y conservación de la muestra.....	32
7.6 Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de Microbiología.....	32
7.7 Procesamiento de la muestra.....	32
7.7.1 Procesamiento.....	32
7.7.2 Selección de medios y condiciones de incubación.....	33
7.8 Criterios para la interpretación de resultados y procedimientos adicionales.....	33
7.8.1 Tinción de Gram.....	33
7.8.2 Cultivos de LCR.....	33
7.8.3 Cultivos del catéter de derivación.....	34
7.8.4 Técnicas moleculares.....	34
7.8.5 Detección de antígeno.....	34
8. ABSCESO CEREBRAL.....	34
8.1 Introducción.....	34
8.2 Epidemiología.....	34
8.3 Consideraciones clínicas.....	35
8.4 Recogida de muestra.....	36
8.5 Transporte y conservación de la muestra.....	36
8.6 Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de Microbiología.....	36
8.7 Procesamiento de la muestra.....	36
8.7.1 Procesamiento.....	36
8.7.2 Selección de medios y condiciones de incubación.....	37
8.8 Criterios para la interpretación de resultados.....	37
8.8.1 Tinción de Gram.....	37
8.8.2 Cultivos.....	37
8.8.3 Técnicas serológicas.....	38
8.8.4 Técnicas moleculares.....	38
9. BIBLIOGRAFIA.....	39

INDICE DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-SNC-01: Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación.....	41
PNT-SNC-02: Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral.....	54
PNT-SNC-03: Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central.....	61

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del sistema nervioso central (SNC) representan un desafío clínico de gran relevancia debido a su elevada morbilidad, incluso en contextos con acceso a diagnóstico y tratamiento avanzado (1,2). Estas infecciones pueden afectar estructuras como las meninges, el parénquima cerebral, el espacio epidural o subdural, y los sistemas de derivación del líquido cefalorraquídeo (LCR), manifestándose clínicamente como meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, abscesos cerebrales o ventriculitis.

El diagnóstico microbiológico es esencial para establecer un tratamiento etiológico precoz y dirigido, lo que mejora significativamente el pronóstico del paciente. La identificación del agente causal permite no solo optimizar la terapia antimicrobiana, sino también implementar medidas de salud pública en casos de infecciones transmisibles como la meningitis meningocócica. En este sentido, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en formato Point of Care (PoC) han revolucionado el abordaje diagnóstico permitiendo confirmar el diagnóstico clínico en pocas horas.

Desde el punto de vista etiológico, las infecciones del SNC pueden clasificarse según el tipo de microorganismo implicado: bacterias, virus, hongos, micobacterias, protozoos y amebas de vida libre. Esta clasificación también se relaciona con el curso clínico (agudo, subagudo o crónico), el contexto epidemiológico (por ejemplo, inmunosupresión o viajes a zonas endémicas), y la vía de entrada del patógeno (hematógena, contigüidad, axonal retrógrada o directa).

En los siguientes apartados se abordará el diagnóstico microbiológico específico de las principales entidades clínicas: meningitis bacteriana, meningoencefalitis vírica, infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, infecciones fúngicas, amebianas, así como las asociadas a derivaciones de LCR y abscesos cerebrales.

2. MENINGITIS BACTERIANA

2.1. INTRODUCCIÓN

La meningitis bacteriana es una infección aguda del sistema nervioso central caracterizada por inflamación de las meninges, aumento de la presión intracraneal y pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Es una urgencia médica que requiere diagnóstico y tratamiento inmediato. La meningitis bacteriana continúa siendo un grave problema de salud pública que puede causar epidemias, presenta una elevada tasa de letalidad (1 de cada 6 personas que contraen este tipo de meningitis muere) y morbilidad (1 de cada 5 presentará complicaciones graves) (3). En el año 2017, se estimó una tasa de 5 millones de nuevos casos en todo el mundo, y 290.000 defunciones. En este mismo año, 2017, los representantes de gobiernos y organizaciones mundiales de salud, entre otros sectores, hicieron un llamamiento en favor de una visión mundial para acabar con la meningitis como amenaza de salud pública. La OMS respondió al llamamiento y, junto con expertos mundiales dedicados a la prevención y el control de la meningitis, elaboraron una hoja de ruta destinada a derrotar a la meningitis para 2030. Entre sus acciones, contemplaron la mejora de la prevención y del diagnóstico microbiológico (4).

En la parte de prevención, los principales objetivos consisten en lograr una mayor cobertura vacunal entre la población, desarrollar nuevas vacunas, mejorar las estrategias de prevención y asegurar una respuesta más eficaz a las epidemias de meningitis.

Los objetivos en lo concerniente al diagnóstico se centran en la rápida confirmación de la sospecha clínica. El cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real son las pruebas de referencia. En este procedimiento se considerará la importancia crucial de las fases preanalíticas y postanalíticas para la correcta interpretación de los resultados. También hemos de considerar que en ocasiones, estas

técnicas no van a estar al alcance de todos los pacientes y que todavía sigue siendo urgente el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico microbiológico rápidas, de alto rendimiento, que sean asequibles, arrojen resultados exactos inmediatamente y permitan diagnosticar la meningitis bacteriana en tiempo real y evaluar la sensibilidad a los antibióticos. En consecuencia, es preciso disponer de pruebas que permitan identificar el microorganismo causante, incluso después de la administración de antibióticos.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

Conocer la epidemiología de los principales agentes etiológicos de la meningitis bacteriana es esencial para orientar la selección de las técnicas microbiológicas más adecuadas. Los patógenos más frecuentes incluyen *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) tipo B, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) y *Escherichia coli* (*E. coli*), cuya prevalencia varía según el grupo etario y los factores de riesgo del paciente (1).

En el contexto de la meningitis neonatal, es especialmente relevante considerar *Streptococcus agalactiae* (grupo B), que, a pesar de las estrategias de prevención implementadas para reducir su transmisión vertical, continúa siendo, junto con *E. coli*, uno de los principales agentes causales en este grupo de edad.

2.3. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La meningitis bacteriana aguda puede comenzar de forma insidiosa, con síntomas progresivos que, en muchos casos, evolucionan rápidamente hacia un cuadro fulminante. El inicio suele estar marcado por malestar general, irritabilidad y fiebre, acompañados de vómitos y taquicardia. La cefalea intensa y la fotofobia son frecuentes, así como los cambios en el estado mental, que pueden incluir letargo, obnubilación, somnolencia o coma (presente hasta en el 12% de los casos).

La rigidez de nuca es uno de los signos clásicos, aunque puede estar ausente en fases iniciales o en pacientes inmunodeprimidos. Los signos de Kernig y Brudzinski pueden ser útiles, pero no siempre están presentes. En algunos casos se observa afectación de pares craneales, especialmente del V, VI y VII, y hasta un 40% de los niños con meningitis bacteriana aguda pueden presentar convulsiones.

El edema de papila puede aparecer como signo de hipertensión intracraneal, aunque su ausencia no excluye un aumento de la presión intracraneal (PIC), especialmente en fases tempranas. Otros signos neurológicos como la focalidad, el compromiso de pares craneales o la alteración del nivel de conciencia, pueden estar presentes dependiendo de la evolución del cuadro y del agente etiológico.

En lactantes y ancianos, la presentación clínica suele ser más sutil y atípica, manifestándose como fiebre aislada o síntomas inespecíficos como irritabilidad, rechazo del alimento, confusión o apatía. En pacientes inmunodeprimidos (neutropénicos, trasplantados, VIH), la sintomatología puede ser larvada, dificultando el diagnóstico precoz.

Aunque el cuadro clínico no permite identificar con certeza el agente causal, ciertos hallazgos pueden orientar el diagnóstico etiológico. La aparición de petequias, inicialmente en extremidades inferiores y con posible extensión a equimosis generalizadas, es altamente sugestiva de infección meningocócica, y suele acompañarse de sepsis y alteraciones de la coagulación.

El antecedente de otitis media o sinusitis en los días previos, así como la existencia de fístulas de base de cráneo con rinorrea u otorrea de LCR, orientan hacia una etiología neumocócica. La repetición de episodios de meningitis por *S. pneumoniae* o la detección de *H. influenzae* no capsulado deben hacer sospechar la presencia de una fístula congénita o adquirida (por traumatismo o cirugía otorrinolaringológica) en localizaciones como la fosa anterior, el tegmen tympani o la región mastoidea.

Finalmente, el aislamiento de bacilos Gram negativos o *Staphylococcus aureus* en el LCR suele estar relacionado con antecedentes de neurocirugía o traumatismo craneal, y debe considerarse en el contexto de

meningitis nosocomial o postraumática (5).

2.4. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La muestra principal es el LCR obtenido por punción lumbar. Se recomienda recoger al menos 3 mL en tubos estériles: uno para análisis citoquímico, otro para microbiología (cultivo y Gram), y otro para pruebas moleculares. También se deben obtener hemocultivos antes de iniciar tratamiento antibiótico.

2.5. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El LCR debe ser transportado inmediatamente al laboratorio sin refrigeración. La viabilidad de patógenos como *N. meningitidis* o *S.pneumoniae* disminuye rápidamente con el tiempo y cambios de temperatura. Si no se puede procesar de inmediato, se recomienda mantener la muestra a temperatura ambiente y evitar la exposición a luz directa.

2.6. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN

Al llegar al laboratorio, se debe verificar cuidadosamente la identificación del paciente, el volumen disponible y las condiciones de transporte y conservación de la muestra. El procesamiento del líquido cefalorraquídeo (LCR) debe considerarse una prioridad absoluta, especialmente si presenta aspecto turbio o purulento, lo que sugiere una infección bacteriana aguda.

El examen macroscópico inicial permite valorar el color, la turbidez y la presencia de coágulos o depósitos. En casos de meningitis bacteriana aguda, el LCR suele ser turbio o francamente purulento, y la presión de salida está habitualmente elevada.

Desde el punto de vista citoquímico, el recuento celular en la meningitis bacteriana, muestra leucocitos en número variable, pero generalmente cercano a las 1.000 células/mm³ (valor normal <5 células/mm³ en adultos), con predominio de polimorfonucleares (>90%). Una excepción relevante es la meningitis por *L. monocytogenes*, que puede cursar con LCR claro u opalescente, recuentos celulares inferiores a 1.000 células/mm³ y predominio de linfocitos. En general, recuentos bajos (<50 células/mm³) en el contexto de meningitis bacteriana confirmada se asocian a peor pronóstico.

Las proteínas en el LCR suelen estar elevadas, con valores entre 1 y 5 g/L (normal <0,45 g/L), mientras que la glucosa está disminuida en aproximadamente el 65% de los casos (normal ≥ 40 mg/dL o $\geq 40\%$ de la glucemia simultánea). Se considera hipoglucorraquia cuando el cociente glucosa LCR/suero es <0,4.

En sangre periférica, es frecuente encontrar leucocitosis con desviación izquierda, elevación de proteína C reactiva y procalcitonina. En la enfermedad meningocócica invasiva, pueden observarse alteraciones de la coagulación como plaquetopenia, hipoprotrombinemia o datos de coagulación intravascular diseminada.

En principio, no se recomienda el uso de técnicas de imagen para el diagnóstico inicial, salvo en situaciones específicas como síntomas meníngeos de larga evolución, sospecha de complicaciones (absceso cerebral secundario a otitis con colesteatoma o sinusitis), presencia de edema de papila, déficits motores o coma (5,6).

2.7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

La comunicación directa y fluida entre el laboratorio de Microbiología y el equipo clínico es fundamental para garantizar un diagnóstico rápido y preciso, especialmente en el contexto de una meningitis bacteriana aguda, donde el tiempo es un factor crítico.

El procesamiento del líquido cefalorraquídeo (LCR) incluye la realización de la tinción de Gram, el cultivo en medios enriquecidos y, cuando están disponibles, pruebas moleculares rápidas en formato PoC. La tinción de Gram es una técnica sencilla, rápida y de gran utilidad diagnóstica. Permite la visualización directa de microorganismos en el sedimento del LCR, proporcionando información inmediata sobre la morfología y el tipo de bacteria (Gram positiva o negativa). Su sensibilidad varía entre el 60–90%, dependiendo de la carga bacteriana y del tratamiento antibiótico previo y también varía dependiendo del microorganismo, mientras que su especificidad es elevada. La presencia de polimorfonucleares junto con bacterias en la tinción de Gram refuerza la sospecha de meningitis bacteriana (7).

El cultivo bacteriano sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico etiológico. Se realiza en medios enriquecidos como agar sangre y agar chocolate, y medio de tioglicolato. Aunque su sensibilidad puede verse reducida por la administración previa de antibióticos, permite el aislamiento del patógeno, la identificación a nivel de especie y la realización de antibiograma. La incubación debe mantenerse al menos 72 horas, y en casos especiales puede prolongarse.

Las técnicas moleculares rápidas en formato PoC han supuesto un avance significativo en el diagnóstico microbiológico. Estos sistemas automatizados requieren un procesamiento mínimo, detectan los principales agentes bacterianos causantes de meningitis (como *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *L. monocytogenes* y *E. coli*), y generan resultados en las primeras horas tras la recepción de la muestra. Su sensibilidad y especificidad son muy elevadas (>95%), lo que permite iniciar un tratamiento dirigido de forma precoz. Además, su facilidad de uso los hace especialmente útiles en laboratorios con recursos limitados o en situaciones de urgencia y se ven menos afectadas que el cultivo, si el paciente ha estado expuesto a antibióticos (8).

En ausencia de técnicas moleculares, puede realizarse la detección de antígenos mediante métodos como la aglutinación de látex o inmunocromatografía. Estas pruebas se completan en pocos minutos y su simplicidad las hace accesibles para cualquier laboratorio de Microbiología. Sin embargo, su sensibilidad es inferior a la de la PCR y el cultivo, especialmente en muestras con baja carga bacteriana. Además, pueden presentar reacciones cruzadas con antígenos de otros microorganismos o interferencias por componentes de la muestra, lo que puede dar lugar a falsos positivos o falsos negativos (9).

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. 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. Para el estudio molecular se procesará el LCR directamente.

2.8. SELECCIÓN DE MEDIOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN PARA EL CULTIVO BACTERIANO

Las placas de agar sangre y chocolate, se incubarán a 35–37 °C, tanto en atmósfera aeróbica como en atmósfera enriquecida con un 5 % de CO₂. Los tubos de tioglicolato se incubarán a la misma temperatura en atmósfera aeróbica. En aquellos casos en los que el líquido cefalorraquídeo presente recuentos celulares muy elevados, puede ser útil inocular un mililitro del mismo en una botella de hemocultivo pediátrico, que se introducirá en el sistema automatizado disponible en el laboratorio. Las placas y tubos se revisarán diariamente, manteniéndose la incubación durante un mínimo de 72 horas, manteniéndose hasta 5 días.

En casos de alta sospecha clínica de meningitis por *L. monocytogenes*, como en pacientes inmunodeprimidos, ancianos o embarazadas, se recomienda añadir medios selectivos para Listeria (10).

2.9. CRITERIOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

2.9.1. Tinción de Gram

La interpretación se basa en la presencia o ausencia de bacterias en la muestra de LCR, junto con la presencia de polimorfonucleares. La visualización de bacterias en el Gram, especialmente en pacientes con clínica compatible, tiene un alto valor diagnóstico. Sin embargo, un resultado negativo no excluye infección, especialmente si el paciente ha recibido tratamiento antimicrobiano previo.

2.9.2. Cultivo bacteriano

El cultivo permite la detección de crecimiento bacteriano, la identificación de la especie y la determinación del perfil de sensibilidad antimicrobiana. La interpretación debe considerar:

1. La viabilidad del microorganismo en la muestra.
2. El tiempo transcurrido desde la toma hasta el procesamiento.
3. La posible interferencia por tratamiento antibiótico previo.

Un cultivo negativo no descarta meningitis bacteriana, especialmente en casos tratados previamente o con patógenos fastidiosos.

2.9.3. Técnicas moleculares PoC

Estas técnicas permiten la detección rápida de ácidos nucleicos de patógenos directamente en el LCR. La interpretación adecuada requiere considerar criterios técnicos y clínicos (11):

Criterios técnicos:

- Control interno del proceso: Verifica que la extracción, amplificación y detección se hayan realizado correctamente. Si este control falla, el resultado se considera inválido y debe repetirse.
- Controles positivos y negativos: Permiten verificar el rendimiento del sistema. Los controles positivos contienen ADN sintético de patógenos específicos; los negativos, buffer sin ADN.
- Genes diana incluidos en el panel: Deben ser específicos del patógeno y ofrecer alta sensibilidad. Algunos paneles incluyen genes de resistencia, lo que aporta información adicional para el tratamiento empírico.
- Actualización del panel: Es esencial que el fabricante garantice la revisión periódica de los genes incluidos, dado que la evolución genética de los microorganismos puede afectar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

Criterios clínicos:

La interpretación debe integrarse con la clínica del paciente, los hallazgos citoquímicos del LCR y otros estudios microbiológicos. Un resultado positivo puede confirmar el diagnóstico, mientras que un resultado negativo no excluye la etiología bacteriana, especialmente si el patógeno no está incluido en el panel o la carga patógena es baja.

2.10. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES EN SITUACIONES ESPECIALES

En determinadas situaciones clínicas, especialmente cuando el agente etiológico es una bacteria poco frecuente o difícil de cultivar, como *Borrelia* spp., *Leptospira* spp. o *Treponema pallidum*, no se logra la confirmación microbiológica en el LCR mediante las técnicas convencionales. En estos casos, las técnicas basadas en la secuenciación masiva no dirigida (NGS, next-generation sequencing) han emergido como herramientas prometedoras para mejorar la detección etiológica. (12)

La metagenómica clínica permite analizar directamente el contenido genético total presente en una muestra de LCR, sin necesidad de cultivo previo, lo que facilita la identificación de patógenos raros, atípicos o previamente desconocidos. Además, puede detectar coinfecciones y aportar información sobre genes de resistencia antimicrobiana.

Sin embargo, a fecha de redacción de este procedimiento, estas técnicas presentan limitaciones importantes:

- Reproducibilidad variable entre laboratorios, especialmente en la interpretación bioinformática de los datos.
- Falta de estandarización en los protocolos de extracción, secuenciación y análisis.
- Riesgo de contaminación ambiental o cruzada, que puede generar falsos positivos.
- Coste elevado y tiempo de procesamiento, que limitan su aplicabilidad en entornos clínicos urgentes.

A pesar de estas limitaciones, la metagenómica representa una línea de investigación muy prometedora para el diagnóstico de meningitis en casos complejos, y su incorporación progresiva en la práctica clínica dependerá de avances en la estandarización, validación clínica y accesibilidad tecnológica.

2.11. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados microbiológicos deben comunicarse de forma urgente y directa al equipo clínico, especialmente cuando se detecta un patógeno de declaración obligatoria, como *N. meningitidis*, o microorganismos con potencial para causar brotes epidémicos. Esta comunicación debe incluir, siempre que esté disponible, información sobre el perfil de sensibilidad antimicrobiana, que es esencial para orientar el tratamiento dirigido.

Es fundamental que exista una coordinación estrecha con infectólogos y clínicos responsables, quienes deben valorar los resultados en el contexto clínico del paciente y adaptar el tratamiento antimicrobiano de forma dinámica. La interpretación conjunta entre el laboratorio y el equipo asistencial permite optimizar el manejo terapéutico, reducir el uso innecesario de antibióticos y mejorar los desenlaces clínicos.

Además, los resultados deben quedar documentados de forma estructurada en la historia clínica electrónica, incluyendo:

- Fecha y hora de la obtención de la muestra.
- Técnica microbiológica utilizada.
- Patógeno identificado (si procede).
- Perfil de sensibilidad antimicrobiana (si procede).
- Interpretación microbiológica.
- Recomendaciones terapéuticas (si se incluyen).

Esta documentación no solo garantiza la trazabilidad y la calidad asistencial, sino que en un futuro permitirá la integración de los datos microbiológicos en sistemas de apoyo a la decisión clínica basados en inteligencia artificial, como modelos de machine learning. Estos sistemas podrían generar predicciones personalizadas sobre evolución clínica, riesgo de complicaciones o necesidad de escalado terapéutico, contribuyendo a una medicina más precisa y proactiva.

2.12. NUEVAS TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

La necesidad de mejorar el diagnóstico de la meningitis bacteriana en contextos clínicos urgentes y en países de renta baja ha impulsado el desarrollo de tecnologías innovadoras que combinan rapidez, accesibilidad y bajo coste. Entre las más prometedoras se encuentran:

• Biosensores portátiles

Proyectos europeos como MeningoSpeed han desarrollado dispositivos de diagnóstico no invasivo que

detectan *N. meningitidis* en menos de 15 minutos a partir de muestras de orina. Estos kits tipo point-of-care están diseñados para ser utilizados en entornos sin infraestructura avanzada, con costes reducidos y alta sensibilidad.

- **Microchips y plataformas de papel**

Hay investigadores que están trabajando en microchips de diagnóstico molecular y biosensores basados en papel, que permiten realizar pruebas rápidas con reactivos integrados. Estas plataformas pueden detectar ADN bacteriano mediante técnicas como LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), que no requieren termocicladores y pueden funcionar con calor ambiental o baterías simples.

- **Técnicas de ultrasonido no invasivo**

El proyecto Neosonics, apoyado por la Fundación Gates, ha desarrollado herramientas basadas en ultrasonido cerebral para el cribado de meningitis infantil en países de renta baja. Estas técnicas permiten detectar inflamación meníngea sin necesidad de punción lumbar, con una precisión superior al 90%.

- **Secuenciación portátil y metagenómica simplificada**

Aunque la metagenómica tradicional requiere equipamiento costoso, se están desarrollando versiones portátiles y simplificadas (como MinION de Oxford Nanopore) que permiten realizar secuenciación directa del LCR en campo. Como se ha comentado anteriormente, estas tecnologías aún están en fase de validación, pero prometen revolucionar el diagnóstico etiológico en casos complejos.

2.13. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

2.13.1. Tinción de Gram

- Utilizar muestras de LCR con volumen insuficiente, contaminación visible o con tiempo prolongado desde la extracción sin conservación adecuada.
- Realizar la tinción en condiciones no estériles o con material contaminado.
- Interpretar la tinción sin correlación con la celularidad del LCR (especialmente sin valorar la presencia de polimorfonucleares).
- Omitir el control de calidad del colorante y del procedimiento técnico.
- No repetir la tinción en casos de alta sospecha clínica con resultado negativo inicial.

2.13.2. Cultivo bacteriano

- Utilizar muestras de LCR con volumen insuficiente o con contaminación visible
- Procesar muestras que han sido conservadas en frío o congeladas o que han sido transportadas sin condiciones adecuadas.
- Inocular medios de cultivo no apropiados para el tipo de muestra o patógeno sospechado.
- No realizar incubación prolongada en casos de sospecha de bacterias de crecimiento lento.

2.13.3. Técnicas moleculares PoC

- Utilizar muestras con volumen insuficiente o con contaminación visible.
- Omitir controles internos del procedimiento (control de extracción, amplificación y detección).
- No incluir controles positivos y negativos en la validación del sistema.
- Interpretar resultados sin considerar la especificidad de los genes diana incluidos en el panel.
- Utilizar paneles no actualizados o sin validación frente a variantes genéticas emergentes.
- No correlacionar los resultados moleculares con la clínica del paciente y otros hallazgos microbiológicos.

3. MENINGOENCEFALITIS VÍRICA

3. 1. INTRODUCCIÓN

Los virus constituyen la causa más frecuente de meningitis, encefalitis y meningoencefalitis tanto en niños como en adultos, superando en incidencia a bacterias, hongos y parásitos. En los últimos años, la incidencia de virus neurotrópicos emergentes y reemergentes ha aumentado por diversos factores: mayor sensibilidad de las técnicas moleculares de diagnóstico, expansión geográfica de virus y vectores, incremento del número de pacientes inmunocomprometidos (con mayor riesgo de infección del sistema nervioso central, SNC) y descenso en las tasas de inmunización frente a virus prevenibles mediante vacunación (13,14).

El diagnóstico etiológico es fundamental, pues permite orientar el tratamiento antiviral específico, evitar el uso innecesario de antibióticos, reducir estancias hospitalarias y pruebas adicionales, así como implementar medidas de control frente a brotes y epidemias.

3. 2. ETIOPATOGENIA, EPIDEMIOLOGÍA

En más del 50% de los casos de meningitis y encefalitis no se identifica el agente causal (15). La etiología está condicionada por la edad, el estado inmunológico y la procedencia geográfica del paciente. Los enterovirus (EV) representan la causa más frecuente de meningitis vírica en niños y adultos, especialmente los coxsackievirus A y B y los echovirus. Su transmisión es fecal-oral o a través de secreciones respiratorias, con un patrón estacional en climas templados (picos en verano y otoño) y circulación anual en regiones tropicales. Los casos más graves afectan a neonatos y niños pequeños. En nuestro país se han descrito brotes por coxsackievirus A7 humano, enterovirus D68 y 71 y se han asociado con síntomas neurológicos graves. Además, el virus herpes simple y el virus varicela también son etiologías comunes de meningitis.

El virus herpes simple tipo 1 (VHS-1) constituye la causa más frecuente de encefalitis vírica esporádica en adultos, con evolución aguda y alta mortalidad en ausencia de tratamiento con aciclovir. El VHS-2 es responsable de meningitis linfocitaria recurrente y de encefalitis en neonatos e inmunodeprimidos. Otros virus de la familia *Herpesviridae* pueden aparecer como reactivación del virus latente: el virus varicela-zóster (VZV), más habitual en ancianos e inmunocomprometidos; el citomegalovirus (CMV), el virus Epstein-Barr (VEB) y el virus herpes humano 6 (VHH-6), sobre todo después de un trasplante hematopoyético u órgano sólido (16).

Los parechovirus humanos (PeVH), son causa frecuente de encefalitis en neonatos y niños pequeños, son transmitidos por vía fecal-oral o respiratoria.

Numerosos arbovirus transmitidos por artrópodos (mosquitos, garrapatas) pueden aparecer como casos esporádicos o brotes de meningitis o meningoencefalitis. Entre ellos destacan el virus del Nilo Occidental (VNO), dengue, chikungunya, fiebre amarilla, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus Toscana, virus Zika, virus Nipah entre otros. El virus de la coriomeningitis linfocitaria, transmitido por roedores, es causa ocasional de meningitis en España. Además, se notifican anualmente casos importados de rabia canina en Ceuta y Melilla, que requieren la aplicación inmediata de inmunoprophilaxis post-exposición. El virus Lyssavirus europeo de murciélago tipo 1, es endémico en poblaciones de murciélagos en la península ibérica.

Por tanto, el antecedente de viajes y la procedencia geográfica son determinantes para orientar el diagnóstico (17,18).

La encefalitis también puede presentarse como complicación de infecciones víricas que habitualmente no comprometen el SNC, como algunos virus respiratorios (virus influenza, el SARS-CoV-2, virus respiratorio

sincitial, metapneumovirus) (13).

La reemergencia de sarampión y parotiditis como causas de encefalitis a nivel mundial refleja la disminución de coberturas vacunales por conflictos bélicos, migraciones, fundamentalismos religiosos, fallos en la cadena de vacunación o movimientos antivacunas (13).

Algunos virus son responsables de síndromes neurodegenerativos de evolución lenta:

La panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), se produce por una infección defectiva y persistente del virus del sarampión en el SNC, es una complicación infrecuente pero grave que aparece fundamentalmente en niños infectados en los dos primeros años de vida.

La leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), causada por reactivación del poliomavirus JC en pacientes inmunocomprometidos, caracterizada por desmielinización difusa del SNC.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se considera el responsable del complejo de demencia asociado al sida, particularmente en países con acceso limitado a la terapia antiretroviral.

Los mecanismos principales en la patogenia de la meningitis y encefalitis víricas incluyen:

- 1.- Diseminación hematogena, como en la primoinfección por enterovirus o en herpesvirus linfotrópicos (citomegalovirus, VHH-6 y VEB) tras reactivación.
- 2.- Reactivación de la infección latente en ganglios nerviosos regionales, con diseminación axonal (VHS-1, VHS-2, VVZ).
- 3.- Transporte neuronal, típico de la rabia; el virus infecta neuronas motoras en el sitio de la mordedura y progresa lentamente hacia el SNC.
- 4.- Mecanismo inmunopatogénico, como en la encefalitis postinfecciosas (p. ej. tras sarampión) donde el daño neuronal se debe a la respuesta inmune y no a la replicación viral directa.

3. 3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las meningitis y encefalitis víricas suelen presentar un inicio agudo, con síntomas de menos de 5 días, frecuentemente precedidos de síntomas catarrales, afectación gastrointestinal, exantemas o incluso alteración del comportamiento o del nivel de conciencia.

A diferencia de las de etiología bacteriana, las meningitis víricas suelen ser autolimitadas y cursan sin secuelas. Sin embargo, las encefalitis víricas constituyen una enfermedad grave, con cambios conductuales, síntomas neurológicos focales y convulsiones y que dependiendo de su etiología, pueden causar la muerte o dejar secuelas graves en los supervivientes.

Algunos datos destacados incluyen: el virus varicela zoster (VVZ) puede ir acompañado o no de erupción vesicular localizada en un dermatoma o de distribución diseminada; los EV en niños, en concreto EV 68, pueden dar lugar a parálisis flácida aguda, miocarditis, y sepsis con alto riesgo de mala evolución y el EV 71 produce la enfermedad mano-pie-boca y puede complicarse con encefalitis, fallo respiratorio y alta mortalidad (14); los PeVH, se asocian a convulsiones en 90% de los neonatos y sobre todo el PeVH-3 a cuadros severos, secuelas neurológicas y muerte. Menos frecuentemente, la PEES es un cuadro progresivo, lento que se caracteriza por un deterioro mental progresivo que comienza con alteraciones de conducta seguidas de afectación motora que en uno a tres años acaba dejando al paciente en estado vegetativo y produciéndole la muerte. La LMP caracterizada por déficit neurológico focal y deterioro cognitivo progresivo, que suele acabar con la vida del paciente en meses.

3. 4. DIAGNÓSTICO

Ante un paciente con sospecha de meningitis y/o encefalitis, el diagnóstico inicial es fundamentalmente clínico, basado en síntomas neurológicos y hallazgos acompañantes que pueden proporcionar información muy relevante sobre la identidad del agente implicado, tales como la presencia de exantemas vesiculares

(herpes labial, herpes zoster, síndrome de boca-mano-pie), exantemas morbiliformes (sarampión), inflamación de las glándulas parótidas o presencia de lesiones producidas por picaduras de insectos o mordeduras de animales. La anamnesis debe incluir antecedentes de vacunación (varicela, sarampión), viajes recientes a zonas endémicas de arbovirus o regiones con exposición a garrapatas (virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis japonesa), contacto con animales domésticos o salvajes (aves, roedores, o ganado), así como posibles exposiciones epidemiológicas, tales como la participación en eventos multitudinarios con circulación de enterovirus, o baños en aguas dulces potencialmente contaminadas (enterovirus, adenovirus).

El estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) es esencial. Una punción lumbar debe hacerse lo más precozmente posible; en aquellos casos que exista sospecha de una contraindicación clínica para realizarla, como una posible hipertensión intracraneal, debe realizarse previamente un TAC (tomografía computarizada). El análisis citoquímico puede proporcionar información adicional, un LCR aspecto claro, con pleocitosis moderada de menos 300 células/ml, con predominio de linfocitos, glucosa normal o ligeramente descendida y proteínas moderadamente elevadas o normales, nos puede sugerir una etiología vírica. Sin embargo, hay excepciones, p.e. los lactantes con meningitis por enterovirus pueden presentarse sin pleocitosis en el LCR y en pacientes con disfunción inmunológica, o en una etapa muy temprana de la enfermedad puede aparecer predominio neutrofílico o ninguna elevación en el recuento de células (19).

La confirmación diagnóstica requiere siempre técnicas microbiológicas.

3. 5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del SNC, requiere rapidez, ya que se trata de cuadros agudos de evolución rápida, que pueden estar asociados con alta morbilidad y mortalidad. En este sentido, sería fundamental que las técnicas diagnósticas de los patógenos más frecuentes estuviesen implementadas en todos los servicios de microbiología hospitalaria.

Actualmente, el aumento de disponibilidad de nuevas técnicas de serología y moleculares para los principales arbovirus ha incrementado sustancialmente la detección de las etiologías víricas, sin embargo, todavía quedan un gran número de casos sin diagnosticar (20, 21, 22).

3.5.1 Cultivo celular

El cultivo celular es la técnica de referencia para la detección de virus viable; además a partir del aislamiento se pueden realizar pruebas de virulencia y sensibilidad a los antivirales. Algunas de las líneas más comúnmente empleadas en este contexto serían células de fibroblastos (MRC5), células de riñón de mono verde africano (Vero), células de mono rhesus y células epiteliales alveolares humanas (A549).

Sin embargo, el cultivo celular presenta una serie de inconvenientes que limitan su utilización asistencial: 1. Las cargas víricas en el LCR suelen ser bastante bajas y por tanto el rendimiento está reducido; 2. Al ser varios los virus responsables del cuadro clínico, sería necesario la inoculación de la muestra en varias líneas celulares, algunas de ellas con diferentes requerimientos para su crecimiento y mantenimiento; 3. El manejo de las líneas, y la evaluación del potencial efecto citopático requiere formación del personal técnico y facultativo, así como una infraestructura especial dentro del laboratorio; 4. Es necesaria la confirmación del efecto citopático mediante técnicas moleculares, anticuerpos monoclonales e inmunofluorescencia indirecta o incluso mediante un test de neutralización (para determinar el serotipo de EV); 5. Todo esto hace que el tiempo de respuesta se alargue varios días o semanas.

El cultivo shell vial es una variante del cultivo celular convencional que incorpora la centrifugación una vez inoculada la muestra, lo cual facilita que las partículas virales entren en contacto con las células, de esta forma aumenta la sensibilidad y disminuye el tiempo de respuesta.

Actualmente, el cultivo se realiza únicamente en centros de referencia y ha sido reemplazado por técnicas moleculares, las cuales se han establecido como el método de referencia.

3.5.2 Técnicas serológicas

El estudio serológico en sangre periférica y LCR constituye una herramienta de gran valor en el diagnóstico de determinadas meningitis y encefalitis víricas. Su utilidad radica en la detección de IgM específica en suero, en la demostración de seroconversión de IgG entre la fase aguda y la fase convaleciente, o en la identificación de anticuerpos intratecales específicos.

Estas pruebas aplicadas al LCR requieren una evaluación previa de la integridad de la barrera hematoencefálica, lo cual implica el análisis paralelo de LCR y suero obtenidos de manera simultánea. 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 el índice combinado de anticuerpos-albúmina.

La serología adquiere especial relevancia en distintos escenarios clínicos y epidemiológicos:

1. Retraso en la toma de muestras: cuando el virus ya no se encuentra viable ni detectable por técnicas moleculares en el LCR, la serología puede constituir la única alternativa diagnóstica.
2. Infecciones por arbovirus neurotrópicos (Zika, dengue, chikungunya, fiebre amarilla, virus VNO): en la fase febril la PCR puede resultar informativa; sin embargo, en el inicio de los síntomas neurológicos el virus suele no estar presente en sangre ni LCR, siendo la detección de IgM en suero y/o LCR el principal método diagnóstico (17).
3. Síndromes postinfecciosos de base inmunitaria, como la encefalitis post-sarampión, donde la detección de IgM en suero constituye la técnica de elección, en concordancia con el mecanismo patogénico subyacente.
4. Estudios de brotes y vigilancia epidemiológica, donde la serología es esencial para confirmar la extensión y dinámica de la infección.
5. Detección de IgG intratecal frente al virus del sarampión, considerada técnica de elección para el diagnóstico ante-mortem de la panencefalitis esclerosante subaguda.
6. En los casos en que la clínica y la anamnesis sugieren una complicación neurológica secundaria a una infección vírica, el diagnóstico se basa principalmente en la identificación de IgM sérica frente al agente causal. Esto se observa, por ejemplo, en la meningitis por virus Toscana, la coriomeningitis linfocitaria o las encefalitis asociadas a exantema súbito o mononucleosis infecciosa.
7. En el caso de la rabia, la detección de IgG en suero en ausencia de antecedente vacunal es considerada diagnóstica (22).

Sin embargo, a su vez la serología tiene algunas limitaciones que deben considerarse:

- *Reactividad cruzada*: puede generar resultados falsos positivos entre virus relacionados, como ocurre entre flavivirus. En tales casos, los ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT) ofrecen mayor especificidad, aunque su disponibilidad se limita a centros de referencia.
- *Persistencia de IgM*: aunque se considera marcador de infección aguda, puede mantenerse detectable durante 30–90 días, como se ha descrito en infecciones por VNO.
- *Resultados falsos negativos en fases tempranas*: durante el periodo ventana (3–5 días tras la infección inicial), antes de que los anticuerpos puedan detectarse.
- *Pacientes inmunocomprometidos*: la respuesta humoral puede ser insuficiente debido a la disfunción de linfocitos B, lo que conlleva a falsos negativos

3.5.3 Amplificación genómica

Actualmente las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) aplicadas al LCR representan la herramienta diagnóstica de elección en las infecciones del sistema nervioso central, debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez en la obtención de resultados (23,24). Existen equipos comerciales con marcado CE para los patógenos más relevantes, la mayoría basados en técnicas de PCR a tiempo real, total o parcialmente automatizados, dirigidos a una o múltiples dianas.

En ausencia de antecedentes clínicos o epidemiológicos relevantes que orienten claramente hacia un determinado agente, debería de hacerse cribado para EV, VHS y VZV. Es importante considerar que en el caso de infección por EV-D68, la PCR en LCR puede ser negativa en niños con parálisis flácida aguda, siendo las secreciones respiratorias la muestra de elección para confirmar el diagnóstico (13). De forma similar, el EV71, suele ser difícil de detectar en LCR mientras que puede identificarse con mayor facilidad mediante PCR en heces y frotis faríngeos. En niños menores de dos años, el diagnóstico de enterovirus debe incluir, además del LCR, el análisis molecular en sangre. Para las infecciones por VHS o VZV, puede ser útil la PCR en muestras mucocutáneas.

En pacientes inmunodeprimidos se debería incluir en el cribado al citomegalovirus (CMV), al virus de Epstein-Barr y virus herpes 6. En este último caso, la integración cromosómica del virus puede originar resultados positivos en LCR no asociados a infección activa, por lo que se requiere un abordaje diagnóstico complementario (detección de VHH6 en folículo piloso).

La elección de los virus a estudiar debe guiarse por la clínica y los antecedentes. Cuando existe una infección del tracto respiratorio, se deberían recoger frotis o aspirados nasofaríngeos para el estudio de virus respiratorios como el virus influenza o el SARS-CoV-2. En casos con sospecha de arbovirus, se dispone de paneles de PCR individuales o múltiples que permiten detectar zika, chikungunya y dengue en distintos tipos de muestras (LCR, suero, orina, líquido amniótico); aunque la orina no se recoge habitualmente, esta muestra suele tener periodos más largos de detección por PCR. En situaciones específicas, como antecedente de mordedura de murciélago u otros animales debe realizarse PCR para virus de la rabia en LCR, saliva, suero y biopsia de piel de la nuca con folículos pilosos. Asimismo, ante viajes internacionales recientes, se deben incluir los agentes circulantes en la zona de procedencia.

Desde 2015, se han ido incorporando al diagnóstico de las meningitis y encefalitis, paneles sindrómicos de PCR múltiple que detectan de manera rápida y simultánea en LCR, los virus más comunes (VHS1, VHS2, VVZ, EV, PeVH, VH6, CMV), además de bacterias y hongos. Estos paneles son muy útiles sobre todo en urgencias hospitalarias y en unidades de cuidados intensivos, donde el tiempo de respuesta impacta directamente en la morbimortalidad del paciente.

En los cuadros subagudos como 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 PCR en LCR, aunque sí en material de autopsia.

La interpretación de un resultado positivo en el LCR es sencilla, ya que cualquier hallazgo debe considerarse significativo, aunque siempre teniendo en cuenta el contexto clínico y antecedentes del paciente. 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, ante la sospecha clínica, los valores negativos no nos descartan y deberían completarse con otras técnicas.

Siempre que no hubiera disponibilidad de las técnicas moleculares en el centro asistencial correspondiente se procederá al envío de la muestra al laboratorio de referencia autonómico o directamente al nacional (Centro Nacional de Microbiología).

3.5.4. Métodos moleculares basados en la secuenciación

La secuenciación Sanger ha sido ampliamente utilizada en el genotipado viral (por ejemplo, en enterovirus o sarampión) y en la detección de mutaciones asociadas a resistencia antiviral. No obstante, presenta limitaciones significativas: solo permite secuenciar un fragmento por ensayo, tiene menor sensibilidad en muestras con baja carga viral y no es adecuada para detectar poblaciones minoritarias (<20%). Estas limitaciones han sido en gran medida solventadas mediante los métodos de NGS, capaces de analizar simultáneamente múltiples fragmentos con mayor profundidad.

Más recientemente, se han introducido los ensayos metagenómicos basados en secuenciación. A diferencia de los métodos dirigidos, este enfoque no requiere la sospecha de un patógeno concreto, ya que analiza todo el material genético presente en la muestra (p. ej., LCR). Esto permite identificar bacterias, virus, hongos y parásitos, incluyendo aquellos poco frecuentes, inesperados o de difícil detección por otros métodos. Además, puede detectar coinfecciones y aportar información genética de relevancia clínica, como estudios de resistencia o epidemiología molecular (25).

La secuenciación metagenómica representa, por tanto, una herramienta poderosa y complementaria en el diagnóstico de infecciones del SNC, particularmente en casos complejos o sin diagnóstico tras métodos convencionales. Sin embargo, aún enfrenta desafíos significativos relacionados con la sensibilidad, especificidad, coste, tiempo de respuesta y falta de estandarización (26). Su incorporación a la práctica clínica requiere estudios multicéntricos, validación externa y desarrollo de guías clínicas. En la actualidad, no sustituye a las técnicas clásicas.

4. MENINGOENCEFALITIS TUBERCULOSA

4. 1. INTRODUCCIÓN

La meningitis tuberculosa constituye la forma más grave de tuberculosis, atribuible en parte a la dificultad para su diagnóstico y tratamiento. Se estima que representa entre el 2% y el 5% de la enfermedad tuberculosa y es la principal causa de infección cerebral bacteriana en entornos con una alta incidencia de tuberculosis (27). Afecta de manera desproporcionada a dos grupos de población: niños menores de 5 años, y a las personas infectadas por el VIH.

La meningitis tuberculosa presenta elevadas tasas de morbimortalidad. Siendo más frecuente la morbilidad en supervivientes pediátricos (discapacidad neurológica en el 54% de los supervivientes pediátricos y en el 32 % de los adultos). Las tasas de mortalidad son similares (23% en adultos frente a 19% en niños). No obstante, la mortalidad en adultos está significativamente influenciada por la coinfección por VIH (57% en coinfectados frente a 16% en pacientes no infectados) (28). Por ello, el pronóstico de la meningitis tuberculosa está relacionado con la gravedad al diagnóstico y la presencia de comorbilidades (29). La terapia antituberculosa con múltiples fármacos es el pilar del tratamiento; sin embargo, la escasa penetración en el LCR es una limitación importante añadido a la posibilidad de resistencias antibióticas.

4. 2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

M. tuberculosis puede localizarse en las meninges por vía hematógena durante la primoinfección o la reactivación, o bien por la ruptura de un foco parameningeo existente al espacio subaracnoideo. La patología intracerebral y espinal está mediada por una respuesta inflamatoria desregulada que contribuye a la meningitis, la formación de tuberculomas, la arteritis, la obstrucción del flujo del LCR y complicaciones vasculares, incluyendo el accidente cerebrovascular (29).

La meningitis tuberculosa suele manifestarse de manera insidiosa y con signos y síntomas poco específicos. Las manifestaciones clínicas se caracterizan por la persistencia durante 5 o más días de fiebre, cefalea, signos meníngeos, focalidad neurológica, disminución del nivel de conciencia (frecuente en estadios avanzados de la enfermedad), convulsiones, desnutrición, pérdida de peso y síntomas de tuberculosis pulmonar.

Entre los hallazgos radiológicos más frecuentes se encuentra: hidrocefalia que se asocia a hipertensión intracraneal y convulsiones, realce meníngeo basal, infartos cerebrales y tuberculomas.

Los hallazgos del LCR son la pleocitosis (10-500 células/ μ l) con predominio linfocitario (>50%), proteínas elevadas y glucosa disminuida. Hallazgos atípicos pueden darse, especialmente en población coinfectada por VIH (28).

4. 3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La muestra principal es el LCR obtenido por punción lumbar recogido en recipiente estéril. Para optimizar el rendimiento de las pruebas es esencial obtener un volumen elevado de LCR (6 ml) o disponer de varias muestras obtenidas en momentos distintos, así como emplear alguna técnica de concentración para los cultivos. La búsqueda de *M. tuberculosis* fuera del SNC (en muestras respiratorias, como el lavado broncoalveolar o el esputo) en personas que presentan síntomas neurológicos relevantes, también puede ayudar al diagnóstico de la meningitis tuberculosa.

4. 4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El trabajo con muestras biológicas y agentes de riesgo biológico requiere la manipulación y procesamiento de las muestras dentro de dispositivos de seguridad biológica de tipo II (NE-B, GR-1). Los datos técnicos ampliados pueden consultarse en detalle en los Procedimientos de la SEIMC números 9 (1ª edición) y 9a (2ª edición): “Micobacterias”.

Idealmente, se deben realizar las técnicas de tinción y cultivo, ya que continúan siendo el método de referencia para establecer el diagnóstico etiológico. En la actualidad, la OMS recomienda el empleo de pruebas moleculares rápidas en el diagnóstico inicial (30). Se recomienda guardar alícuotas por si es necesario realizar otras técnicas moleculares o el antígeno de lipoarabinomano.

4. 5. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.5.1. Tinciones.

La tinción con carbolfucsina (Ziehl-Neelsen o Kinyoun) o con fluorocromos (auramina-rodamina) permite detectar la presencia de micobacterias de forma rápida, sencilla y económica. El empleo de la citocentrífuga aumenta la sensibilidad de la tinción y facilita la visualización al observador al concentrar la muestra en un área pequeña, particularmente en LCR con baja concentración de *M. tuberculosis*. La tinción con fluorocromos es preferible en aquellos laboratorios que realizan un gran número de pruebas. No obstante, es necesario confirmar un resultado de fluorescencia dudosa de la tinción con auramina mediante la tinción de Ziehl-Neelsen.

La sensibilidad de las tinciones directas sobre muestra es baja (15-30%) y su capacidad de detección es de aproximadamente 10^4 bacilos/ml (27,30). La experiencia y el tiempo dedicado por el observador son aspectos relevantes que deben ser considerados para mejorar la precisión diagnóstica de las tinciones.

Una desventaja es la imposibilidad de diferenciar *M. tuberculosis* de las micobacterias no tuberculosas y la incapacidad de detectar resistencias antibióticas. En consecuencia, la OMS recomienda la implementación de técnicas moleculares rápidas como métodos de diagnóstico inicial en países con alta prevalencia de infección tuberculosa, en lugar de la observación microscópica.

4.5.2. Cultivos.

El cultivo es el método de referencia para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa. Permite detectar cantidades de microorganismos del orden de 10^2 bacilos/ml, así como identificar la especie y realizar pruebas de sensibilidad fenotípicas, incluyendo nuevos antimicrobianos. Tanto el examen microscópico del LCR como el cultivo siguen siendo necesarios para el seguimiento del tratamiento. Las principales limitaciones del cultivo son el tiempo prolongado para obtener resultados, lo que complica la toma de decisiones eficaces en casos de meningitis tuberculosa; y que se necesitan instalaciones y personal especializado para el procesamiento, lo que implica un coste significativo.

La sensibilidad del cultivo para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa es altamente variable, situándose entre el 25-70% dependiendo del inóculo y de la cantidad de muestra empleada (27). El uso de medios líquidos (caldo MGIT™) permite acortar el tiempo necesario para obtener un cultivo positivo respecto a medios sólidos (Löwenstein-Jensen). Sin embargo, en el caso de las muestras negativas, se requieren 6-8 semanas para informar un resultado negativo y, en la mayoría de las muestras positivas se necesitan entre 1-3 semanas para obtener resultados.

4.5.3. Técnicas moleculares.

Las pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos son generalmente rápidas (1-3 horas) y permiten identificar genes de resistencias a diferentes antibióticos. Es importante destacar que la carga bacilar de las muestras extrapulmonares suele ser baja; por lo que se debe recoger un volumen suficiente (≥ 1 ml) para su análisis y, en la medida de lo posible, concentrarlas para alcanzar un nivel detectable de ADN bacteriano.

La mayoría de las técnicas moleculares están validadas únicamente en muestras de origen respiratorio, algunas en muestras extrapulmonares, y ninguna en LCR por su baja sensibilidad en esta última muestra (31). Independientemente, la OMS recomienda la implementación de técnicas genómicas rápidas para la detección de la meningitis tuberculosa. Un resultado positivo en una muestra extrapulmonar se considerará un verdadero positivo y debe utilizarse para tomar decisiones clínicas (30). Los beneficios del aumento de la sensibilidad para la detección (verdaderos positivos) superan el posible perjuicio de un falso positivo. Aunque estas pruebas son útiles tras un resultado positivo, los valores predictivos negativos son insuficientes para descartar la meningitis tuberculosa. Por ello, en ningún caso deben sustituir a los métodos convencionales de tinción y cultivo. Los resultados de las técnicas moleculares han de interpretarse de forma complementaria a los cultivos y teniendo en cuenta la situación clínica del paciente.

La mayoría de las técnicas genómicas que se emplean para la detección de *M. tuberculosis* directamente en muestra clínica se basan en la amplificación mediante PCR, hibridación inversa en fase sólida, técnicas LAMP, ensayos moleculares semiautomáticos basados en chips (Truenat) mediante plataformas comerciales o metagenómica. En la tabla se presentan las principales características de los sistemas que se han comercializado y se emplean en el diagnóstico de la meningitis tuberculosa. Una limitación es que no se recomienda el uso de las técnicas genómicas para el seguimiento del paciente en tratamiento, ya que podría detectarse ADN de bacterias no viables.

4.5.3.1 Técnicas de amplificación mediante PCR convencional

Existen numerosas técnicas de PCR convencionales nested dirigidas a la secuencia de inserción IS6110, a los genes *gyrB*, *hsp65*, o bien, a regiones de los genes del ARNr 16S o 23S, entre otras, para el diagnóstico a partir de colonias aisladas en cultivo. Estas técnicas caseras no se recomiendan respecto a las pruebas comercializadas que están estandarizadas, validadas y cuentan con la aprobación de organismos internacionales.

4.5.3.2 Técnicas de amplificación mediante PCR en tiempo real

Una de las plataformas más utilizadas es el GeneXpert® (Cepheid), debido a su fácil integración en el laboratorio, ya que se trata de una prueba completamente automatizada que utiliza reactivos liofilizados y cuenta con un mayor número de estudios que respaldan su uso en LCR. El tiempo de procesamiento de la muestra y la lectura de los resultados para identificar *M. tuberculosis* y resistencias se realiza en menos de 2 horas con buena sensibilidad en muestras paucibacilares (bajo número de bacilos). La OMS recomienda Xpert MTB/RIF Ultra como prueba inicial para la tuberculosis extrapulmonar en adultos y niños debido a su límite de detección (11,8 UFC/ml) inferior a la técnica Xpert MTB/RIF (131 UFC/ml) (30). La capacidad de GeneXpert para detectar simultáneamente *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina permite identificar a los pacientes con meningitis tuberculosa que probablemente sean multirresistentes. En caso de resistencia a rifampicina, conviene valorar la realización de una detección ampliada de resistencias con el GeneXpert MTB/XDR, que permite detectar resistencias a la isoniazida, la etionamida, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos, y comenzar así el tratamiento con fármacos antituberculosos de segunda línea. No obstante, esta última técnica aún no se ha evaluado adecuadamente en pacientes con meningitis tuberculosa.

Existen múltiples plataformas de PCR comercializadas que no se han validado en LCR, pero que se han implementado en los laboratorios, como FluoroType® MTBDR, Cobas® MTB, cobas® MTB-RIF/INH, BD-Max MDR-TB, MTB EXTRA ELITE InGenius, Realtime MTB (Abbott®), Anyplex MTB/NTM (Seegene), entre otros. FluoroType y BDMax MDR-TB pueden detectar la resistencia a rifampicina e isoniazida; FluoroType con un límite de detección de 14 UFC/ml y BDMax MDR-TB de 0,5 UFC/ml. Respecto a Anyplex MTB/NTM, que tiene un límite de detección más alto, de entre 130 y 500 UFC/ml, un estudio reciente muestra una sensibilidad del 32,4% sobre el total de casos de meningitis tuberculosa.

Las mediciones semicuantitativas de la carga bacteriana, mediante el uso de los valores Ct (*cycle threshold values*) o Cp (*crossing point*), tienen capacidad predictiva en relación con el pronóstico del paciente. Una carga bacteriana elevada en el líquido cefalorraquídeo, medida con Xpert MTB/RIF, se asoció con la gravedad de la enfermedad y la aparición de nuevos eventos neurológicos en pacientes VIH negativos (32). En pacientes con VIH, los Ct/Cp bajos para Xpert MTB/RIF Ultra se asociaron con mayor mortalidad. Estos hallazgos plantean la posibilidad de utilizar los Ct/Cp de Xpert MTB/RIF para identificar a los pacientes con mayor riesgo de fallecimiento y que se beneficiarían de cuidados adicionales.

Tabla. Principales técnicas moleculares comerciales para el diagnóstico de meningitis tuberculosa y detección de resistencias

		Resistencia detectada	Tiempo respuesta	Sensibilidad en meningitis tuberculosa
RT-PCR	Xpert MTB/RIF	- Rifampicina (<i>rpoB</i>)	2 h	MTB: 20-60% R-RF: 92-97%
	Xpert MTB/RIF Ultra	- Rifampicina (<i>rpoB</i>)	2 h	MTB: 44-77% R-RF: 92-97%
	Xpert MTB/XDR	- Isoniacida (<i>katG, fabG1, oxyR-ahpC, inhA</i>) - Etionamida (<i>inhA</i>) - Fluoroquinolonas (<i>gyrA, gyrB</i>) - Aminoglucósidos (<i>rrs, eis</i>)	2 h	No evidencia
PCRd	<i>gyrB</i>	No	2 h	22,1%
	IS6110	No		57,4%
LiPA	GenoType MTBDRplus	- Rifampicina (<i>rpoB</i>) - Isonicida (<i>katG, inhA</i>)	5 h	55%
	GenoType MTBDRs/ versión 1	- Fluoroquinolonas (<i>gyrA</i>) - Amikacina (<i>rrs</i>) - Etambutol (<i>embB</i>)		No evidencia
	GenoType MTBDRs/ versión 2	- Fluoroquinolonas (<i>gyrA, gyrB</i>) - Amikacina (<i>rrs, eis</i>)		
LAMP	Loopamp MTBC	No	1 h	76%
RT-PCR microchip	Truenat MTBplus	No	1 h	79-86%
	Truenat-RIF Dx	- Rifampicina (<i>rpoB</i>)		No evidencia
	Truenat-INH	- Isoniacida (<i>katG, inhA</i>)		
NGS		Todos los fármacos de 1ª y 2ª línea	1-2 días	78-84%

LAMP: loop-mediated isothermal amplification, **LiPA:** Line Probe Assays, **MTB:** *Mycobacterium tuberculosis*, **NGS:** Next-generation sequencing, **PCRd:** PCR digital, **R-RF:** resistencia a rifampicina, **RT-PCR:** PCR en tiempo real.

4.5.3.3 Técnicas de PCR digital en gota

La PCR digital en gota (PCRd) se ha estudiado sobre dos regiones: *gyrB* e IS6110. La región IS6110 presenta una mayor sensibilidad respecto al diagnóstico probable o definitivo de meningitis tuberculosa (33). En estudios comparativos con el GeneXpert y la NGS, la PCRd alcanza una sensibilidad del 99% y una especificidad del 97-100%.

Es especialmente útil en muestras paucibacilares y permite una cuantificación precisa del ADN de *M. tuberculosis*. Sin embargo, su disponibilidad está limitada a centros de alta complejidad, su coste es elevado y no permite identificar resistencias.

4.5.3.4 Técnicas de amplificación e hibridación reversa en fase sólida

Las técnicas de hibridación reversa en fase sólida, denominadas también LiPA (*Line Probe Assays*), amplifican una o varias regiones genéticas y después realizan hibridación reversa con sondas cortas inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa. Se emplean principalmente para detectar múltiples mutaciones que codifican resistencias en colonias aisladas o en muestras con baciloscopia positiva. Una de las técnicas más frecuentemente implementadas es GenoType MTBDR*plus*, que detecta resistencias a rifampicina e isoniacida de alto y bajo nivel. En caso de que se detecten resistencias, es posible ampliar con GenoType MTBDR*sl*. Este último incluye la detección de resistencias a fluoroquinolonas, amicacina y, según la versión, a kanamicina (versión 2) o etambutol (versión 1).

Asimismo, existe la técnica GenoType CM*direct*, validada para su aplicación en muestras clínicas, que permite la detección simultánea de *M. tuberculosis complex* y otras micobacterias de interés clínico no tuberculosas. Otras técnicas LiPA, como el sistema GenoQuick MTB, se encuentran validadas para muestras respiratoria y extrapulmonares, pero sin estudios publicados en LCR.

4.5.3.5 Técnicas de amplificación isotérmica (LAMP)

La técnica LAMP es una metodología que ofrece una sensibilidad del 76 % y una especificidad del 99% en LCR. Sin embargo, está diseñada para su aplicación en muestras de esputo, sin haber sido evaluada adecuadamente en muestras de LCR. Es necesario realizar mayor número de estudios con muestras extrapulmonares para mejorar las estimaciones de sensibilidad. La técnica LAMP comercializada es Loopamp™ MTBC detection kit y no identifica genes asociados a resistencia.

4.5.3.6 Técnicas de amplificación basadas en microchips

La prueba comercializada es Truenat MTB*plus*, una PCR en tiempo real basada en microfluidos. Truenat MTB*plus* ofrece un rendimiento similar al de Xpert MTB/RIF Ultra, con una tasa de identificación del 79-86% en meningitis tuberculosa (27). Las ventajas de esta técnica son un tiempo de respuesta de una hora, el empleo de reactivos liofilizados de un solo uso y el sencillo procesamiento y lectura de resultados. Tiene un bajo límite de detección de 29 células/ml, por lo que se utiliza en muestras pulmonares y extrapulmonares. Una vez obtenido un resultado positivo, existen otras pruebas de Truenat (Truenat-RIF Dx y Truenat-INH) para determinar la resistencia a rifampicina e isoniacida.

4.5.3.7 Secuenciación del genoma completo (metagenómica) y dirigida (targeted)

La secuenciación metagenómica o NGS ofrece una solución innovadora para la detección no dirigida de patógenos en LCR o en biopsia cerebral. Existen estudios preliminares realizados con la plataforma Torrent NGS, en los que se logró detectar la mayoría de los casos de meningitis tuberculosa en el LCR (34). Estos resultados son alentadores, pero el elevado coste y la disponibilidad limitada en algunos laboratorios reducen su aplicabilidad. En consecuencia, la metagenómica se reserva para el análisis de los aislamientos en cultivos y estudiar un mayor número de genes de resistencias, mientras que la secuenciación dirigida, se emplea para amplificar determinadas dianas de interés en muestras directas.

La capacidad de identificar resistencias genéticas a todos los fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis, constituye una ventaja muy significativa de las técnicas de secuenciación masiva. Los estudios de asociación entre los datos fenotípicos y metagenómicos resultan indispensables para la investigación de las mutaciones asociadas a la resistencia. Sin embargo, es necesario disponer de catálogos de mutaciones y de la asociación con la resistencia a los fármacos debidamente actualizada. Existen varios manuales publicados por la OMS para ayudar a la implantación de NGS en el laboratorio (2023), un catálogo de mutaciones (actualizado en 2023) y guías técnicas (2018).

4.5.4. Técnicas rápidas de detección de antígeno de lipoarabinomanano

La determinación del lipoarabinomanano (componente de la pared celular de *M. tuberculosis*) en orina proporciona un diagnóstico rápido (25 minutos mediante inmunocromatografía Determine™ TB LAM Ag), económico, que requiere bajos volúmenes (30 µl) y es fácil de realizar e implementar (35). La OMS recomienda el uso de Determine™ TB LAM Ag para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en muestras de orina de pacientes con infección por VIH que presenten signos o síntomas, en casos de inestabilidad clínica grave o en estadios avanzados de VIH.

La detección de lipoarabinomanano se ha estudiado en LCR de adultos con VIH y sospecha de meningitis tuberculosa. La evidencia disponible sugiere el uso en LCR con precaución, preferiblemente en pacientes con infección por VIH y en casos en los que el volumen de la muestra sea limitado o no sea factible realizar técnicas moleculares. En un estudio, la prueba Determine™ TB LAM Ag mostró una baja sensibilidad (24%) y una alta especificidad (95%), en comparación con el estándar de referencia de meningitis tuberculosa definitiva o probable (36). Se han desarrollado pruebas de detección de última generación, como SILVAMP TB, que presentan una sensibilidad superior a la inmunocromatografía y pueden detectar concentraciones 30 veces inferiores.

5. MENINGITIS FÚNGICA

5.1. INTRODUCCIÓN

Cryptococcus neoformans (*C. neoformans*) es el hongo más prevalente causante de meningitis fúngica, siendo catalogado por la OMS como uno de los patógenos fúngicos prioritarios a nivel global. Esta situación se atribuye a una distribución geográfica global y a la facilidad de producir infección invasiva (criptococosis) en pacientes inmunodeprimidos. Dentro de la criptococosis, la meningitis se presenta como la afección clínica responsable de una elevada tasa de mortalidad y morbilidad.

La mayor carga de la meningitis criptocócica se registra en los países de ingresos bajos y medios, particularmente en el África subsahariana, donde el VIH y el sida se identifican como los principales factores de riesgo. Sin embargo, se ha observado un incremento en el número de casos registrados en pacientes inmunodeprimidos que no presentan VIH, tales como receptores de trasplantes de órganos sólidos, pacientes bajo tratamiento con fármacos inmunosupresores (corticoides), individuos afectados por enfermedades con afecciones inmunosupresoras e inmunocompetentes.

Cryptococcus gattii (*C. gattii*) causa enfermedad con más frecuencia en personas inmunocompetentes. Aunque ambas especies pueden causar una amplia variedad de síndromes, *C. neoformans* tiene predilección por la enfermedad del SNC, y *C. gattii* se asocia más a menudo con enfermedad pulmonar y criptococomas (37). La distribución de *C. gattii* se limita a regiones de zonas tropicales cercanas al océano Pacífico (Australia, EE.UU., Canadá, entre otros). Los criptococomas se producen predominantemente en los pulmones y el cerebro. Los criptococomas del SNC son masas cerebrales múltiples que pueden manifestarse como déficits neurológicos o aumento de la presión intracraneal, lo que requiere un tratamiento urgente. Las lesiones radiológicas pueden persistir indefinidamente, incluso después de la curación clínica y microbiológica.

La meningitis por otros patógenos fúngicos diferentes a *Cryptococcus* spp., incluye especies de *Candida* hongos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*) y hongos filamentosos (*Aspergillus* spp.). Por lo general, los síntomas son subagudos y varían en función del hongo implicado. La meningitis por *Candida* spp. es poco frecuente, pero más habitual en niños prematuros, en pacientes con derivaciones del SNC o estados de inmunodeficiencia grave. Los hongos dimórficos endémicos, como *Coccidioides* spp. o *Histoplasma capsulatum*, son importantes causas de meningitis en las regiones endémicas y se encuentran en constante expansión. Por último, las especies de *Aspergillus* no suelen ser causas frecuentes de meningitis, aunque pueden producir brotes iatrogénicos y casos esporádicos con pronóstico grave. Estas infecciones se manifiestan y se presentan con mayor frecuencia como abscesos cerebrales.

5. 2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La criptococosis se adquiere principalmente por inhalación y se manifiesta tras la reactivación de una infección latente en el pulmón. El estado de inmunosupresión del individuo hace que no se controle la infección y se disemine por vía hematógena al SNC. Presenta manifestaciones variadas, siendo la meningitis criptocócica la manifestación más frecuente y grave. 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. No obstante, la criptococosis debe considerarse en cualquier paciente que presente síntomas o datos microbiológicos compatibles, independientemente de su estado inmunitario (37). Entre los factores de virulencia de *C. neoformans* se encuentran la termotolerancia, la cápsula polisacárida, la síntesis de melanina y la secreción de enzimas extracelulares, fosfolipasas, proteinasas y ureasa.

La enfermedad puede manifestarse de forma aguda, subaguda o crónica, aunque generalmente se inicia como una meningitis o una meningoencefalitis subaguda con deterioro progresivo. Las manifestaciones clínicas y los resultados de las pruebas analíticas habituales son inespecíficos. En pacientes infectados por el VIH, se ha descrito un síndrome de respuesta inflamatoria post-infección después de comenzar el tratamiento antirretroviral de alta eficacia (TARGA) o cuando se recupera la inmunidad, y también en pacientes a los que se retira el tratamiento inmunosupresor. Este síndrome se caracteriza por la presentación aguda de una meningitis, como consecuencia de una respuesta inmunitaria al polisacárido capsular en una criptococosis latente.

La clínica de la meningitis criptocócica es muy variada y, por tanto, es fundamental sospecharla para evitar un diagnóstico tardío. Todos los pacientes con criptococosis sospechada o confirmada (incluida la antigenemia criptocócica) deben someterse a una evaluación clínica para determinar si existe afectación del SNC y a nivel pulmonar. Esto incluye punción lumbar para determinar la presión de apertura del LCR, glucosa, proteínas, recuento celular, microscopía, cultivo y cuantificación del antígeno criptocócico en el LCR. Además se debe realizar una cuantificación del antígeno criptocócico en sangre y cultivos de sangre, esputo (u otras muestras respiratorias) y otras zonas afectadas, así como imágenes cerebrales (preferiblemente resonancia magnética) e imágenes torácicas (preferiblemente tomografía computarizada) (37).

La presencia de hiperproteorraquia, hipoglucoorraquia y pleocitosis variable (20-400 células/ μ l), con predominio generalmente de linfocitos en el LCR, orienta hacia la meningitis criptocócica. No existen alteraciones patognomónicas en las pruebas de imagen y las lesiones parenquimatosas pueden corresponder a criptocomas, linfomas o lesiones de una segunda infección oportunista, como la toxoplasmosis o la nocardiosis. Las pruebas analíticas en LCR y de imagen pueden ser normales en un alto número de casos, por lo que es necesario utilizar métodos microbiológicos para la detección directa del patógeno.

5. 3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

5.3.1 Procesamiento

La microscopía y el cultivo del LCR, el hemocultivo, acompañados de pruebas de antígenos criptocócicos en el LCR y la sangre son fundamentales para el diagnóstico de la criptococosis (37). La muestra de orina también se ha utilizado para el análisis del antígeno criptocócico; sin embargo, la sangre (ya sea suero o plasma) es preferida para el diagnóstico y el seguimiento. La orina puede ser considerada una alternativa viable y no invasiva, particularmente en contextos con recursos limitados. La tinción con tinta china se debe realizar preferentemente sobre el sedimento del LCR. El procedimiento de la tinción se trata de mezclar un volumen igual de tinta china con sedimento del LCR sin diluir.

5.3.2 Selección de medios y condiciones de incubación

Los medios de cultivo que se emplean habitualmente para el diagnóstico de bacterias permiten el crecimiento de *Cryptococcus* spp. tras un periodo de incubación de 48-72 horas en aerobiosis. También se pueden utilizar medios más selectivos, como el agar Sabouraud dextrosa sin cicloheximida o con cloranfenicol u otros antibacterianos. La incubación debe realizarse durante al menos 3 semanas. Además, si el paciente está en tratamiento antifúngico, el cultivo debe reincubarse hasta 30 días. En caso de sospecha de micosis endémicas, lo ideal es emplear un medio enriquecido (BHI) incubado a diferentes temperaturas (25-30 °C y 35-37 °C) para observar el dimorfismo térmico.

5. 4.CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la meningitis criptocócica, es necesario revisar una posible recaída clínica durante el seguimiento. No obstante, no se debe intensificar el tratamiento antifúngico por antígeno criptocócico persistente en sangre o en el LCR, criptococos visibles mediante microscopía en el LCR (sin positividad en el cultivo) o alteraciones bioquímicas del LCR, ya que estos no indican fracaso microbiológico (37).

La meningitis fúngica causada por otros hongos diferentes a *Cryptococcus* spp. se diagnostica predominantemente mediante el aislamiento en medios de cultivo o la visualización microscópica directamente en el LCR. La determinación del 1,3-beta-D-glucano en el LCR, puede constituir un marcador diagnóstico de enfermedad fúngica invasiva (excluyendo la criptococosis), especialmente en casos de meningitis subaguda de causa desconocida. La detección molecular mediante PCR a tiempo real de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. u hongos dimórficos, podría proporcionar el diagnóstico etiológico en caso de alteraciones en el beta-D-glucano o el galactomanano sérico, que se acompañen de manifestaciones neurológicas.

5.4.1 Tinciones

La tinción con tinta china es una tinción negativa que permite visualizar la cápsula polisacáridica refringente de *Cryptococcus* spp. sobre un fondo negro. En general, todas las especies de *Cryptococcus* spp. exhiben la presencia de cápsula. No obstante, se han descrito cepas de *C. neoformans* que son acapsuladas o poseen una cápsula reducida dependiente de las condiciones ambientales. La tinción con tinta china presenta una sensibilidad menor en pacientes sin infección por el VIH. Este fenómeno se atribuye a las bajas cargas presentes en LCR, que tiende a ocasionar resultados falsos negativos de las tinciones. Los falsos positivos por artefactos, pueden reconocerse como tal, mediante la realización simultánea de la detección de antígeno en LCR con resultado negativo o empleando la tinción fluorescente de calcofluor, que permite identificar la presencia de levaduras en bajas concentraciones.

En la tinción de Gram o en la observación en fresco, se pueden visualizar levaduras redondas en el caso de *Cryptococcus* spp. y levaduras ovaladas o pseudohifas en el caso de las diferentes especies de *Candida*. No obstante, estas técnicas tienen una menor sensibilidad que la tinción con tinta china, ya que no facilitan observar la cápsula.

5. 5.CULTIVOS

El cultivo del LCR es el método de referencia para el diagnóstico de la meningitis fúngica. El crecimiento en cultivo suele implicar una enfermedad criptocócica activa. Si bien el cultivo es preciso en la mayoría de las circunstancias, los resultados suelen requerir un tiempo de incubación de al menos 7 días, limitando su aplicabilidad clínica en la meningitis. El crecimiento lento y la existencia de cepas de *Cryptococcus* spp. en forma viable pero no cultivable, hacen que se deba realizar la prueba del antígeno de criptococo en LCR.

El cultivo permite aislar la cepa y determinar si se trata de persistencia o recaída de la infección, en el caso de

que los cultivos del LCR se mantengan positivos (37). Cuando esto ocurre con *Cryptococcus* spp., es recomendable realizar las pruebas de sensibilidad a antifúngicos de forma simultánea en el aislado inicial y en el de la recaída.

La resistencia adquirida a los polienos, como la anfotericina B, es poco frecuente, pero la aparición de resistencia al fluconazol resulta preocupante (37). Un aumento de más de 2 diluciones de la CMI inicial del fluconazol durante el tratamiento, podría sugerir el desarrollo de resistencia y la necesidad de una monitorización clínica más estrecha. El desarrollo de resistencia secundaria a la flucitosina es frecuente cuando se administra en monoterapia, por lo que es necesario combinarla con otro fármaco en el tratamiento de la criptococosis.

No existen puntos de corte clínicos para el fluconazol frente a *Cryptococcus* spp., y no hay datos suficientes que sugieran que unas CMI elevadas impliquen peores resultados. Actualmente EUCAST (v.11.0, 2024) dispone de puntos de corte clínicos para anfotericina B en *C. neoformans*, así como de puntos de corte epidemiológicos para posaconazol (0,5 mg/l en *C. neoformans* y 1 mg/l en *C. gattii*) y voriconazol (0,5 mg/l en *C. neoformans*). En CLSI (4ª edición, 2022) existen puntos de corte epidemiológicos para fluconazol: 8 mg/l para *C. neoformans*, 16 mg/l para *C. gattii* y 32 mg/l para *Cryptococcus deuterogattii*.

5. 6. DETECCIÓN DE ANTIGENO

Las técnicas de detección del antígeno capsular polisacárido de *Cryptococcus* spp. son aplicables a diversos tipos de muestras, como suero, LCR, sangre y orina. Las pruebas de antígeno permiten el diagnóstico precoz de la meningoencefalitis criptocócica, en situaciones en las que no se dispone de acceso inmediato a la punción lumbar o cuando su realización está contraindicada.

Inicialmente estas pruebas se comercializaron como técnicas de aglutinación de látex o inmunoensayos enzimáticos, presentando una sensibilidad y una especificidad superiores al 90%. En la actualidad, existen inmunocromatografías rápidas o pruebas de flujo lateral que se han convertido en un método de diagnóstico esencial en entornos con recursos limitados, porque permiten realizar un diagnóstico presuntivo de manera sencilla. Las pruebas de flujo lateral son estables a temperatura ambiente, no requieren preparación de muestras, proporcionan resultados en minutos y son 100 veces más sensibles que la aglutinación de látex (38).

La detección del antígeno identifica la infección a partir de la tercera semana, antes de la aparición de los síntomas y de que pueda convertirse en una meningoencefalitis potencialmente mortal. El reconocimiento de la meningitis criptocócica en pacientes inmunocompetentes y no infectados por el VIH puede presentar un desafío, dado que la carga fúngica inicial es frecuentemente baja. Este fenómeno implica una reducción en la sensibilidad de los cultivos fúngicos y en la microscopía, pero no afecta a las técnicas de antígeno. Se han desarrollado títulos semicuantitativos de las pruebas de flujo lateral para estimar la carga fúngica (38). No obstante, son necesarios más estudios para investigar el uso de títulos semicuantitativos para el seguimiento, y no se recomienda la detección de antígenos criptocócicos en sangre o LCR para distinguir entre los pacientes que responden al tratamiento y los que no (37).

Las técnicas de detección de antígeno también se emplean en el cribado. El antígeno criptocócico en sangre sirve de cribado en las personas infectadas por el VIH y que no han recibido o han interrumpido el TARGA o que tienen menos de 200 células CD4 por mm³

Las técnicas de detección de antígenos para la meningitis causada por *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* muestran un notable rendimiento en muestras de sangre y orina. Sin embargo, el rendimiento diagnóstico resulta menos evidente en la meningitis causada por *Blastomyces dermatitidis*. Una prueba de interés es la detección en sangre del β -D-glucano, componente de la pared celular fúngica presente en la mayoría de los hongos, excepto en los Mucorales y *Cryptococcus* spp.. Se han realizado estudios para investigar el uso de la prueba del β -D-glucano y galactomanano en el LCR. Aunque se requiere más evidencia para su aplicación general, puede ser útil para diagnosticar la ventriculitis y la meningitis causadas por *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y los hongos dimórficos.

5. 7. TÉCNICAS MOLECULARES

Las técnicas moleculares no ofrecen grandes ventajas en comparación con las pruebas de detección de antígenos de *Cryptococcus* spp.. Se han logrado avances tras incorporar la diana de *C. neoformans/gattii* en diferentes paneles de PCR multiplex de meningitis en conjunto con otros patógenos (BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel, QIAstat-Dx Meningitis/Encephalitis Panel). El diagnóstico de pacientes sin sospecha clínica evidente de infección fúngica puede ser descartado o confirmado mediante la implementación de paneles de PCR multiplex. También se han desarrollado técnicas LAMP en LCR más rápidas que la PCR para detectar *Cryptococcus* spp.. No obstante, la evaluación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la meningitis criptocócica es limitada y los estudios realizados muestran sensibilidades inferiores a las técnicas de detección de antígeno.

Existen PCR uniplex o multiplex a tiempo real comercializadas que pueden realizarse en LCR para el diagnóstico de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y hongos dimórficos endémicos. Las PCRs a tiempo real permiten establecer un diagnóstico más rápido respecto al cultivo de hongos. Es interesante emplearlas, cuando se observan al microscopio posibles levaduras o micelio y el resultado del antígeno criptocócico es negativo.

6. INFECCIONES POR AMEBAS DE VIDA LIBRE

6. 1. INTRODUCCIÓN

La infección del SNC por amebas de vida libre es un evento poco frecuente, pero presenta tasas de mortalidad superior al 90 %, incluso con tratamiento antimicrobiano. Las amebas de vida libre se encuentran en aguas dulces, tales como lagos y ríos. Estas amebas pueden causar infección en cualquier persona que se bañe en aguas al aire libre, independientemente de su estado inmunológico. Se han identificado cuatro géneros de amebas con potencial para causar enfermedades en humanos: *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*), *Acanthamoeba* spp., *Sappinia pedata* y *Balamuthia mandrillaris* (*B. mandrillaris*) (39).

6. 2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Las infecciones por amebas de vida libre son muy poco prevalentes en España y la mayoría de los casos se han descrito en EE. UU. Pueden causar dos síndromes clínicos diferentes de encefalitis: la meningoencefalitis amebiana primaria y la encefalitis amebiana granulomatosa. La meningoencefalitis amebiana primaria está causada por *N. fowleri* y su presentación clínica es similar a la meningitis bacteriana aguda. Los parámetros del LCR también son similares, con hipoglucorraquia e hiperproteorraquia. Por lo general, se observan hematíes en el LCR y, a medida que avanza la enfermedad, este se vuelve hemorrágico. En pacientes con sospecha de meningitis bacteriana, cultivos negativos y sin mejoría con el tratamiento antibiótico, es importante revisar el historial epidemiológico del paciente y preguntar por baños recientes en aguas al aire libre.

Por otro lado, la encefalitis amebiana granulomatosa es una infección subaguda o crónica del SNC que clínicamente puede parecerse a un absceso cerebral. Está causada por *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris*. En la biopsia cerebral suele observarse una inflamación granulomatosa moderada con afectación vascular. Los parámetros del LCR muestran una pleocitosis leve con predominio linfocitario, una concentración elevada de proteínas y una concentración baja o normal de glucosa.

6. 3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Las muestras recibidas para el diagnóstico de infecciones del SNC por amebas son principalmente LCR, biopsias cerebrales o autopsias. La recogida se realiza por punción lumbar o escisión neuroquirúrgica en contenedor estéril de boca ancha. El LCR es la principal muestra empleada en el diagnóstico de la meningoencefalitis amebiana primaria; sin embargo, para la encefalitis amebiana granulomatosa la biopsia es la muestra de elección.

6. 4 . MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

En la petición de la muestra se debe verificar la identificación del paciente, el volumen disponible y las condiciones de transporte y conservación de la muestra. El procesamiento del LCR y las biopsias cerebrales son una prioridad. No se rechazará ni se demorará el procesamiento de las muestras por razones menores, sin consultar previamente con el clínico solicitante.

6. 5 . PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

6.5.1. Examen microscópico e inoculación en medios de cultivo

El examen microscópico puede realizarse directamente sobre la muestra para observar la movilidad de los trofozoitos. En la tinción con calcofluor, se procede a la mezcla de una gota de reactivo con LCR en proporciones iguales.

El LCR se inocula en el medio de cultivo tras centrifugación. La siembra debe efectuarse en un plazo menor a ocho horas. En caso de volúmenes inferiores a 1 ml, es posible inocular directamente el medio.

6.5.2. Selección de medios y condiciones de incubación

El cultivo se lleva a cabo en un medio de cultivo no nutritivo preparado con Page salino, en el cual se ha sembrado previamente “en césped” una cepa de *E. coli* o *Enterobacter* spp. no mucoso. Este medio permite el crecimiento de *Acanthamoeba* spp. y *N. fowleri*, pero no de *B. mandrillaris*. Los medios para el crecimiento de amebas se incuban preferentemente a 30 °C en aerobiosis durante 7 a 10 días.

6. 6 . CRITERIOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y PROCEDIMIENTOS ADICIONALES

El diagnóstico de laboratorio se basa en la visualización microscópica de trofozoítos y/o quistes en fresco y en la fluorescencia de los quistes de *Acanthamoeba* spp. tras la tinción con blanco de calcoflúor directamente sobre muestra o tras el cultivo de las amebas. El diagnóstico genómico por PCR se realiza para confirmar la especie en laboratorios de referencia.

6.6.1. Examen microscópico

Se puede realizar un examen en fresco, tinción con calcofluor o Giemsa. En el examen en fresco, se pueden observar los trofozoítos de amebas en movimiento. El calcofluor presenta una elevada sensibilidad para detectar quistes de *Acanthamoeba* spp., que presentan fluorescencia verde claro y una pared externa arrugada. En contraste, los trofozoitos no emiten fluorescencia. La tinción de Wright o Giemsa, destinada a observar la morfología de células en LCR, permite observar e identificar a *N. fowleri*.

Dentro del género *Acanthamoeba* es difícil de distinguir entre especies debido a su morfología. Además, *Acanthamoeba* spp. es muy similar morfológicamente a *B. mandrillaris*. El trofozoito de *Acanthamoeba* spp. es pleomórfico, mide entre 15 y 45 µm, suele ser uninucleado con nucléolo central, presenta numerosas vacuolas digestivas, una vacuola contráctil activa y proyecciones espinosas superficiales denominadas acantopodios, responsables de los movimientos ameboides. El quiste mide entre 10 y 25 µm, tiene forma redondeada o poligonal y está rodeado de una doble pared.

N. fowleri se puede encontrar en tres formas: trofozoítos, formas flageladas y quistes. Los trofozoítos se mueven lentamente cuando se observan en fresco, por lo que se recomienda calentar el portaobjetos para mejorar su movilidad. Si se añade agua destilada a la preparación los trofozoítos se flagelan y aumenta su movilidad.

6.6.2. Cultivo de amebas

El crecimiento de las amebas se observa a simple vista como áreas claras o placas de lisis sobre el césped bacteriano en la placa de agar. Las zonas claras corresponden al consumo de bacterias por las amebas. En los casos de infección grave, las amebas pueden verse a las 24-48 horas.

Tras observar la zona de aclaramiento, se toma una porción de agar y se examina en fresco con una gota de solución salina o de Page. Se suelen encontrar trofozoítos móviles y cuando el cultivo lleva varios días se observan quistes.

6.6.3. Diagnóstico genómico

El diagnóstico definitivo de las amebas requiere la confirmación molecular en el LCR o la biopsia. Existen PCR convencionales y a tiempo real para el diagnóstico de las diferentes especies de amebas.

7. INFECCIONES RELACIONADAS CON LAS DERIVACIONES DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR)

7.1 . INTRODUCCIÓN

La meningitis puede estar asociada a diversos procedimientos invasivos, tales como la colocación de catéteres para el drenaje del LCR, también llamadas derivaciones de LCR. Estas meningitis o ventriculitis están asociadas a la atención sanitaria y producidas por un amplio espectro de microorganismos, que incluyen *Staphylococcus* spp., bacterias Gram negativas multirresistentes, levaduras, entre otros. Además, la producción de *biofilms* sobre estos dispositivos biomédicos representa un desafío en el tratamiento de estas infecciones. Las derivaciones se pueden dividir en dos tipos:

Derivaciones internas

Se tratan de catéteres permanentes en los que el extremo proximal de la derivación se encuentra en el ventrículo cerebral (drenaje ventricular), el espacio subdural, un quiste intracraneal o el espacio subaracnoideo lumbar (drenaje lumbar). El extremo distal suele terminar en el espacio peritoneal, pleural o vascular (40). Normalmente, parte del sistema es una válvula reguladora de presión que suele colocarse fuera del cráneo o como parte integrante del tubo distal. También se pueden añadir al sistema, depósitos para el acceso percutáneo intermitente o incorporarlos al conjunto de la válvula. Otros componentes adicionales pueden ser válvulas antisifón y diversos conectores, que permiten la interconexión de más de un catéter o dispositivo. Las más utilizadas son las derivaciones ventrículo peritoneales (DVP), que drenan a la cavidad peritoneal. Las derivaciones ventrículoatrial (DVA) se utilizan como segunda opción en el manejo de la hidrocefalia cuando la DVP ha fallado.

La incidencia de infecciones en las derivaciones internas oscila entre el 4 % y el 17 % (40). Existen cuatro mecanismos por los cuales las derivaciones del LCR pueden infectarse. El más frecuente es la colonización de la derivación en el momento de la cirugía. El segundo mecanismo es la infección retrógrada desde el extremo distal de la derivación; por ejemplo, la perforación intestinal puede provocar la contaminación distal del catéter en pacientes con DVP. Un tercer mecanismo es a través de la piel debido a la manipulación externa del catéter. El cuarto mecanismo es la diseminación hematógena. Este mecanismo es especialmente relevante en los pacientes con DVA, ya que el extremo distal se encuentra en el sistema vascular, lo que supone un riesgo continuo de infección por bacteriemia.

Derivaciones externas o drenajes de LCR

Los drenajes de LCR son catéteres temporales que desvían el LCR hacia el exterior (40). El extremo proximal se puede encontrar en las mismas localizaciones que las derivaciones internas. Los drenajes ventriculares

externos son útiles para el tratamiento temporal de pacientes con presión intracraneal elevada secundaria a hidrocefalia aguda causada por hemorragia intracraneal, obstrucción neoplásica de la circulación del LCR o traumatismo. El extremo distal del catéter se conecta a un sistema de recolección, que tiene una cámara de goteo, puertos para medir la presión intracraneal, puertos de muestreo de LCR e inyección de medicamentos y una bolsa de recolección. Normalmente, los drenajes se colocan mediante una incisión y luego se tunelizan a nivel subcutáneo antes de salir a través de la piel. En pacientes con drenajes ventriculares externos, la incidencia de ventriculitis ha oscilado entre el 0 % y el 22 %. La ventriculitis es la principal complicación de la derivación externa y la infección se produce mayoritariamente en el momento de la colocación. Otro mecanismo es la infección retrógrada, en la que los microorganismos entran en el dispositivo siguiendo el recorrido desde el punto de salida o cuando se irriga el tubo para mantener la permeabilidad tubular.

7.2 .EPIDEMIOLOGÍA

Los microorganismos implicados en la infección de las derivaciones internas y externas son los propios de la microbiota cutánea. Estafilococos coagulasa negativo y *S. aureus* son los agentes causales más frecuentes, seguidos por *Corynebacterium* spp y *Cutibacterium acnes*. Aunque dependiendo del tipo de localización del extremo distal, como en el caso de las DVP, puede ser más común las infecciones polimicrobianas por Enterobacterales y otros microorganismos pertenecientes a la microbiota intestinal. Las derivaciones externas suelen estar más expuestas a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* y otros microorganismos nosocomiales en pacientes ingresados, especialmente en UCI, y sobre todo si hay manipulación constante del dispositivo.

7.3 .CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas dependen del tipo de derivación, del mecanismo de infección y del patógeno implicado. Los síntomas más habituales son cefalea de nueva aparición, fiebre (más común en derivaciones internas), alteraciones de conducta y mal funcionamiento del dispositivo. Según la localización, se puede producir peritonitis en las DVP, bacteriemia (a veces con glomerulonefritis asociada) en las DVA y pleuritis en las ventriculopleurales. Las derivaciones externas suelen asociarse a ventriculitis (con o sin encefalitis) y eritema en el trayecto subcutáneo.

La infección es compatible cuando se obtienen cultivos de LCR positivos, únicos o múltiples, en pacientes con síntomas clínicos sospechosos de ventriculitis o meningitis, pleocitosis del LCR o un recuento celular en aumento con hipoglucoorraquia (40). Los valores anómalos en LCR no descartan ni indican infección de estos dispositivos. En las fases iniciales de la infección, el LCR puede presentar valores normales, mientras que tras la implantación se observan valores anómalos. Los marcadores analíticos, como la PCR, la procalcitonina y el lactato, suelen estar elevados y ayudan a sospechar la infección. El cultivo microbiológico es la técnica de referencia que permite establecer el diagnóstico etiológico y ajustar el tratamiento empírico según el patrón local de resistencias.

7.4 .RECOGIDA DE MUESTRA

En todos los casos, se debe minimizar la manipulación del sistema y limitar la frecuencia de muestreo para reducir el riesgo de infección asociada al dispositivo. La toma de LCR desde drenajes o derivaciones internas está indicada principalmente cuando no es posible realizar punción lumbar o cuando se requiere monitorización frecuente en pacientes críticos. La rentabilidad de los cultivos de LCR obtenido por punción del reservorio o de los catéteres, es más elevada que la obtenida por punción lumbar. Es recomendable especificar en la petición si existe tratamiento antimicrobiano previo a la recogida de la muestra.

La recogida del LCR debe realizarse siguiendo estrictas técnicas estériles, considerando la localización anatómica y el tipo de dispositivo. En el caso del LCR obtenido de derivaciones internas ventriculares, si el sistema tiene un reservorio de acceso percutáneo, la muestra se obtiene mediante punción directa del reservorio. También se puede recoger del catéter distal externalizado, si lo hubiera (40). En el caso de los drenajes

externos ventriculares, se recomienda tomar la muestra del puerto de muestreo del sistema de drenaje y evitar la manipulación directa del catéter proximal para reducir el riesgo de infección, hemorragia y obstrucción. La toma distal es equivalente en calidad diagnóstica a la toma proximal, pero la primera conlleva menos riesgo de complicaciones. En los drenajes externos lumbares, la muestra se obtiene del puerto de muestreo del sistema de drenaje lumbar o mediante punción lumbar.

No se recomienda la toma de LCR de componentes internos o tras la extracción del material de la derivación, salvo en casos de sospecha de infección activa. En este último caso, se recomienda realizar cultivos de los componentes de la derivación y del catéter. Los hemocultivos están recomendados en pacientes con sospecha de infección de la DVA y pueden considerarse en pacientes con DVP y ventriculopleurales (40). Aunque generalmente los hemocultivos convencionales no suelen ser útiles para diagnosticar la mayoría de las infecciones de dispositivos del SNC.

7. 5. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El LCR es una muestra de procesamiento urgente que debe enviarse inmediatamente al laboratorio. Una vez recibida, requiere realizar rápidamente la tinción de Gram e inocular la muestra en los medios de cultivo correspondientes. Si hubiera un retraso inevitable en el procesamiento, mantener el LCR a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (en estufa) o a temperatura ambiente; nunca refrigerar la muestra antes del cultivo. El transporte debe realizarse en condiciones seguras (recipiente hermético dentro de una bolsa de transporte), respetando las normativas de bioseguridad vigentes. Existen dudas sobre la rentabilidad del empleo de medios de transporte de anaerobios (Portagem o similar), por lo que no se recomienda su uso.

El envío de componentes de las derivaciones o catéteres se deberá introducir en un frasco estéril de boca ancha sin medio de transporte ni conservante, separando cada componente de la derivación en frascos diferentes. En caso de no poder procesarse la muestra se podrá guardar refrigerada a 4 °C durante menos de 6 días.

7. 6. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

En la muestra de LCR se debe verificar la identificación del paciente, el volumen disponible y las condiciones de transporte y conservación de la muestra. Es recomendable conocer si la muestra procede de una derivación y especificar el tipo. Los catéteres o diferentes componentes de las derivaciones se identificarán especificando tipo de componente y si el catéter se localizaba en zona distal o proximal.

7. 7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

7.7.1 Procesamiento

La tinción de Gram y el cultivo del LCR son los principales métodos de diagnóstico de las infecciones del SNC asociadas a la asistencia sanitaria y a dispositivos. Las recomendaciones relativas a la necesidad de centrifugar el LCR antes del cultivo, el cultivo anaeróbico y uso de caldos de enriquecimiento, la duración de la incubación y el procedimiento para los cultivos de puntas de dispositivos del SNC difieren entre las diferentes referencias bibliográficas y los laboratorios (41).

La punta distal y proximal del catéter puede procesarse de la misma forma que un catéter venoso central (Procedimientos de la SEIMC números 15 (1ª edición) y 15A (2ª edición) “Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares”). En caso de cultivar otras partes de la derivación, como el reservorio o válvulas, la sonicación en medio líquido aumenta el rendimiento del cultivo. El cultivo en medio líquido presenta mayor rendimiento, sin embargo, facilita el crecimiento de un bajo número de bacterias que pueden contaminar la derivación en el momento de la retirada, complicando la valoración de los resultados.

El tratamiento antibiótico previo a la recogida de muestra es una causa común de tinción de Gram y cultivo de LCR falsamente negativos hasta en un 50% de pacientes (41). Por ello, se recomienda guardar una alícuota de LCR o líquido de sonicación de los dispositivos y considerar emplear técnicas moleculares para descartar infección en casos con cultivo negativo.

7.7.2 Selección de medios y condiciones de incubación

Los medios de cultivo empleados para el LCR obtenido de derivaciones son los mismos que para una punción lumbar habitual (agar sangre, agar chocolate) añadiéndose medios para mejorar la recuperación de anaerobios de crecimiento lento (*C. acnes*) y organismos relacionados con dispositivos/*biofilms*.

Varios estudios han notificado un aumento de la proporción de cultivos positivos de LCR y de infecciones clínicamente significativas por *C. acnes* con la adición de cultivos anaerobios (medios sólidos o líquidos como el tioglicolato) y la incubación prolongada durante 10 a 14 días de los caldos de enriquecimiento (41). La inoculación de un frasco de hemocultivo pediátrico con 1 a 3 ml de LCR reduce el tiempo hasta la positividad y aumenta la detección de bacterias aerobias y levaduras respecto al cultivo en agar convencional (42). Por tanto, se recomienda incubar los cultivos al menos 10 días, especialmente si se sospecha de *C. acnes*, e incluir siempre caldos de enriquecimiento anaerobios y/o frascos de hemocultivo.

7. 8. CRITERIOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y PROCEDIMIENTOS ADICIONALES

7.8.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram del LCR es útil cuando es positiva, pero tiene una sensibilidad menor para la infección del SNC asociada a derivaciones que para la meningitis bacteriana comunitaria. Sólo el 20% de los pacientes con ventriculitis y meningitis asociadas a la asistencia sanitaria obtuvieron una tinción de Gram positiva en el LCR (41). No obstante, la tinción proporciona una información diagnóstica rápida que permite orientar el tratamiento antibiótico y en caso de no viabilidad de los microorganismos por el tratamiento antimicrobiano, permite valorar con mayor confianza los resultados de las técnicas genómicas para el diagnóstico.

7.8.2 Cultivos de LCR

El cultivo del LCR suele considerarse la prueba de referencia para el diagnóstico de las infecciones del SNC asociadas a la asistencia sanitaria y a dispositivos, pero puede ser negativo en el 23% al 78% de los pacientes con infecciones definidas por otros criterios (41).

Los cultivos positivos únicamente en los caldos de enriquecimiento (caldo de tioglicolato o frasco de hemocultivo) deben interpretarse en el contexto de la probabilidad clínica de infección, ya que a menudo representan colonización bacteriana o contaminación (40). Además, las bacterias poco virulentas como *C. acnes*, *Corynebacterium* spp., o estafilococos coagulasa negativo, deben ser considerados como posibles agentes etiológicos de la infección. Es necesario realizar una nueva punción para comprobar que se repite el aislamiento, a fin de diferenciar entre contaminación, colonización e infección de la derivación.

7.8.3 Cultivos del catéter de derivación

En caso de cultivo del dispositivo explantado, no existe un estándar universal de procesamiento ni están definidos puntos de corte para determinar colonización o infección. Los cultivos de los dispositivos, al igual que el LCR, si son negativos se recomienda mantener la incubación durante al menos 10 días para identificar *C. acnes*.

7.8.4 Técnicas moleculares

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos en el LCR o líquido de sonicación pueden aumentar la capacidad de identificar los microorganismos y reducir el tiempo necesario para realizar un diagnóstico etiológico. Entre las técnicas utilizadas se encuentran la PCR del gen del ARNr 16S o 18S o dirigida, los paneles multiplex recomendados en hemocultivos positivos utilizados fuera de ficha técnica y la secuenciación metagenómica. Estas técnicas permiten detectar bacterias, genes asociados a resistencias, virus, hongos y parásitos, incluso cuando los cultivos convencionales son negativos o el paciente ya ha recibido antibióticos. El LCR ventricular ha mostrado un mayor número de resultados falsos negativos respecto al LCR lumbar cuando se utilizan PCR dirigidas a bacterias, debido a gradientes fisiológicos y a una menor carga bacteriana en el compartimento ventricular. Por ello, se debe considerar el empleo de técnicas moleculares para mejorar el diagnóstico por cultivo, pero evitando utilizarlas para descartar la infección.

7.8.5 Detección de antígeno

La detección de β -D-glucano y galactomanano en el LCR puede ser útil para diagnosticar la ventriculitis y la meningitis fúngicas asociadas a derivaciones. Sin embargo, es necesario realizar una evaluación más exhaustiva del LCR, ya que las técnicas comercializadas no lo establecen como una muestra validada. Su especificidad es inferior a la del suero, lo que puede requerir cambios en los puntos de corte.

8. ABSCESO CEREBRAL

8. 1. INTRODUCCIÓN

El absceso cerebral es una colección purulenta encapsulada dentro del parénquima cerebral. Se trata de una infección potencialmente mortal y con un riesgo elevado de déficits neurológicos en los supervivientes (43). La incidencia anual de absceso cerebral se estima entre 0,4 y 1,3 casos por 100.000 habitantes, lo que representa aproximadamente 6700 casos al año en Europa (43). A lo largo del último siglo, tanto la epidemiología como el abordaje terapéutico han experimentado cambios sustanciales.

Los factores de riesgo también han evolucionado con el tiempo. Clásicamente predominaban los traumatismos craneoencefálicos, las cardiopatías congénitas y las infecciones óticas crónicas. En las últimas décadas, sin embargo, las infecciones dentales y la inmunodepresión se han consolidado como las principales condiciones predisponentes (43).

8. 2. EPIDEMIOLOGÍA

Los patógenos más habituales en abscesos cerebrales adquiridos en la comunidad son bacterias de la cavidad oral, especialmente el grupo *Streptococcus anginosus*, *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. y *Aggregatibacter* spp., asociados con infecciones dentales o procesos crónicos del oído (43). Estas infecciones son polimicrobianas con frecuencia e incluyen bacterias anaerobias como *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., entre otros. En contextos específicos se identifican *S. aureus* y bacilos Gram negativos en abscesos postneuroquirúrgicos; *M. tuberculosis* en zonas endémicas; y patógenos oportunistas como *Nocardia* spp., hongos (*C. neoformans*, *mucormicosis*, *Candida* spp.) o parásitos (*Toxoplasma gondii*) en pacientes inmunodeprimidos. En el caso de *Toxoplasma gondii*, las lesiones en pacientes con sida suelen manifestarse como masas cerebrales más que como verdaderos abscesos supurados. Asimismo, enterobacteriales y *P. aeruginosa* pueden originar abscesos por contigüidad desde focos óticos, tras bacteriemias o un procedimiento neuroquirúrgico. En los países de bajos y medianos ingresos, se describen causas menos frecuentes como *Taenia solium*, responsable de neurocisticercosis, o protozoos como *Trypanosoma cruzi* y *Entamoeba histolytica*.

8. 3. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

El absceso cerebral continúa siendo una enfermedad de difícil abordaje terapéutico, con el drenaje neuroquirúrgico y el uso de altas dosis de antibióticos como bases del tratamiento. La situación puede complicarse por las resistencias antimicrobianas según epidemiología local y el riesgo de toxicidad farmacológica asociada a tratamientos prolongados. El absceso cerebral conlleva un alto riesgo de muerte, con tasas de mortalidad anuales del 20% y con secuelas en aproximadamente en el 70% de los pacientes, predominantemente en forma de déficits neurológicos y epilepsia (43).

El origen del absceso cerebral es diverso, el principal es debido a la extensión por contigüidad desde focos próximos de infección, especialmente localizados en oído medio, mastoides, senos paranasales, y focos odontógenos. Estos abscesos se localizan fundamentalmente en el lóbulo temporal o en el cerebelo. En un segundo lugar, los abscesos se producen por la diseminación hematógena originada a partir de infecciones pulmonares, cardiopatías congénitas con *shunt* derecha-izquierda, infecciones dentales o endocarditis bacteriana. En este contexto, se observa la formación de múltiples abscesos, localizados principalmente en el área de distribución de la arteria cerebral media, específicamente en la unión corticosubcortical. En tercer lugar, se encuentra la inoculación directa, que es consecuencia de traumatismos craneales o de procedimientos neuroquirúrgicos.

Las manifestaciones clínicas y los signos neurológicos de los pacientes con absceso cerebral varían en función de la localización, el tamaño, el número de lesiones, el estado inmunitario y la capacidad patógena 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 suelen 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, presente en el 70% de los casos. La fiebre aparece en menos de la mitad de los pacientes, las crisis convulsivas en un 25-45% y más de la mitad presentan déficits neurológicos focales. El edema de papila y la rigidez de nuca se observan solo en el 25% de los casos.

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

Técnicas de imagen

Las técnicas de imagen recomendadas para diferenciar abscesos bacterianos de tumores o lesiones necróticas son la RM cerebral, incluyendo RM de difusión (DWI/ADC) e imágenes ponderadas en T1 con y sin gadolinio. La RM cerebral permite el diagnóstico inicial de forma precoz y proporciona información para el planteamiento terapéutico inicial y el seguimiento.

El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la RM para diferenciar un absceso cerebral de un tumor son del 88% y el 90% (43) respectivamente. En ocasiones, algunos pacientes con abscesos cerebrales pequeños y/o un patógeno ya conocido se tratan de forma conservadora, sin necesidad de aspiración ni escisión. Sin embargo, un enfoque conservador puede provocar un retraso potencial en el diagnóstico de 2 a 8 semanas en pacientes con tumores cerebrales, mientras se espera la respuesta radiológica a los antimicrobianos empíricos.

La aspiración o escisión neuroquirúrgica no suele ser necesaria antes de iniciar el tratamiento empírico de la toxoplasmosis en pacientes seropositivos para el VIH y con lesiones cerebrales múltiples y bilaterales que realzan en anillo en la RM (señal hiperintensa con un centro hipointenso).

El diagnóstico microbiológico es crucial para garantizar el éxito del tratamiento de los abscesos cerebrales, ya que permite determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos y orientar el tratamiento. Los procedimientos neuroquirúrgicos se han perfeccionado mediante técnicas mínimamente invasivas guiadas

por imagen o estereotácticas, que permiten la aspiración de pequeños abscesos cerebrales localizados en la profundidad del cerebro (43). El riesgo de la cirugía del absceso cerebral varía desde moderado a alto, con posibles complicaciones como la diseminación de la infección, daño neurológico, o recurrencia del absceso (44).

8. 4. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La aspiración o escisión neuroquirúrgica del absceso puede confirmar el diagnóstico, identificar el patógeno, realizar las técnicas de sensibilidad a antimicrobianos y disminuir la carga bacteriana intracavitaria para control del foco. Por lo tanto, se recomienda la aspiración o escisión del absceso cerebral siempre que sea factible, excepto en los casos con pruebas de imagen y microbiológicas compatibles con la toxoplasmosis. La recogida debe realizarse en una jeringa o contenedor estéril y evitar el uso de hisopos.

En pacientes sin enfermedad grave, se puede suspender la administración de antimicrobianos hasta la aspiración o la escisión del absceso cerebral, siempre y cuando la neurocirugía pueda realizarse en un plazo razonable, preferiblemente en las 24 horas siguientes al diagnóstico radiológico. Un metaanálisis muestra que el diagnóstico microbiológico se logró en el 80% de los pacientes que retuvieron los antimicrobianos, en comparación con el 33% de los que iniciaron los antimicrobianos antes de la aspiración o escisión neuroquirúrgica (43).

El LCR excepcionalmente es positivo y la punción lumbar generalmente está contraindicada debido al riesgo de herniación. Los hemocultivos presentan resultados positivos en casos de bacteriemia asociada a abscesos hematógenos o a la ruptura de un absceso.

8. 5. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El LCR excepcionalmente es positivo y la punción lumbar generalmente está contraindicada debido al riesgo de herniación. Los hemocultivos presentan resultados positivos en casos de bacteriemia asociada a abscesos hematógenos o a la ruptura de un absceso.

8.6. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

La llegada de un absceso cerebral debe conllevar un aviso para el procesamiento urgente del cultivo. No se rechazará ni se demorará el procesamiento de la muestra por cuestiones menores, sin consultar previamente con el clínico solicitante.

8.7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

8.7.1 Procesamiento

El procesamiento rápido y la siembra en medios de cultivo adecuados son esenciales para obtener un diagnóstico etiológico completo. Por ello, el cultivo del absceso cerebral es urgente y prioritario debido a la pérdida de viabilidad de los microorganismos. Es necesario realizar la tinción de Gram debido a la repercusión clínica que supone el diagnóstico de una infección. El envío de torundas o hisopos no está recomendado. En caso de envío es preferible inocular la torunda en 0,5 ml de caldo de tioglicolato y sembrar a partir de este medio.

Se recomienda el fraccionamiento en alícuotas, siempre y cuando se disponga de un volumen suficiente, para cultivos de hongos, micobacterias o técnicas moleculares. Las guías clínicas establecen el empleo de técnicas moleculares (PCR ARNr 16S o 18S, *T. gondii*) en pacientes con cultivos iniciales negativos.

8.7.2 Selección de medios y condiciones de incubación

En función del volumen de la muestra, se priorizará la siembra de un mayor o menor número de medios de cultivo en la muestra de absceso cerebral. Es imprescindible sembrar medios no selectivos en atmósfera aerobia (agar sangre, agar chocolate) y anaerobia (agar Schaedler para anaerobios, caldo de enriquecimiento

de tioglicolato). Si no se ha podido suspender el tratamiento con antibióticos antes de la toma de muestra, es recomendable inocular frascos de hemocultivos (aerobios y anaerobios). Los medios selectivos, como el medio MacConkey y colistina-nalidixico (CNA) en atmósfera aerobia, el medio LKV (*Laked Blood Kanamicina Vancomicina*) en atmósfera anaerobia, son recomendables, sobre todo si en la observación de la tinción de Gram se visualizan bacterias Gram positivas y negativas.

La incubación de los medios aerobios se realizará durante 5 días y la de los medios anaerobios durante 7 días. Los cultivos deben revisarse diariamente, excepto los del agar Schaedler para buscar bacterias anaerobias estrictas. En estos últimos, la primera lectura se realizará tras 48 horas y otra al término del periodo de incubación, con el objetivo de evitar la exposición prolongada al oxígeno y la muerte de las bacterias.

El estudio microbiológico del material del absceso debe incluir una tinción de Gram y otros cultivos, según las características del paciente. En pacientes con algún biomarcador positivo de enfermedad fúngica invasiva e inmunosupresión, se realizará el cultivo de hongos (agar Sabouraud con cloranfenicol), a diferentes temperaturas: 25-30 °C y 35-37 °C, en atmósfera aerobia y con un tiempo de incubación de 3 semanas. El cultivo de micobacterias (MGIT™, Löwenstein-Jensen o similar) se realizará en atmósfera aerobia durante 6 semanas. En caso de sospecha de *Nocardia* spp. se deben prolongar los cultivos bacteriológicos a 4 semanas.

8.8. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

8.8.1 Tinción de Gram

El resultado de la tinción de Gram debe notificarse de forma inmediata al clínico, con el fin de orientar el tratamiento antibiótico. La sensibilidad de la tinción de Gram es elevada (>75%) en muestras de abscesos cerebrales. La observación de morfotipos bacterianos o la ausencia de microorganismos debe ser informada en conjunto con la presencia de polimorfonucleares. En caso de visualización de levaduras o elementos fúngicos y si existe cantidad suficiente, se puede plantear la realización de una tinción con calcofluor para confirmar el elemento fúngico y observar la producción de pseudohifas o hifas con o sin tabiques.

En caso de sospecha de *Nocardia* spp. o micobacterias se pueden considerar la tinción de Ziehl-Neelsen o modificada. En el caso de que la muestra sea insuficiente, se priorizarán los cultivos de micobacterias o prolongar los cultivos bacteriológicos.

La tinción de Gram permite correlacionar los morfotipos bacterianos con los aislamientos en cultivo, permitiendo la valoración de aislamientos que crecen solo en caldo. Asimismo, orienta la siembra de determinados medios de cultivo, la prolongación del tiempo de incubación, entre otras condiciones del cultivo.

8.8.2 Cultivos

El cultivo del absceso cerebral es el método definitivo para el diagnóstico etiológico. La sensibilidad del cultivo es cercana al 90%. Esta sensibilidad puede verse limitada en el caso de microorganismos fastidiosos o en presencia de un tratamiento antimicrobiano previo. Por ello, el cultivo no excluye una etiología infecciosa. En el caso de cultivos negativos y persistencia de la sospecha clínica, se recomienda la realización de técnicas moleculares sobre la muestra de absceso. Incluso si clínicamente existe sospecha de una etiología fúngica o por patógenos oportunistas, se procederá a la realización de cultivos de micobacterias y hongos. Todo microorganismo aislado debe identificarse e informarse de forma preliminar al clínico. Debe realizarse identificación y antibiograma en cualquier aislado y evaluar posteriormente si su crecimiento se limita únicamente al caldo de enriquecimiento, ya que existe la posibilidad de que se trate de un contaminante durante la recogida de muestra o el procesamiento. Las colonias que crecen alejadas de las estrías o que pertenecen a la microbiota cutánea o ambiental (*S. epidermidis*, *Micrococcus* spp. etc.) requieren una valoración cuidadosa.

8.8.3 Técnicas serológicas

El diagnóstico presuntivo de la neurotoxoplasmosis se realiza principalmente mediante técnicas serológicas, constituyendo la técnica más ampliamente utilizada. Los pacientes deben presentar signos clínicos compatibles, una o más lesiones masivas en las neuroimágenes y una respuesta radiológica inequívoca a 10-14 días de tratamiento empírico contra el toxoplasma o la presencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii* en suero sin otro diagnóstico alternativo.

La neurotoxoplasmosis en pacientes con sida ocurre como consecuencia de la reactivación de una infección latente. En más del 90% de los pacientes, se presentan títulos de IgG antitoxoplasma positivos y elevados. La seronegatividad de IgG puede estar asociada a diversas condiciones, entre las que se incluyen la infección primaria, la reactivación de la enfermedad latente en individuos incapaces de producir anticuerpos detectables o la realización de pruebas con ensayos de sensibilidad reducida (45).

8.8.4 Técnicas moleculares

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos o la secuenciación genómica se han empleado en muestras de abscesos cerebrales y LCR para aumentar el rendimiento diagnóstico y reducir el tiempo hasta el diagnóstico microbiológico de días a horas. Este enfoque puede orientar la selección de antimicrobianos tanto en fases tempranas como posteriores, en caso de fracaso del tratamiento u otras circunstancias que requieran la modificación del tratamiento. Se recomienda su utilización en caso de cultivos negativos, tanto si se observa o no microorganismos en el Gram.

El empleo de PCR convencional de los genes ARNr 16S y/o 18S con secuenciación Sanger amplía el número de patógenos identificados, particularmente bacterias anaerobias de la cavidad oral y unos pocos casos de *Nocardia* spp. en comparación con el cultivo (43). La secuenciación Sanger presenta la limitación de no poder identificar agentes patógenos en el contexto de infecciones polimicrobianas. Este inconveniente puede superarse mediante el empleo de la secuenciación masiva de nueva generación y en concreto con *shotgun metagenomics*. No obstante, los estudios publicados sobre estas técnicas varían en la metodología técnica, kits disponibles, criterios de inclusión y exclusión de pacientes, entre otros.

Actualmente existe una tendencia de emplear técnicas de PCR multiplex recomendadas para hemocultivos positivos (BIOFIRE® BCID2) en otras muestras fuera de especificaciones de la ficha técnica, como es el absceso cerebral. Esta práctica es más accesible en los laboratorios asistenciales, pero tiene dianas muy limitadas para bacterias anaerobias y está asociada a costes elevados, atribuibles al costo de la tecnología en sí misma.

En el caso de la neurotoxoplasmosis, el diagnóstico definitivo se realiza mediante ensayos de amplificación de ácidos nucleicos u observación microscópica en la biopsia cerebral en pacientes con síndrome clínico compatible y lesión cerebral focal en las neuroimágenes (46). La PCR en tiempo real de *T. gondii* muestra una especificidad elevada y una sensibilidad aproximada del 50%.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. GBD 2019 Meningitis Antimicrobial Resistance Collaborators. Global, regional, and national burden of meningitis and its aetiologies, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol*. 2023 Aug;22(8):685-711. doi: 10.1016/S1474-4422(23)00195-3. PMID: 37479374; PMCID: PMC10356620.
2. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 May;18(5):459-480. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30879893; PMCID: PMC6459001.
3. WHO. Meningitis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/meningitis> accessed 1 october 2025
4. WHO. Defeating meningitis by 2030: a global road map. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240026407> accessed 1 october 2025
5. Rozman Borstnar, C., & Cardellach, F. (Eds.). (2024). Farreras Rozman. *Medicina Interna* (20ª ed.). Barcelona: Elsevier. Sección XVII, capítulo sobre meningitis bacteriana.
6. Roos KL, Tyler KL. Acute Meningitis. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 21st ed. New York: McGraw-Hill; 2022. Chapter 133.
7. van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):44-53.
8. Vila J, Bosch J, Muñoz-Almagro C. Molecular diagnosis of the central nervous system (CNS) infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021 Oct;39(8):403-410. doi: 10.1016/j.eimce.2020.03.008. PMID: 34620475.
9. Amidu N, Antuamwine BB, Addai-Mensah O, Abdul-Karim A, Stebleson A, Abubakari BB, Abenyeri J, Opoku AS, Nkukah JE, Najibullah AS. Diagnosis of bacterial meningitis in Ghana: Polymerase chain reaction versus latex agglutination methods. *PLoS One*. 2019 Jan 17;14(1):e0210812.
10. Leber AL, Burnham C-AD, eds. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023. Section: Aerobic Bacteriology.
11. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H, Schreckenberger PC, DesJarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven NL, Carroll KC, Miller JA, Dien Bard J, Mestas J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2251-61. doi: 10.1128/JCM.00730-16. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27335149; PMCID: PMC5005480.
12. Launes C, Camacho J, Pons-Espinal M, López-Labrador FX, Esteva C, Cabrerizo M, Fernández-García MD, Fogeda M, Masa-Calles J, López-Perea N, Echevarría JE, Muñoz-Almagro C, Tarragó D. Hybrid capture shotgun sequencing detected unexpected viruses in the cerebrospinal fluid of children with acute meningitis and encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2024 May;43(5):863-873. doi: 10.1007/s10096-024-04795-x. Epub 2024 Mar 4. PMID: 38438704; PMCID: PMC11108891.
13. Gundamraj V, Hasbun R. Viral meningitis and encephalitis: an Update. *Curr Opin Infect Dis* 2023; 36:177–185.
14. Garber B, Glauser J. Viral meningitis and encephalitis Update. *Curr Emerg Hosp Med Rep* 2024; 12:95–102.
15. Pons Espinal M, Lopez-Perea N, Masa Calles J, Muñoz Almagro C, Tárrego D, Launes C. Trends in paediatric viral meningitis and encephalitis with unconfirmed aetiology: a Spanish population-based study, 2016–2020. *Acta Paediatr* 2025; 114(9):2298–2305.
16. Toomey D, Phan TL, Phan T, Hill JA, Zerr DM. Viral encephalitis after hematopoietic cell transplantation: a systematic review. *Transplant Cell Ther* 2023; 29(10):636.e1–636.e9.
17. De la Calle-Prieto F, Arsuaga M, Rodríguez-Sevilla G, Sandoval Paiz N, Díaz-Menéndez M. The current status of arboviruses with major epidemiological significance in Europe. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2024; 42(9):516–526.
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). VNO Nile Virus and Other Arboviral Diseases — United States, 2022. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 2023; 72(34):901–908.
19. WHO guidelines on meningitis diagnosis, treatment and care. Geneva: World Health Organization; 2025. PMID: 40393410.
20. Xu H, Chen P, Guo S, Shen X, Lu Yun. Progress in etiological diagnosis of viral meningitis. *Front Neurol* 2023; 14:1193834.
21. Matthews R, Sargent BF, McKeever S, Huang Y, Ellul MA, Micael BD. Viral encephalitis—update on pathogenesis and treatment. *Curr Opin Neurol* 2025; 38:388–396.
22. Liu BM, Mulkey SB, Campos JM, DeBiasi RL. Laboratory diagnosis of CNS infections in children due to emerging and re-emerging neurotropic viruses. *Pediatr Res* 2024; 95:543–550.
23. Alam AM, Houlihan CF, Bharucha T. Novel techniques for the diagnosis of neurological infections. *Curr Opin Neurol* 2025; 38:414–421

24. Venkatarreddy MP, Upadhya D, Yegneswaran PP, Varghese A, Pahadasingh S, Prabhu AN, Kavitha Saravu K, Shettigar KS. Molecular diagnostic methods for rapid diagnosis of central nervous system infections. *Front Med Technol* 2025; 7:1497512.
25. Su LD, Chiu CY, Gaston D, Hogan CA, Miller S, Simon DW, Thakur KT, Yang S, Piantadosi A. Clinical metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of central nervous system infections: advances and challenges. *Mol Diagn Ther* 2024; 28(5):513–523.
26. Chiu CY, López-Labrador FX, Wilson MR, de Vries JJC. The Regulatory Landscape for Clinical Metagenomic Testing. *JAMA Neurol.* 2025 Apr 7.
27. Huynh J, Donovan J, Phu NH, Nghia HDT, Thuong NTT, Thwaites GE. Tuberculous meningitis: progress and remaining questions. *Lancet Neurol.* 2022 May;21(5):450–64.
28. Lourens R, Singh G, Arendse T, Thwaites G, Rohlwink U. Tuberculous Meningitis Across the Lifespan. *J Infect Dis.* 2025 Jun 2;231(5):1101–11.
29. Wilkinson RJ, Rohlwink U, Misra UK, van Crevel R, Mai NTH, Dooley KE, et al. Tuberculous meningitis. *Nat Rev Neurol.* 2017 Oct 8;13(10):581–98.
30. Geneva: World Health Organization. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis. 2025.
31. Olie SE, Andersen CØ, van de Beek D, Brouwer MC. Molecular diagnostics in cerebrospinal fluid for the diagnosis of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2024 Dec 10;37(4).
32. Thuong NTT, Vinh DN, Hai HT, Thu DDA, Nhat LTH, Heemskerk D, et al. Pretreatment Cerebrospinal Fluid Bacterial Load Correlates With Inflammatory Response and Predicts Neurological Events During Tuberculous Meningitis Treatment. *J Infect Dis.* 2019 Feb 23;219(6):986–95.
33. Li Z, Pan L, Lyu L, Li J, Jia H, Du B, et al. Diagnostic accuracy of droplet digital PCR analysis of cerebrospinal fluid for tuberculous meningitis in adult patients. *Clinical Microbiology and Infection.* 2020 Feb;26(2):213–9.
34. Wang S, Chen Y, Wang D, Wu Y, Zhao D, Zhang J, et al. The Feasibility of Metagenomic Next-Generation Sequencing to Identify Pathogens Causing Tuberculous Meningitis in Cerebrospinal Fluid. *Front Microbiol.* 2019 Sep 3;10.
35. Correia-Neves M, Frøberg G, Korshun L, Viegas S, Vaz P, Ramanlal N, et al. Biomarkers for tuberculosis: the case for lipoarabinomannan. *ERJ Open Res.* 2019 Feb;5(1):00115–2018.
36. Kwizera R, Cresswell F V., Mugumya G, Okirwoth M, Kagimu E, Bangdiwala AS, et al. Performance of Lipoarabinomannan Assay using Cerebrospinal fluid for the diagnosis of Tuberculous meningitis among HIV patients. *Wellcome Open Res.* 2019 Sep 30;4:123.
37. Chang CC, Harrison TS, Bicanic TA, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Warris A, et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. *Lancet Infect Dis.* 2024 Aug;24(8):e495–512.
38. Zhao Y, Ye L, Zhao F, Zhang L, Lu Z, Chu T, et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infect Dis Poverty.* 2023 Mar 17;12(1):20.
39. Pana A, Vijayan V, Anilkumar AC. Amebic Meningoencephalitis. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan 21, 2023.
40. Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, Byers K, Kaplan SL, Scheld WM, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis*. *Clinical Infectious Diseases.* 2017 Mar 15;64(6):e34–65.
41. Martin RM, Zimmermann LL, Huynh M, Polage CR. Diagnostic Approach to Health Care- and Device-Associated Central Nervous System Infections. *J Clin Microbiol.* 2018 Nov;56(11).
42. Calderaro A, Martinelli M, Montecchini S, Motta F, Covan S, Larini S, et al. Higher recovery rate of microorganisms from cerebrospinal fluid samples by the BACTEC culture system in comparison with agar culture. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Apr;84(4):281–6.
43. Bodilsen J, D'Alessandris QG, Humphreys H, Iro MA, Klein M, Last K, et al. European society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases guidelines on diagnosis and treatment of brain abscess in children and adults. *Clinical Microbiology and Infection.* 2024 Jan;30(1):66–89.
44. Brouwer MC, Tunkel AR, McKhann GM, van de Beek D. Brain Abscess. *New England Journal of Medicine.* 2014 Jul 31;371(5):447–56.
45. National Institutes of Health HMA and IDS of America. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-opportunistic-infection>. 2025. Panel on Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV.
46. Dian S, Ganiem AR, Ekawardhani S. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: a review. *Pathog Glob Health.* 2023 Jan 2;117(1):14–23.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 13

PNT-SNC-01

Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR 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 / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 13

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este procedimiento es describir el procesamiento microbiológico de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenidas por punción lumbar o a través de sistemas de derivación (internos o externos), para el diagnóstico etiológico de infecciones del sistema nervioso central (SNC), así como los criterios de interpretación de los cultivos y diagnóstico molecular de bacterias, micobacterias y hongos. Se enfatiza la necesidad de un diagnóstico rápido y preciso dada la gravedad de estas infecciones.

2. FUNDAMENTO

Las meningitis agudas suelen estar producidas por microorganismos piógenos, a menudo adquiridos en la comunidad. En adultos, los patógenos más frecuentes incluyen *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*, mientras que en neonatos predominan *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) y *Escherichia coli*, entre otros. Las infecciones relacionadas con sistemas de derivación de LCR (derivaciones ventrículo-peritoneales, ventrículo-atriales, derivaciones externas, etc.) conllevan alta morbilidad y mortalidad, ocurriendo generalmente en contextos hospitalarios o perioperatorios. En estas derivaciones son comunes los estafilococos coagulasa-negativos y *Cutibacterium acne* (*C. acnes*), de origen cutáneo, que a menudo causan cuadros subagudos de difícil diagnóstico. Algunos de estos agentes presentan requerimientos especiales (crecimiento lento y/o atmósferas específicas), por lo que es imprescindible conocer la sospecha clínica y la procedencia de la muestra para adaptar el procesamiento y asegurar su aislamiento. El diagnóstico de certeza de meningitis o ventriculitis se establece únicamente cuando, en un contexto clínico sugestivo y con alteraciones citoquímicas compatibles en el LCR, se logra detectar un microorganismo patógeno mediante cultivo u otro método microbiológico directo. En este procedimiento se describe el método para el procesamiento adecuado de LCR obtenidos por punción lumbar y a través de derivaciones.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Van de Beek D, Cabellos C, Dzubova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Infect. 2016 May;22(Suppl 3):S37–62. doi:10.1016/j.cmi.2016.01.007.
- Tunkel AR et al. 2017. IDSA Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Clin Infect Dis 64(6):e34-e65. DOI: 10.1093/cid/ciw861
- Sánchez-Romero MI (coord.). 2018. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en Microbiología. 2ª ed. Procedimientos Microbiología SEIMC.
- Carroll KC, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology. 13th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Sep 13.
- Leber AL, Burnham CAD, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Mar 21.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

Cada muestra debe ir acompañada de una petición correctamente cumplimentada y registrada electrónicamente, incluyendo: datos demográficos del paciente (nombre completo, edad, número de historia clínica),

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 13

fecha de la solicitud, servicio de procedencia y datos del facultativo solicitante. Deben constar las características de la muestra (tipo de muestra y técnica de obtención), los estudios microbiológicos solicitados (cultivo, tinción de Gram, diagnóstico molecular, etc.) y la información clínica relevante (diagnóstico de sospecha, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo, presencia de un dispositivo de derivación u otros datos que orienten el procesamiento).

4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Siempre que sea posible, la muestra debe obtenerse antes de iniciar la terapia antimicrobiana. La punción lumbar se realizará con asepsia rigurosa: tras limpiar la piel en la zona de punción ($\approx 10 \text{ cm}^2$) con alcohol, se aplicará un antiséptico apropiado (povidona yodada o clorhexidina alcohólica). Las guías actuales recomiendan clorhexidina alcohólica al 2% (o al 0,5% como mínimo), dejándola actuar al menos 1 minuto y asegurando que seque completamente antes de la punción, evitando su introducción en el canal raquídeo por riesgo de neurotoxicidad. La punción se realizará en el espacio intervertebral L3-L4, L4-L5 o L5-S1. El LCR se recogerá en tubos estériles; siempre que sea posible se obtendrán al menos dos tubos: uno para análisis citoquímico y otro para estudio microbiológico, seleccionando el tubo más turbio (o con mayor volumen) para microbiología. En el caso de derivaciones externas, el LCR se obtendrá a través del catéter ventricular o lumbar bajo máximas condiciones de asepsia, aplicando antiséptico en la conexión tanto antes como después de la toma. En derivaciones internas, el LCR se obtiene por punción del reservorio o válvula (o mediante catéter distal externalizado, si lo hubiere), empleando igualmente técnica estéril para evitar iatrogenia o contaminación de la muestra. Si se retira un sistema de derivación por sospecha de infección, se recomienda enviar también sus componentes (catéter, reservorio, válvulas) para cultivo microbiológico, ya que la evidencia indica que cultivar el material del *shunt* retirado mejora la detección del patógeno en infecciones asociadas a derivaciones. El LCR extraído debe depositarse en un recipiente estéril con tapa de rosca hermética. En pacientes pediátricos, o cuando el volumen obtenible sea muy limitado, se deben priorizar las pruebas según la sospecha clínica, procurando remitir la máxima cantidad posible de LCR al laboratorio (Tabla S1).

Tabla S1. Volumen de LCR mínimo recomendado para los distintos patógenos implicados ^a.

Categoría	Técnica / Medio de cultivo	Volumen recomendado (mL)
1. Bacterias típicas	tinción, cultivo, pruebas moleculares, antígeno	1,5
2. Micobacterias	cultivo, pruebas moleculares	6,0
3. Hongos	cultivo, antígeno, tinta china, calcoflúor	1,0–3,0
4. Patógenos especiales ^b	cultivo, pruebas moleculares, antígeno	1,0–10,0

^a Adaptada de: Leber AL, Burnham CAD, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Mar 21.

^b *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp, *Leptospira* spp, *Treponema* spp, *Acanthamoeba*, Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, etc.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 13

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El LCR es una muestra de procesamiento urgente; debe enviarse inmediatamente en persona al laboratorio, evitando el uso del tubo neumático de transporte para evitar extravíos, derrames y otro tipo de incidencias. Una vez recibida, requiere realizar rápidamente la tinción de Gram e inocular la muestra en los medios de cultivo correspondientes. Si hubiera un retraso inevitable en el procesamiento, mantener el LCR a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (en estufa) o a temperatura ambiente; nunca refrigerar la muestra antes del cultivo, pues el frío disminuye la viabilidad de patógenos como el meningococo o *Haemophilus* spp. El transporte debe realizarse en condiciones seguras (recipiente hermético dentro de una bolsa de transporte), respetando las normativas de bioseguridad vigentes. Para el estudio molecular (paneles sindrómicos o PCR específica) las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente, en nevera o congeladas. En muestras hemáticas no congelar.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Son criterios de rechazo relativos (dado el carácter crítico de la muestra) los siguientes:

- Identificación incorrecta o incompleta de la muestra y/o de la solicitud (p. ej., etiquetado erróneo que impida la identificación inequívoca del paciente). Se contactará con el servicio remitente para subsanar los errores de identificación, cuando ello sea posible.
- Conservación inadecuada de la muestra (p. ej., refrigeración del LCR, o uso de un medio de transporte no apropiado).
- Muestra derramada o con fuga significativa. En caso de derrame que implique posible contaminación, no se debe descartar automáticamente la muestra sin consultar al clínico; se valorará procesarla con las debidas precauciones e informar sobre la posible contaminación en el informe de resultados.

Nota: Dada la urgencia clínica asociada a estas muestras, no se debería rechazar ninguna muestra de LCR sin antes discutirlo con el médico solicitante. Si una muestra llega en condiciones subóptimas, pero potencialmente utilizables, el laboratorio debe intentar igualmente su procesamiento (Gram, cultivo o PCR) tomando las precauciones necesarias, y dejar constancia de las incidencias (por ejemplo: "muestra procesada con potencial contaminación por derrame") en el informe preliminar. También debe discutirse con el médico solicitante la priorización de pruebas si el volumen recibido es insuficiente.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar sangre: agar sangre de carnero al 5%, medio enriquecido para bacterias comunes.
- Agar chocolate: agar sangre hemolizada, útil para favorecer el crecimiento de *Neisseria* spp. o *Haemophilus* spp.
- Caldo de enriquecimiento (p. ej., caldo tioglicolato): útil para recuperación de aerobios y anaerobios, especialmente ante recuentos bajos.
- Medios específicos según sospecha clínica: si se sospecha infección fúngica, inocular en agar Sabouraud Cloranfenicol u otro medio para hongos; si se sospecha meningitis tuberculosa (u otra por micobacterias), procesar el LCR en sistemas de cultivo para *Mycobacterium* spp. (p. ej., caldo MGIT™).

Nota: Los medios comerciales deben contar con controles de calidad de fábrica; ver sección 7.4.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 13

5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA TINCIÓN DE GRAM Y CULTIVO

- Colorantes para tinción de Gram: todos los componentes necesarios para la tinción de Gram (cristal vio-leta, lugol, alcohol-acetona, safranina).
- Tinta china para *Cryptococcus neoformans/gattii*. Blanco de calcoflúor para hongos.
- Sistemas generadores de atmósferas especiales: sistemas para generar atmósfera con 5–7% de CO₂ (incubadores con CO₂), necesarios para incubación de agar chocolate y otros medios enriquecidos y sistemas de anaerobiosis (sobres generadores, jarras anaerobias, cámaras anóxicas, según disponibilidad).
- Material de microscopía: portaobjetos y cubreobjetos de calidad óptica, aptos para realizar citocentrifugación y posteriores tinciones.
- Consumibles para citocentrifuga: papeles secantes/filtros absorbentes y embudos o cámaras de citocen-trifugación estériles de un solo uso para la concentración de la muestra en el portaobjetos.

5.3. DETECCIÓN MOLECULAR

Aunque las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) constituyen una herramienta esencial en el diagnóstico de la meningoencefalitis de origen viral (véase PNT específico), en los últimos años se han incorporado de forma generalizada para la detección de patógenos del SNC de origen bacteriano o fúngico. En concreto, la detección molecular de *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) y de las principales mutaciones asociadas a resistencia a fármacos antituberculosos, ha permitido acortar significativamente los tiempos de respuesta e incluso disponer de opciones de diagnóstico rápido. Paralelamente, el desarrollo de paneles sindrómicos multiplex ha supuesto un avance relevante en el diagnóstico urgente de las meningitis, al posibilitar la detección simultánea y rápida de los principales patógenos implicados en estas infecciones.

• **5.3.1. PCR dirigida.** Si bien eventualmente existe la posibilidad de diseñar TAAN frente a cualquier bacteria patógena del SNC, en la práctica clínica su uso se restringe a casos muy concretos donde su rentabilidad esté justificada. En este sentido, la meningitis tuberculosa es un desafío diagnóstico por la baja carga bacilar en LCR y la lentitud del cultivo convencional, lo que apoya el uso de TAAN en este contexto. Actualmente se dispone de diversos kits comerciales para MTC en LCR, como GenoType MTBDR® (*Hain Lifescience*) o BD MAX MDR-TB® (Becton Dickinson). Además, destacan aquellas con enfoque *point of care*, como el sistema GeneXpert® MTB/RIF Ultra (Cepheid), recomendado por la OMS como test inicial ante sospecha de meningitis tuberculosa. Este sistema automatizado realiza extracción y PCR en tiempo real en cartucho cerrado en 90 minutos, con detección simultánea de MTC y de mutaciones de resistencia a rifampicina y con un límite de detección de 15 UFC/mL.

• **5.3.2. Paneles sindrómicos.** En los últimos años se han desarrollado plataformas completamente automatizadas que permiten la detección simultánea de múltiples patógenos del SNC a partir de una única muestra de LCR. Estas soluciones integran en una misma reacción la identificación de varios virus, bacterias y hongos relevantes en el contexto de meningitis o encefalitis, facilitando un diagnóstico sindrómico rápido (menos de 2 horas, incluyendo la extracción) con una sensibilidad global por encima del 90% y especificidad del 97%. En España existen actualmente dos sistemas con marcado CE-IVD para diagnóstico de meningitis: BioFire FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel (bioMérieux) y QIAstat-Dx® Meningitis/Encephalitis Panel (Qiagen). El panel FilmArray ME detecta 14 patógenos que incluyen seis bacterias (*Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae*), siete virus (virus herpes simple tipos 1 y 2, virus varicela-zóster, virus herpes humano tipo 6, enterovirus, parechovirus y citomegalovirus) y un hongo (*Cryptococcus neoformans/gattii*). El panel QIAstat-Dx ME

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 13

amplía la cobertura a 16 patógenos, añadiendo *Streptococcus pyogenes* y *Mycoplasma pneumoniae*. Ninguno de los paneles incluye *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp, ni bacterias propias de infecciones del SNC asociadas a dispositivos de derivación o a intervenciones quirúrgicas.

• **5.3.3. Secuenciación.** Cuando los métodos dirigidos no permiten identificar la etiología y se mantiene la sospecha de infección del SNC, puede considerarse el uso de técnicas de secuenciación a partir de muestra directa. En el caso de bacterias y hongos, la secuenciación Sanger ha sido tradicionalmente la más utilizada, por su relativo bajo coste y sencillez. Además, aunque mucho menos extendido a nivel asistencial, también es posible realizar secuenciación masiva con enfoque *shotgun* (metagenómica). Esta aproximación permite detectar cualquier material genético presente en la muestra, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos. Sin embargo, su uso presenta limitaciones, como la falta de estandarización metodológica, necesidad de análisis bioinformático especializado y un coste elevado que restringe su ámbito de aplicación a casos muy concretos (en inmunosuprimidos o ante sospecha de patógenos infrecuentes y pruebas convencionales negativas), que deben ser consensuados entre clínico y microbiólogo.

5.4. OTRAS TÉCNICAS RÁPIDAS

En este apartado destacan las técnicas basadas en amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y las pruebas de detección antigénica mediante lateral flow assay. La LAMP más utilizada en este contexto se emplea para la detección de *Neisseria meningitidis*, con resultados en menos de una hora y una sensibilidad comparable a la PCR, lo que la convierte en una opción útil en entornos con recursos limitados o como prueba point of care ante una alta sospecha de meningitis meningocócica. Entre las pruebas rápidas antigénicas, destacan aquellas que detectan el polisacárido C de *Streptococcus pneumoniae*, el antígeno polisacárido capsular glucuronoxilomanano de *Cryptococcus neoformans/gattii* (que ha desplazado a la tinta china, por su mayor sensibilidad) o antígenos de *N. meningitidis* o *E. coli*, ofreciendo una opción sencilla y asequible sobre todo si no se disponen de pruebas rápidas moleculares.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Contenedores estériles de cierre hermético (tapa de rosca) para la recolección y transporte de LCR.
- Cabina de seguridad biológica clase II para manipulación.
- Citocentrífuga, para concentrar células y microorganismos en portaobjetos, incrementando significativamente la sensibilidad de la tinción de Gram.
- Centrífuga convencional, para concentrar las muestras cuando no se disponga de citocentrífuga.
- Pipetas Pasteur estériles (desechables), para trasvasar y alicuotar el LCR.
- Pinzas estériles, para manipular filtros o membranas (si se emplean métodos de filtración).
- Asas de siembra estériles, para sembrar por descarga las placas de cultivo.
- Portaobjetos de microscopio y material para fijación de preparados (por ejemplo, placa calentadora para fijar extendidos).
- Estufa de incubación en aerobiosis a 35 ± 2 °C.
- Incubador o sistema con CO₂ (5–7% CO₂, 35 ± 2 °C) para incubación de agar chocolate y agar sangre.
- Sistemas de incubación anaerobia: jarra anaerobia con sobre generador de gas o cámara anaerobia (35 ± 2 °C) para incubación de caldo/agar cuando corresponda.
- Microscopio óptico con objetivos de 10x, 40x y 100x (inmersión en aceite) para la lectura de las tinciones de Gram y tinta china.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 13

- Extractor automático de ácidos nucleicos (muy recomendable para estandarizar y reducir riesgos de contaminación).
- Microcentrífuga (para extracción de ácidos nucleicos u otros procesamientos).
- Termociclador convencional y/o de tiempo real (RT-PCR).
- Tubos, placas o capilares especiales para PCR (según la plataforma empleada).
- Plataformas automatizadas de PCR.
- Plataformas de secuenciación.

7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

7.1. TINCIÓN DE GRAM Y CULTIVO

Las muestras de LCR se procesarán inmediatamente al llegar al laboratorio, dado su carácter crítico. Todas las manipulaciones deben realizarse dentro de la cabina de bioseguridad clase II, para proteger al personal y a la muestra.

7.1.1. Tinción de Gram. Con una pipeta Pasteur estéril, aspirar 0,5–1 mL de LCR y colocarlo en la cubeta de la citocentrífuga (con portaobjetos acoplado) para concentrar el sedimento celular/microbiano. Centrifugar según las instrucciones del fabricante (habitualmente 5–10 minutos). Retirar el portaobjetos y realizar la tinción de Gram sobre el botón celular obtenido. Si no se dispone de citocentrífuga, una alternativa es centrifugar la muestra en un tubo cónico (≈ 10 minutos a $2000\times g$), y utilizar el sedimento para hacer una extensión en portaobjetos. Nota: La citocentrifugación puede aumentar la sensibilidad de la tinción de Gram del LCR de 10 a 100 veces en comparación con la tinción directa sin concentrar la muestra. La sensibilidad también es superior a la obtenida mediante la centrifugación convencional, aunque en menor medida. Secar y fijar la extensión antes de aplicar los colorantes.

7.1.2. Siembra en medios de cultivo. Si el volumen de muestra es suficiente, reservar 1 mL de LCR para inocular en el caldo de enriquecimiento (este paso es altamente recomendado, especialmente en muestras de derivaciones). Reservar al menos 0.5-1 mL para detección molecular de virus (ver PNT-SNC-03). Centrifugar el resto de la muestra (10 minutos a $2000\times g$). Con una pipeta estéril, retirar suavemente el sobrenadante (puede conservarse refrigerado aparte si se requieren pruebas adicionales), dejando aproximadamente 0,5 mL de líquido. Resuspender bien el sedimento mediante agitación (vórtex suave). Con otra pipeta Pasteur estéril, inocular 2–3 gotas de esta suspensión en cada medio de cultivo sólido, sembrando con el asa en las placas de agar sangre y agar chocolate. Si se utiliza caldo tioglicolato (u otro caldo), inocular en él el volumen reservado inicialmente (alternativamente, dividir en 0,5 mL para inocular dos caldos distintos – BHI y tioglicolato – si se considera necesario).

Si el LCR es purulento o tiene una celularidad muy elevada: además de los medios anteriores, se debe considerar inocular 1 mL de LCR en un frasco de hemocultivo aerobio (pediátrico) e incubarlo en el sistema automatizado de hemocultivos del laboratorio. Esta práctica puede aumentar la recuperación de bacterias exigentes o presentes en baja concentración en el LCR. Su utilidad es mayor cuando se sospecha una meningitis bacteriana de baja carga bacteriana o en pacientes que ya han recibido antibióticos antes de la punción (meningitis decapitada).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 13

Por último, si el volumen de muestra es muy escaso, se debe pactar con el medico peticionario la priorización de las pruebas. Si el tubo con LCR está vacío o contiene solo una mínima cantidad de líquido, y no se puede conseguir más muestra de forma estéril, se debe proceder de la siguiente manera:

- o Añadir aproximadamente 0,5 ml de medio de cultivo (caldo) estéril con una pipeta Pasteur al tubo de muestra, taparlo e invertirlo suavemente para mezclar el contenido.
- o Usar todo el caldo resultante para sembrar los medios de cultivo y hacer la extensión.
- o Registrar en el informe el volumen recibido.

7.1.3. Condiciones de incubación.

- o Placas de agar sangre y agar chocolate: incubar a 35 ± 2 °C en atmósfera con 5–7% de CO₂ (p. ej., en estufa con CO₂ o en jarra con sobre específico para generar atmósfera de CO₂). Tiempo de incubación: hasta 5 días, con inspección diaria. Nota: algunas guías consideran que 3–4 días de incubación suelen ser suficientes en la mayoría de los casos.
- o Caldo tioglicolato (aerobiosis, 35 ± 2 °C): incubar al menos 5-7 días antes de informar negativo. Cuando se sospeche *C. acnes* u otros microorganismos de crecimiento lento, prolongar la incubación a 10 días.
- o Medios de crecimiento de hongos (agar Sabouraud Cloranfenicol) y micobacteriológicos (caldo MGIT™, Lowenstein-Jensen u otros): incubar según el protocolo específico de cada método. P. ej., incubar dos tubos de agar Sabouraud a 25-30 y 37° °C durante 3 semanas; incubar el cultivo de micobacterias a 35 ± 2 °C hasta 6-8 semanas.

7.1.4. Lectura de cultivos e identificación de microorganismos.

- o Tinción de Gram: tras teñir y secar la preparación, examinar el portaobjetos al microscopio con el objetivo de inmersión (100x). Comunicar de forma inmediata al médico solicitante el resultado, indicando la presencia y cantidad y tipología de leucocitos, y la presencia o ausencia de microorganismos, detallando su morfología y tinción.
- o Nota: una tinción de Gram positiva (con microorganismos visibles) es diagnóstica de infección del SNC, pero su sensibilidad varía aproximadamente del 30% al 90% según el microorganismo, la carga bacteriana, el uso de citocentrífuga y si el paciente ha recibido antibióticos previos. Por tanto, un Gram negativo NO descarta una meningitis, especialmente si el paciente ya ha iniciado tratamiento antimicrobiano.
- o Cultivo en placas: examinar las placas de agar a las 24 horas de incubación, y posteriormente a diario hasta completar 5 días. Anotar cualquier crecimiento de colonias, incluyendo la cantidad (escaso, moderado, abundante), la morfología, la presencia de hemólisis en agar sangre, etc.
- o Cultivo en caldo: verificar diariamente la presencia de turbidez, película superficial o sedimento en el caldo tioglicolato, ya que son indicativos de crecimiento. Mantener la incubación del caldo hasta 5-7 días antes de informarlo negativo.
- o Si los cultivos resultan positivos:
 - o Correlación Gram-cultivo: correlacionar los microorganismos aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram inicial.
 - o Comunicación preliminar: informar de inmediato y de forma preliminar al clínico acerca del aislamiento obtenido.
 - o Identificación definitiva: proceder a la identificación definitiva de los aislados a nivel de especie, empleando preferentemente espectrometría de masas (MALDI-TOF), debido a su rapidez, espectro y fiabilidad.
 - o Antibiograma: Se seguirán los criterios normativos vigentes (interpretación según tablas EUCAST o CLSI). Incluir en el informe final los resultados de sensibilidad, ya sea en forma de concentraciones mínimas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 9 de 13

inhibitorias (CMI) o de categorización cualitativa (Sensible/Sensible con exposición incrementada/Resistente).

o Crecimiento solo en caldo: si el crecimiento bacteriano se observa únicamente en el caldo y no en las placas de agar, realizar un subcultivo del caldo turbio en medios sólidos adecuados, intentando obtener colonias aisladas. Correlacionar cualquier crecimiento en estos subcultivos con la morfología observada en la tinción de Gram del caldo original y advertir en el informe final que el aislamiento se ha obtenido tras un proceso de enriquecimiento previo.

o Microorganismo no subcultivable (exigente): si en un caldo turbio la tinción de Gram revela microorganismos, pero no se logra crecimiento en los subcultivos (sugiriendo un organismo exigente o de crecimiento muy lento), implementar medidas adicionales: sembrar en medios más nutritivos y/o incubar en condiciones distintas según la sospecha.

7.2. DETECCIÓN MOLECULAR

Para garantizar la especificidad de las pruebas moleculares, el laboratorio deberá disponer de áreas físicamente separadas. Cada área contará con material y equipos exclusivos, no intercambiables. Estas medidas reducen el riesgo de contaminación cruzada, aunque no eliminan totalmente la posibilidad de falsos positivos.

7.2.1. PCR dirigida: *M. tuberculosis complex*. La extracción debe realizarse mediante métodos específicos para ADN, preferiblemente automatizados, para reducir la manipulación y el riesgo de contaminación. Es imprescindible trabajar en cabina de bioseguridad y utilizar controles internos que verifiquen la calidad de la extracción y la ausencia de inhibidores. Dada la naturaleza paucibacilar de la meningitis tuberculosa, se recomienda emplear el mayor volumen de LCR posible y concentrar el eluido. La amplificación se efectuará con kits comerciales validados, siguiendo las indicaciones del fabricante. En el caso del empleo del sistema GeneXpert®, se requiere de al menos 1 mL de muestra, que se incorpora directamente (sin decontaminación previa) al vial de sample reagent y de ahí al cartucho, donde se realiza tanto la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos.

Es importante destacar que estas técnicas no sustituyen al cultivo, y que un resultado negativo no descarta meningitis tuberculosa. Además, se debe tener en cuenta que es posible la detección de material genético después de un tratamiento efectivo, con lo que no sirven como método de seguimiento o curación.

7.2.2. Paneles sindrómicos. Estos sistemas están diseñados para realizar el procesamiento completo (lisis, extracción, amplificación y detección) en cartuchos cerrados, sin manipulación intermedia, y con tiempos de respuesta <2 horas, requiriendo un volumen de LCR (no centrifugado) de 0,2 mL. Su uso está indicado solamente en LCR obtenido por punción, y no está por tanto validado en líquidos obtenidos de derivaciones ventriculares o drenajes.

El sistema BioFire FilmArray® ME Panel emplea en una primera fase una PCR multiplex anidada de gran volumen. Finalmente en la segunda fase de PCR, reacciones individuales (single-plex) detectan los productos de la primera PCR. El sistema QIAstat-Dx® ME Panel utiliza una PCR múltiple en tiempo real con detección por fluorescencia individualizada. En ambos casos se incluyen controles internos de extracción y amplificación, que garantizan la validez del resultado y permiten identificar la presencia de inhibidores en la muestra. La manipulación inicial de la muestra (carga del cartucho) requiere de unos 5 minutos y debe realizarse en cabina de seguridad biológica clase II.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 10 de 13

En caso de resultado positivo, se informará inmediatamente como resultado probable y se conservará una alícuota de LCR para confirmación o estudios complementarios. Ante un resultado negativo, deben indicarse en el informe todos los microorganismos que es capaz de detectar la técnica e informar al clínico que dicho resultado no permite descartar una infección del SNC ni la implicación de un patógeno en concreto.

7.2.3. Secuenciación. El procedimiento, independientemente de la estrategia de secuenciación elegida, requiere el mayor volumen de LCR disponible (idealmente $\geq 1-2$ mL) y debe seguir las recomendaciones de extracción citadas previamente.

La secuenciación Sanger implica la amplificación de una fracción del gen 16S rRNA (comúnmente denominada PCR universal o pan-bacteriana) y posterior secuenciación del producto, permitiendo identificar bacterias a nivel de género o especie en infecciones monomicrobianas. En el caso de sospechar un hongo, las dianas más adecuadas son el 18S rRNA o la región ITS. Las secuencias obtenidas se comparan con bases de datos validadas (NCBI-BLAST, SILVA, RDP), considerándose valorable una coincidencia ≥ 99 % con una especie patógena del SNC. Este método es relativamente sencillo y de coste moderado, aunque su rentabilidad depende mucho de la calidad de la extracción y de los cebadores escogidos.

La secuenciación metagenómica (mNGS) permite analizar de forma no dirigida todo el material genético presente en la muestra. Se recomienda la depleción del ADN humano mediante digestión enzimática selectiva o hibridación con sondas de captura, seguida de la preparación de librerías y secuenciación masiva en plataformas de alto rendimiento. Para maximizar la sensibilidad, se recomienda procesar el LCR dentro de las primeras 72 h tras su obtención para minimizar la degradación del material genético. El análisis bioinformático debe incluir un control de calidad inicial de las lecturas, eliminación exhaustiva de secuencias humanas mediante alineamiento a genomas de referencia (GRCh38 o equivalentes), clasificación taxonómica de las lecturas no humanas mediante herramientas como Kraken2 y la aplicación de umbrales mínimos de cobertura, profundidad y número de lecturas únicas para validar los hallazgos y evitar falsos positivos.

En todos los casos es imprescindible incluir controles negativos y positivos. La interpretación debe realizarse de forma conjunta entre el microbiólogo y el clínico, especialmente en el caso de mNGS.

7.3. CONTROL DE CALIDAD

- Comprobar según el “*Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media, 3th Edition*”, CLSI M22-A5, que el control de los medios convencionales está asegurado por el fabricante y por lo tanto están exentos de otros controles.
- Verificar fechas de caducidad y condiciones de almacenamiento de todos los medios y reactivos antes de usarlos; no utilizar medios caducados ni aquellos que presenten aspecto alterado (deshidratación, contaminación, precipitados anormales, etc.).
- Participar regularmente en programas externos de intercomparación y control de calidad (Programa de Control de Calidad de la SEIMC; <https://controldecalidad.seimc.org>).
- Realizar controles internos periódicos de la tinción de Gram, utilizando preparados con bacterias de referencia para confirmar que los colorantes y la técnica de tinción siguen ofreciendo resultados fiables. Esto es extensible al análisis microscópico de la tinción por parte del personal encargado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 11 de 13

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Cultivo negativo: se informará como “Cultivo negativo”, añadiendo si procede “(tras X días de incubación)”. Se recomienda facilitar un informe preliminar verbal a las 24-48h.
- Cultivo positivo: se informará el microorganismo identificado y antibiograma completo según guías vigentes (EUCAST, CLSI). Si hay más de un patógeno significativo, se reportarán todos con su sensibilidad. Asimismo, se debe indicar si el microorganismo se ha aislado a partir de medio de enriquecimiento, para facilitar la valoración de potenciales contaminaciones.
- Los resultados de PCR se reportarán por agente, como positivo o negativo (detectado/no detectado).

En el caso particular de los paneles sindrómicos, debe especificarse en el informe qué bacterias han sido analizadas, incluso si el resultado es negativo, para que el clínico conozca el alcance del cribado realizado. En cuanto a MTC, en caso de detección de mutaciones, deben indicarse junto a la correspondiente interpretación en términos de resistencia a antituberculostáticos. Si no se obtiene señal del control interno, se repetirá la extracción y la PCR, ya que suele deberse a inhibidores o errores técnicos. Si el resultado persiste sin señal del control, se informará como: “No es posible emitir un resultado debido a la presencia de inhibidores de la amplificación en la muestra”.

9. RESPONSABILIDADES

- Obtención de la muestra: corresponde al personal clínico del servicio solicitante. Dicho personal debe seguir las normas de antisepsia y técnica de toma adecuadas descritas, y es responsable de garantizar el transporte inmediato de la muestra al laboratorio.
- Información sobre recogida y transporte: el laboratorio de Microbiología es responsable de difundir a todos los servicios las instrucciones sobre la correcta obtención, transporte y conservación de las muestras (por ejemplo, a través de manuales de toma de muestras o actividades de capacitación periódicas).
- Recepción y procesamiento en laboratorio: el facultativo encargado del área de recepción/siembras supervisará la correcta identificación de las muestras a su llegada, decidirá sobre la aceptación o rechazo de cada muestra (consultando al clínico si la muestra no reúne condiciones óptimas, ver criterios en sección 4.4) y velará por el rápido procesamiento del LCR.
- Técnicos de laboratorio: son responsables de la ejecución de los procedimientos microbiológicos, del mantenimiento de los equipos y del registro primario de resultados.
- Facultativos: son responsables de la interpretación final de técnicas empleadas y de discernir la relevancia clínica de los resultados obtenidos. Deben supervisar el trabajo técnico, asegurar la correcta transcripción de los resultados al sistema informático, comunicar precozmente los resultados preliminares críticos por vía telefónica / historia clínica electrónica al clínico y emitir informes preliminares y definitivos validados. También se encargan de responder a interconsultas clínicas y, en general, de garantizar la calidad de todo el proceso diagnóstico

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El procesamiento de las muestras de LCR siempre debe considerarse una urgencia médica y microbiológica. Todo el flujo de trabajo debe efectuarse lo antes posible para aportar información crítica al manejo del paciente. Idealmente, el resultado de la tinción de Gram debe estar disponible dentro de la primera hora tras la recepción de la muestra.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 12 de 13

No se rechazarán ni demorarán muestras de LCR por problemas menores sin antes consultar con el clínico solicitante. Por ejemplo, si una muestra llegó con derrame parcial, se procesará igualmente (tomando las precauciones necesarias para evitar contaminación) en vez de perder la oportunidad diagnóstica, dejando constancia de la incidencia en el informe.

Un volumen insuficiente de LCR puede comprometer el rendimiento diagnóstico. Siempre que sea posible, obtener y enviar varios mililitros de LCR. Si el volumen disponible es muy escaso, el laboratorio debe priorizar los análisis de mayor rendimiento clínico, en coordinación con el médico solicitante.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- **Antibióterapia previa:** un tratamiento antimicrobiano iniciado antes de la toma del LCR puede dar lugar a cultivos negativos o con crecimiento muy escaso. Incluso una sola dosis de antibiótico previa puede disminuir de forma dramática la sensibilidad del cultivo y de la tinción de Gram. En tales casos, un resultado negativo no excluye infección; el clínico debe interpretar los hallazgos microbiológicos siempre en conjunto con la presentación clínica del paciente y los datos citoquímicos del LCR.
- **Bajo inóculo o volumen reducido:** si el LCR disponible es muy escaso, la probabilidad de detección disminuye considerablemente. Si la sospecha clínica persiste a pesar de resultados negativos iniciales, se recomienda repetir la punción lumbar (si es posible) o emplear métodos moleculares más sensibles para intentar detectar el patógeno.
- **Microorganismos exigentes o de crecimiento lento:** algunos patógenos (p. ej., *C. acnes*, *M. tuberculosis*, *Nocardia* spp., etc.) pueden requerir condiciones especiales para crecer (medios muy enriquecidos, atmósferas modificadas, tiempos de incubación prolongados). Este protocolo contempla medidas para algunos de ellos (p. ej., incubación de caldo tioglicolato hasta 10 días, uso de medios específicos según sospecha), pero un cultivo negativo a los 5 días no descarta la presencia de ciertos organismos. Debe mantenerse la sospecha clínica y, de ser necesario, prolongar las incubaciones más allá de lo rutinario o realizar técnicas complementarias (como PCR/secuenciación de amplio espectro 16S/18S/ITS, pruebas de antígenos, etc.) en casos justificados donde se sospechen patógenos no convencionales.
- **Contaminación vs. infección real:** en particular con muestras de derivaciones, puede ocurrir el aislamiento de bacterias cutáneas contaminantes. Debe interpretarse con cautela un cultivo positivo único de *Staphylococcus* estafilococos coagulasa-negativo o *C. acnes* que no se correlacione con la clínica del paciente ni con signos inflamatorios en el LCR; podría indicar simplemente una contaminación de la muestra o colonización del catéter, más que una infección activa. Por ello, es importante la correlación clínico-microbiológica y, si hay duda razonable, considerar la repetición de la punción lumbar y el cultivo antes de concluir un diagnóstico de infección del SNC.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Shahan B, Choi EY, Nieves G. 2021. Cerebrospinal Fluid Analysis. Am Fam Physician 103(7):422-428.
2. van de Beek D, Cabellos C, Dzugova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Infect. 2016 May;22(Suppl 3):S37–62. doi:10.1016/j.cmi.2016.01.007.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de LCR Obtenido por Punción Lumbar o a Través de Sistemas de Derivación	PNT-SNC-01	
		Edición N° 01	Página 13 de 13

- 3.**Tunkel AR et al. 2017. IDSA Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Clin Infect Dis 64(6):e34-e65. DOI: 10.1093/cid/ciw861
- 4.**Sánchez-Romero MI (coord.). 2018. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en Microbiología. 2ª ed. Procedimientos Microbiología SEIMC.
- 5.**Carroll KC, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology. 13th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Sep 13.
- 6.**Leber AL, Burnham CAD, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Mar 21.
- 7.**CLSI. Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard—Third Edition. NCCLS document M22-A3 [ISBN 1-56238-536-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
- 8.**European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
- 9.**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2025. Disponible en: <https://clsi.org/shop/standards/m100>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

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 / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

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 establecer los criterios de interpretación de los cultivos. Este procedimiento está orientado a garantizar un diagnóstico etiológico fiable, en el menor tiempo posible, con especial atención a la conservación de la muestra, las condiciones de cultivo y la correcta identificación de microorganismos, tanto aerobios como anaerobios, hongos y micobacterias.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico etiológico del absceso cerebral se basa fundamentalmente en el aislamiento del microorganismo responsable a partir de muestras obtenidas por punción estereotáxica o mediante cirugía abierta (craneotomía). La obtención de la muestra debe realizarse, siempre que sea posible, antes de iniciar el tratamiento antibiótico empírico. La etiología del absceso cerebral es diversa y depende del mecanismo de diseminación (contigüidad, hematógena, postraumática o posquirúrgica). En abscesos de origen otorrinolaringológico o dentario predominan cocos anaerobios como *Peptostreptococcus* spp., bacilos anaerobios estrictos como *Fusobacterium* spp y *Prevotella* spp, así como estreptococos del grupo anginosus. En otros casos pueden aislarse enterobacteriales, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans* o incluso *Nocardia* spp. y *Actinomyces* spp. En pacientes inmunodeprimidos deben considerarse también hongos filamentosos, levaduras y micobacterias. Dada la elevada frecuencia de bacterias anaerobias y la posibilidad de aislar microbiota mixta, es imprescindible el uso de medios de transporte adecuados para anaerobios y el envío inmediato al laboratorio.

Un procesamiento rápido, una siembra adecuada en medios apropiados y una correcta interpretación de los cultivos son esenciales para el éxito terapéutico. En este procedimiento se describen los métodos para el procesamiento adecuado de las muestras de absceso cerebral.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez-Romero MI (coord.). 2018. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en Microbiología. 2ª ed. Procedimientos Microbiología SEIMC.
- ESCMID guidelines for diagnosis and management of brain abscess. Clin Microbiol Infect. 2022;28(5):597.e1–597.e20.
- Carroll KC, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology. 13th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Sep 13.
- Leber AL, Burnham CAD, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Mar 21.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

Cada muestra debe ir acompañada de una petición correctamente cumplimentada y registrada electrónicamente, incluyendo: datos demográficos del paciente (nombre completo, edad, número de historia clínica), fecha de la solicitud, servicio de procedencia y datos del facultativo solicitante. Deben constar las características de la muestra (tipo de muestra y técnica de obtención), los estudios microbiológicos solicitados (cultivo, tinción de Gram, etc.) y la información clínica relevante (diagnóstico de sospecha, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo, presencia de un dispositivo de derivación u otros datos que orienten el procesamiento).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra debe obtenerse bajo condiciones de asepsia estricta, preferentemente antes de iniciar tratamiento antibiótico. El material purulento puede obtenerse por aspiración estereotáxica o durante la craneotomía. Se recomienda el uso de antiséptico con clorhexidina alcohólica al 2%.

La muestra se depositará en un sistema de transporte para anaerobios (Portagerm® o equivalente), o en un contenedor estéril sin conservantes, en caso de no disponer del anterior. Si se obtiene una cantidad suficiente, se recomienda fraccionar en alícuotas para estudios específicos (cultivo de hongos, micobacterias, técnicas moleculares).

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

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. No se debe refrigerar, especialmente si se sospecha microbiota anaerobia.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Criterios de rechazo:

- Identificación incorrecta o incompleta de la muestra y/o de la solicitud (p. ej., etiquetado erróneo que impida la identificación inequívoca del paciente). Se contactará con el servicio remitente para subsanar los errores de identificación, cuando ello sea posible.
- Uso de torundas (sensibilidad muy baja, especialmente para anaerobios).
- Contenedor no estéril o con conservantes.
- Muestras derramadas durante el transporte. En caso de derrame que implique posible contaminación, no se debe descartar automáticamente la muestra sin consultar al clínico; se valorará procesarla con las debidas precauciones e informar sobre la posible contaminación en el informe de resultados.

En todos los casos, debe contactarse con el clínico responsable antes de decidir el rechazo. Siempre que sea posible, se procesará la muestra y se dejará constancia de la incidencia en el informe.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar sangre.
- Agar chocolate.
- Agar MacConkey (selectivo Gram negativos).
- Agar para anaerobios (Schaedler/brucella ± feniletanol, LKV, BBE u otros).
- Agar colistina-nalidíxico (CNA; selectivo Gram positivos).
- Caldo de enriquecimiento (tioglicolato o similar).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

- Frascos de hemocultivo (aerobio y anaerobio).
- Agar Sabouraud Cloranfenicol (si se solicita cultivo de hongos).
- MGITTM, Löwenstein-Jensen o similar (si se solicita cultivo de micobacterias).

Nota: Los medios comerciales deben contar con controles de calidad de fábrica; ver sección 7.4 sobre control de calidad de medios.

5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Sistemas de transporte para anaerobios.
- Colorantes para tinción de Gram.
- Generadores de atmósfera (CO₂ y anaerobiosis).
- Colorantes para la tinción de Ziehl-Neelsen (si se solicitan micobacterias).
- Calcoflúor (si se solicitan hongos).
- Suero salino.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica tipo II.
- Pinzas y asas de siembra estériles.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Estufas de incubación (aerobias y anaerobias).
- Jarras o sobres generadores de atmósfera.
- Vórtex.
- Homogeneizador

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN

Las muestras deben procesarse inmediatamente en cabina de bioseguridad tipo II. Se recomienda agitar el contenedor con vórtex para homogeneizar el contenido. Si el volumen es escaso, puede añadirse 1 ml de caldo tioglicolato estéril. Si se recibe material sólido o fragmentos, se recomienda triturar con instrumental estéril o utilizar un homogeneizador mecánico manual o vórtex con perlas, en medio estéril (ej. caldo tioglicolato o suero salino).

Si la muestra se envía en torunda (no recomendado), es preferible inocular la torunda en 0,5 ml de caldo tioglicolato y sembrar a partir de este medio. Se realizará siembra por agotamiento con asa estéril en todos los medios indicados (apartado 5) y se preparará extensión para tinción de Gram. Si se solicitan cultivos de hongos o micobacterias, se inocularán medios específicos y se realizarán las tinciones adecuadas.

7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar sangre, chocolate, MacConkey, CNA: 35–37 °C, 5% CO₂, 5 días.
- Agar Schaedler, agar LKV: 35–37 °C, anaerobiosis, 7 días.
- Caldo tioglicolato o similar: 5 días.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

- Frascos de hemocultivos: 5-7 días.
- Sabouraud Cloranfenicol: 25–30 °C y 37°C, hasta 3 semanas.
- MGITTM, Löwenstein-Jensen o similar: hasta 6-8 semanas.

7.3. LECTURA DE CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN

7.3.1. Tinción de Gram. Los resultados deben informarse en la primera hora desde la recepción de la muestra. Se describirá la presencia de leucocitos y morfotipos bacterianos, y se notificará de forma inmediata al clínico.

7.3.2. Cultivo. Los cultivos deben revisarse a diario. En el caso del agar para anaerobios estrictos, se realizará una primera lectura a las 48h y otra a término (7 días), para evitar la exposición prolongada al oxígeno y con ello la muerte de los aislados. En caso de crecimiento:

- Correlación Gram-cultivo: correlacionar los microorganismos aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram inicial.
- Comunicación preliminar: informar de inmediato y de forma preliminar al clínico acerca del aislamiento obtenido.
- Identificación definitiva: proceder a la identificación definitiva de los aislados a nivel de especie, empleando preferentemente espectrometría de masas MALDI-TOF, debido a su rapidez, espectro y fiabilidad.
- Antibiograma: Se seguirán los criterios normativos vigentes (interpretación según tablas EUCAST o CLSI). Incluir en el informe final los resultados de sensibilidad, ya sea en forma de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) o de categorización cualitativa (Sensible/Sensible con exposición incrementada/Resistente).
- Crecimiento solo en caldo: si el crecimiento bacteriano se observa únicamente en el caldo y no en las placas de agar, realizar un subcultivo del caldo turbio en medios sólidos adecuados, intentando obtener colonias aisladas. Correlacionar cualquier crecimiento en estos subcultivos con la morfología observada en la tinción de Gram del caldo original y advertir en el informe final que el aislamiento se ha obtenido tras un proceso de enriquecimiento previo.
- Microorganismo no subcultivable (exigente): si en un caldo turbio la tinción de Gram revela microorganismos, pero no se logra crecimiento en los subcultivos (sugiriendo un organismo exigente o de crecimiento muy lento), implementar medidas adicionales: sembrar en medios más nutritivos y/o incubar en condiciones distintas según la sospecha.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

- Comprobar según el “*Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media, 3th Edition*”, CLSI M22-A5, que el control de los medios convencionales está asegurado por el fabricante y por lo tanto están exentos de otros controles.
- Verificar fechas de caducidad y condiciones de almacenamiento de todos los medios y reactivos antes de usarlos; no utilizar medios caducados ni aquellos que presenten aspecto alterado (deshidratación, contaminación, precipitados anormales, etc.).
- Participar regularmente en programas externos de intercomparación y control de calidad (Programa de Control de Calidad de la SEIMC).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Cultivo negativo: se informará como “Cultivo negativo”, añadiendo si procede “(tras X días de incubación)”.
- Cultivo positivo: se informará la especie identificada y antibiograma completo según guías vigentes (EUCAST, CLSI). Si hay más de un aislado significativo, se reportarán todos con su sensibilidad. Asimismo, se debe indicar si el microorganismo se ha aislado a partir de medio de enriquecimiento, para facilitar la valoración de potenciales contaminaciones.

9. RESPONSABILIDADES

- Obtención de la muestra: corresponde al personal clínico del servicio solicitante. Dicho personal debe seguir las normas de antisepsia y técnica de toma adecuadas descritas, y es responsable de garantizar el transporte inmediato de la muestra al laboratorio.
- Información sobre recogida y transporte: el laboratorio de Microbiología es responsable de difundir a todos los servicios las instrucciones sobre la correcta obtención, transporte y conservación de las muestras (por ejemplo, a través de manuales de toma de muestras o actividades de capacitación periódicas).
- Recepción y procesamiento en laboratorio: el facultativo encargado del área de recepción/siembras supervisará la correcta identificación de las muestras a su llegada, decidirá sobre la aceptación o rechazo de cada muestra (consultando al clínico si la muestra no reúne condiciones óptimas) y velará por el rápido procesamiento de las muestras.
- Técnicos de laboratorio: son responsables de la ejecución de los procedimientos microbiológicos (tinciones, siembras, subcultivos, identificación preliminar), del mantenimiento de los equipos (incubadores, atmósferas especiales, etc.) y del registro primario de resultados.
- Facultativos: son responsables de la interpretación final de la tinción de Gram y de los cultivos, de la validación de las identificaciones y antibiogramas, y de discernir la relevancia clínica de los aislamientos obtenidos. Deben supervisar el trabajo técnico, asegurar la correcta transcripción de los resultados al sistema informático, comunicar precozmente los resultados preliminares críticos por vía telefónica / historia clínica electrónica al médico peticionario y emitir informes preliminares y definitivos validados. También se encargan de responder a interconsultas clínicas y, en general, de garantizar la calidad de todo el proceso diagnóstico.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El procesamiento de las muestras de absceso cerebral siempre debe considerarse una urgencia médica y microbiológica. Todo el flujo de trabajo debe efectuarse lo antes posible para aportar información crítica al manejo del paciente.

No se rechazará ni demorará el procesamiento de la muestra por problemas menores sin antes consultar con el clínico solicitante. Por ejemplo, si una muestra llegó con derrame parcial, se procesará igualmente (tomando las precauciones necesarias para evitar contaminación) en vez de perder la oportunidad diagnóstica, dejando constancia de la incidencia en el informe.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento Microbiológico de Muestras de Absceso Cerebral	PNT-SNC-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- **Antibióterapia previa:** un tratamiento antimicrobiano iniciado antes de la obtención del absceso puede dar lugar a cultivos negativos o con crecimiento muy escaso. Incluso una sola dosis de antibiótico previa puede disminuir de forma dramática la sensibilidad del cultivo y de la tinción de Gram. En tales casos, un resultado negativo no excluye infección; el clínico debe interpretar los hallazgos microbiológicos siempre en conjunto con la presentación clínica del paciente.
- **Bajo inóculo o volumen reducido:** si el volumen de absceso disponible es muy escaso, la probabilidad de detección disminuye considerablemente. Si la sospecha clínica persiste a pesar de resultados negativos iniciales, se recomienda emplear métodos moleculares más sensibles para intentar detectar el patógeno (p.ej., secuenciación del gen 16S/18S/ITS o metagenómica *shotgun*. Ver PNT-3 dentro de este mismo procedimiento).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez-Romero MI (coord.). 2018. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en Microbiología. 2ª ed. Procedimientos Microbiología SEIMC.
2. ESCMID guidelines for diagnosis and management of brain abscess. Clin Microbiol Infect. 2022;28(5):597.e1–597.e20.
3. Carroll KC, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology. 13th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Sep 13.
4. Leber AL, Burnham CAD, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Mar 21.
5. UpToDate. Brain abscess: Pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis. Última revisión: 2025.
6. CLSI. Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard—Third Edition. NCCLS document M22-A3 [ISBN 1-56238-536-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2025. Disponible en: <https://clsi.org/shop/standards/m100>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 12

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 / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 12

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, para realizar el diagnóstico microbiológico 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. Históricamente, la técnica de elección para su diagnóstico era la detección de anticuerpos IgM, complementada por la detección directa del virus en líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante cultivo o PCR. En la actualidad, las técnicas moleculares constituyen el método de referencia para el diagnóstico microbiológico de las infecciones víricas del sistema nervioso central (SNC) por su alta sensibilidad y rapidez. De este modo, el cultivo viral ha sido desplazado completamente de la actividad asistencial debido a su mayor complejidad y tiempo de respuesta, mientras que la detección de anticuerpos ha quedado relegada a situaciones muy concretas (p. ej., ante sospecha de arbovirus, donde también se hace PCR). En este procedimiento normalizado de trabajo se describen los métodos para el diagnóstico virológico de estas infecciones.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez-Romero MI (coord.). 2018. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en Microbiología. 2ª ed. Procedimientos Microbiología SEIMC.
- Cercenado, E., Cantón, R., Pérez Sáenz, J. L., Alados Arboledas, J. C., Gómez García de la Pedrosa, E., Leiva León, J., & Rojo Molinero, E. (2015). Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(6), 404–410. doi:10.1016/j.eimc.2014.08.011.
- Carroll KC, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 13th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Sep 13.
- Leber AL, Burnham CAD, eds. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Mar 21.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe ser correctamente cumplimentado y registrado electrónicamente, y en él deberán constar claramente los datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), fecha de la petición, fecha de comienzo de síntomas, servicio de procedencia, juicio clínico del médico que realiza la petición y tipo de muestra. Asimismo, deberán figurar los siguientes datos clínico-epidemiológicos: enfermedad de base, situación o no de inmunodepresión, presencia o no de exantema, presencia actual o antecedentes de picaduras de insectos o mordeduras de animales, viajes recientes y tratamientos previos. También es importante recoger los antecedentes vacunales relevantes (p. ej., frente a sarampión, parotiditis, varicela).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 12

4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de elección es siempre el LCR, que debe haberse obtenido en fase aguda y, siempre que sea posible, antes de iniciar tratamiento antibiótico y/o antiviral. 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, ya que puede dar falsos positivos. El volumen de LCR aspirado no debe ser inferior a 1 ml (revisar Tabla S1 en PNT-SNC-01) si se desea realizar toda la batería de pruebas; debe disponerse en un contenedor de tapa de rosca y cierre hermético (nunca de vidrio, para evitar accidentes de laboratorio). En todos los casos debe 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 secundaria a parotiditis 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, y en ningún caso en medios que favorezcan el crecimiento bacteriano. Si hay sospecha de rabia o de una encefalitis con antecedente de mordedura de animal, especialmente murciélago, además de LCR y suero, se tomará saliva y biopsia de piel de nuca que contenga folículo piloso. Dado que las cargas víricas en LCR suelen ser bajas, se recomienda utilizar el volumen recomendado para las pruebas moleculares y/o serológicas, aumentando así la sensibilidad.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Es necesario transportar la muestra al laboratorio de modo inmediato y en persona, ya que se trata de una situación clínica urgente. NO se debe utilizar el tubo neumático de transporte para este fin, para evitar posibles incidencias. Si la muestra no es procesada inmediatamente, conservar en nevera la alícuota correspondiente al análisis virológico (4°C). Si la muestra ha de enviarse fuera del hospital, deberá hacerse refrigerada con acumuladores de frío y en contenedores adecuados para sustancias infecciosas. En caso de demoras prolongadas y únicamente para el diagnóstico molecular (no para cultivo), es aceptable congelar el LCR a -80°C, ya que la congelación preserva mejor los ácidos nucleicos, y particularmente el ARN viral.

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). Se contactará con el servicio remitente para subsanar los errores de identificación, cuando ello sea posible.
- Conservación inadecuada (temperatura o medio de transporte inadecuado).
- Muestras derramadas. En caso de derrame que implique posible contaminación, no se debe descartar automáticamente la muestra sin consultar al clínico; se valorará procesarla con las debidas precauciones e informar sobre la posible contaminación en el informe de resultados.
- Volumen insuficiente. Puede dar lugar a rechazo si no permite realizar las pruebas solicitadas. 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. Incluso cuando la muestra presente contaminación hemática importante (punción "traumática"), no debe ser rechazada; no obstante, el laboratorio deberá

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 12

tener en cuenta esta circunstancia, ya que la presencia de sangre puede inhibir las PCR o dificultar la interpretación de anticuerpos intratecales. En estos casos, se intentará el procesamiento ajustando protocolos (p. ej., utilizando kits de extracción específicos) y se informará la posible limitación en el informe de resultados.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. CULTIVO CELULAR

El aislamiento viral mediante cultivo celular ha sido totalmente desplazado del diagnóstico rutinario de infecciones del SNC debido a su baja sensibilidad, el tiempo prolongado hasta la obtención de resultados y la disponibilidad de técnicas moleculares más rápidas y eficaces. Actualmente, su uso se limita a contextos muy concretos, en laboratorios de referencia.

En el ámbito clínico, si se realiza cultivo viral, lo más habitual es recurrir a técnicas de cultivo rápido, como el método de *shell-vial*, que consiste en centrifugar la muestra sobre una monocapa celular e identificar el antígeno viral mediante inmunofluorescencia directa (IFD) tras 24–72 horas desde la inoculación. Esta estrategia reduce significativamente los tiempos de respuesta y es la forma más utilizada actualmente en laboratorios asistenciales.

Respecto a las líneas celulares, debe utilizarse una combinación adaptada al espectro viral sospechado. Por ejemplo, MRC-5 y RD cubren enterovirus y algunos herpesvirus; Vero es útil para parotiditis y, en caso de sarampión, se recomiendan variantes como Vero-SLAM o B95a. Los cultivos deben mantenerse en medios enriquecidos con suero bovino fetal, glutamina y antimicrobianos (penicilina, estreptomycin y anfotericina B).

5.2. DETECCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

La detección de ácidos nucleicos representa, en la actualidad, la herramienta de referencia para el diagnóstico etiológico de infecciones víricas del SNC, debido a su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez.

5.2.1. PCR dirigida: pruebas individuales. Existen ensayos comerciales que permiten detectar de forma individual genomas de virus neurotrópicos, como los virus herpes simple tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2), virus varicela-zóster (VZV), enterovirus o citomegalovirus (CMV). Estos ensayos se basan generalmente en tecnología de PCR en tiempo real, aunque la PCR digital (dPCR) está emergiendo como una alternativa eficiente en escenarios de baja carga viral o presencia de inhibidores (LCR hemático).

La mayoría de estas pruebas requiere una etapa previa de extracción de ácidos nucleicos, que puede realizarse de forma manual o mediante plataformas automatizadas. Algunos sistemas, sin embargo, integran todos los pasos (extracción, amplificación y detección) en un formato cerrado, reduciendo el riesgo de contaminación y acortando los tiempos de respuesta a menos de tres horas. Un ejemplo de esto es la detección de enterovirus en LCR mediante ensayos en cartucho, que ofrecen una sensibilidad cercana al 96% y una especificidad del 99%.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición Nº 01	Página 5 de 12

5.2.2. PCR multiplex y paneles sindrómicos. Además de la detección única, existen sistemas que permiten la detección simultánea de los virus neurotrópicos más frecuentes mediante PCR múltiple en tiempo real y PCR anidada. Algunos de estos paneles están organizados en módulos independientes y permiten la detección semicuantitativa mediante los valores de Ct o Cp (*cycle threshold* o *Crossing point*) para cada diana. Además, en los últimos años se han desarrollado plataformas completamente automatizadas que permiten la detección simultánea de múltiples patógenos del SNC a partir de una única muestra de LCR. Estas soluciones integran en una misma reacción la identificación de varios virus, bacterias y hongos relevantes en el contexto de meningitis o encefalitis, facilitando un diagnóstico sindrómico rápido (menos de 2 horas, incluyendo la extracción), con una sensibilidad global por encima del 90% y especificidad del 97%.

5.2.3. Técnicas *in-house* o referencia externa. En el caso de virus menos frecuentes, emergentes o para los que no exista disponibilidad comercial de ensayos diagnósticos, pueden utilizarse protocolos *in-house* que estén previamente validados. Si se opta por su implementación local, es imprescindible disponer de los reactivos adecuados, realizar controles de calidad rigurosos y validar internamente los resultados. Alternativamente, puede derivarse la muestra a un laboratorio de referencia, respetando las condiciones de transporte de sustancias infecciosas según la normativa vigente. Con la nueva regulación de técnicas de *in vitro* diagnóstico estas técnicas *in house* deberían ser validadas exhaustivamente.

5.2.4. Secuenciación metagenómica (mNGS). Cuando los métodos dirigidos no permiten identificar la etiología y se mantiene la sospecha de infección vírica, puede considerarse el uso de secuenciación masiva, especialmente aquella con enfoque metagenómico (mNGS). Esta tecnología permite detectar cualquier material genético presente en la muestra, sin necesidad de hipótesis diagnósticas previas, y ha demostrado utilidad en casos de encefalitis de causa desconocida. Sin embargo, su uso presenta limitaciones, como la posible detección de virus latentes o contaminantes, menor sensibilidad para ciertos virus ARN (enterovirus, virus de la encefalitis japonesa, etc.), falta de estandarización metodológica, necesidad de análisis bioinformático especializado y un coste elevado que restringe su ámbito de aplicación.

5.3. SEROLOGÍA

La detección de IgM e IgG en suero o LCR se realiza habitualmente en equipos automatizados basados en enzimoimmunoensayo (EIA/ELISA) o quimioluminiscencia. La serología en LCR siempre debe interpretarse tras comprobar la integridad de la barrera. Para ello, se cuantifica albúmina en LCR y en suero del mismo día, calculando el índice albúmina LCR/suero, que debe ser <0,0075 (valor normal) para asumir que la barrera está íntegra. Si esta condición se cumple y se detectan anticuerpos específicos en LCR, se interpreta como síntesis intratecal y por tanto indicativa de infección del SNC por ese virus. Puede también calcularse un índice de anticuerpos específico por comparación con IgG totales en suero y LCR (p. ej., fórmula de Reiber), lo que aporta mayor certeza de síntesis intratecal en infecciones como la causada por el virus del sarampión en fases tardías.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

6. APARATOS Y MATERIALES

El trabajo debe hacerse bajo condiciones de riesgo biológico 2, diferenciando tres zonas para las pruebas moleculares: zona pre-PCR, zona de amplificación (sala de termocicladores) y zona post-PCR (cuando se requieran hacer estudios posteriores con el producto amplificado), para evitar contaminaciones. Se requerirá el siguiente equipamiento mínimo:

- Cabina de seguridad biológica tipo II.
- Centrífuga de mesa (con adaptadores para tubos de 1,5-2 mL y para tubos de cultivo celular).
- Estufa de 37°C con atmósfera adecuada para cultivo celular.
- Baño termostático (37°C, para incubaciones controladas).
- Microscopio invertido de fluorescencia (para observación de cultivos celulares).
- Shell-vials (según líneas celulares utilizadas).
- Extractor automático de ácidos nucleicos (muy recomendable para estandarizar y reducir riesgos de contaminación).
- Microcentrífuga (para extracción de ácidos nucleicos u otros procesamientos).
- Termociclador convencional y/o de tiempo real (RT-PCR).
- Equipamiento de electroforesis (si se emplean PCR a punto final con detección post-amplificación).
- Tubos, placas o capilares especiales para PCR (según la plataforma empleada).
- Plataformas automatizadas de PCR para determinaciones urgentes
- Procesador de ELISA (lavador de placas) y espectrofotómetro o luminómetro (para lectura de ELISA o inmunoensayos).
- Placas de ELISA, cubetas, puntas de micropipeta con y sin filtro (desechables).
- Pipetas Pasteur estériles, material de vidrio/plástico estéril diverso

Nota: las plataformas automatizadas de PCR a tiempo real, como el sistema de cartuchos o los paneles síndromicos, son opcionales según disponibilidad, pero recomendables para agilizar el diagnóstico en casos urgentes.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PROTOCOLO GENERAL

Se propone el siguiente esquema ideal de trabajo, teniendo en cuenta que el aislamiento en cultivo celular posee una sensibilidad muy inferior a la PCR y solo se realiza en centros de referencia.

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

- LCR: PCR de enterovirus, HSV, VZV; considerar PCR de HHV-6 en menores de 3 años o pacientes inmunodeprimidos. Nota: En la práctica, si se cuenta con un panel molecular múltiple, este puede analizar simultáneamente los principales virus (VHS1, VHS2, VVZ, enterovirus, HHV-6, parechovirus, CMV).
- En casos de meningitis linfocitaria y especialmente en contexto epidémico y/o en niños, puede

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 7 de 12

darse prioridad en el cribado a la PCR de enterovirus en LCR. En lactantes <6 meses, asimismo, debe incluirse PCR de parechovirus humano.

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 e IgM virus del sarampión, según proceda (ante sospecha de infección primaria por esos virus). A tener en cuenta que en pacientes vacunados o inmunodeprimidos la respuesta IgM puede ser débil o ausente. Además, en el caso de VZV no se aconseja detección de IgM, especialmente si se sospecha una encefalitis por reactivación (zóster), pues suele ser negativa. En tal situación está indicado proceder directamente a la PCR en LCR para VZV.
- Simultáneamente, analizar el LCR y otras muestras según proceda (exudado faríngeo, saliva, orina, contenido vesicular, etc.) por PCR de virus de la parotiditis, VZV o virus del sarampión, según corresponda.
- Si todo lo anterior es negativo, procesar la muestra como en 7.1.1 (considerando otros virus neurotrópicos comunes).
- Si aun así todo es negativo, pueden investigarse otros virus productores de exantema que excepcionalmente producen cuadros neurológicos: HHV-6, parvovirus B19, flavivirus o virus de la rubéola (especialmente en no vacunados).

7.1.3. Caso de meningitis, meningoencefalitis o encefalitis en paciente inmunodeprimido: Procesar como en 7.1.1, añadiendo PCR de CMV en LCR (especialmente en pacientes con SIDA o trasplante) y PCR de EBV si hay indicación clínica específica (p. ej., descartar enfermedad linfoproliferativa del SNC en inmunodeprimidos). También puede ampliarse el estudio a virus JC (ver 7.1.5), adenovirus, HHV-6, HHV-7 u otros según contexto clínico.

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 en 7.1.1 y enviar a Laboratorio de Referencia muestras adecuadas para determinación de patógenos especiales que no puedan investigarse en el laboratorio local. Los patógenos a considerar dependerán del lugar de origen (viaje) o de la exposición referida:

- Ante picaduras de insectos (mosquitos, flebótomos): añadir virus Toscana (arbovirosis más común causante de meningitis linfocitaria estival en España), virus West Nile (emergente en sudoeste y noreste de la península ibérica) y considerar también rickettsiosis (*Rickettsia* spp, *Coxiella burnetii*).
- Ante picaduras de garrapatas: considerar virus de la encefalitis centroeuropea/tick-borne (TBEV), especialmente si el paciente ha viajado o reside en zonas endémicas del centro y norte de Europa.
- Ante exposición a roedores: virus de la coriomeningitis linfocítica.
- Ante mordedura de animal susceptible (especialmente cánidos, murciélagos u otros reservorios): virus de la rabia y otros *Lyssavirus*.

Nota: En todos estos casos, el diagnóstico suele incluir serología específica IgM en suero y LCR, confirmación por prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), así como PCR en muestras adecuadas.

7.1.5. Sospecha de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP): PCR de poliomavirus JC en LCR. La detección de ADN en LCR tiene alta sensibilidad para el diagnóstico de LMP en pacientes con sospecha clínica. Se recomienda repetir la punción y PCR si la primera resulta negativa pero la sospecha

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 8 de 12

sigue siendo alta, ya que la carga viral en estadios tempranos puede ser baja. Valorar en este caso el empleo de PCR digital.

7.1.6. Sospecha de panencefalitis esclerosante subaguda (PEES): Determinación de producción intratecal de anticuerpos IgG contra virus del sarampión y PCR frente a virus del sarampión en LCR o biopsia cerebral post-mortem (más sensible).

7.1.7. Sospecha de rabia: Enviar a laboratorio de referencia, debido al riesgo biológico. El diagnóstico de rabia requiere técnicas específicas que incluyen detección de antígeno viral por inmunofluorescencia en biopsia de piel de cuello (incluyendo folículos pilosos), y/o RT-PCR en saliva, LCR u otras muestras.

7.2. DETECCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO (PCR)

Para garantizar la especificidad de la PCR, el laboratorio deberá disponer de áreas físicamente separadas. Cada área contará con material y equipos exclusivos, no intercambiables. Estas medidas reducen el riesgo de contaminación cruzada, aunque no eliminan totalmente la posibilidad de falsos positivos. El empleo de PCR en tiempo real en un solo paso o de plataformas cerradas disminuye notablemente dicho riesgo.

7.2.1. Extracción de ácidos nucleicos: Debe realizarse mediante métodos específicos para ADN/ARN o mediante extracción total, siempre adecuados al virus en estudio. Como se ha indicado, se recomienda el uso de sistemas automatizados para minimizar manipulación y riesgos de contaminación, garantizando que toda manipulación de muestras sin inactivar se realice en cabina de bioseguridad. Es necesario incluir un control interno para verificar la validez de la extracción, la ausencia de inhibidores en la muestra y la correcta amplificación. Dada la baja carga viral en LCR, deberán utilizarse los volúmenes recomendados en las diferentes técnicas a realizar, para optimizar la sensibilidad.

7.2.2. Amplificación: Si se utiliza un método comercial (kits validados de PCR), se seguirán las instrucciones del fabricante. Hasta hace algunos años, esta tecnología no ofrecía una sensibilidad suficiente para la detección simultánea de múltiples virus, por lo que era necesario recurrir a métodos clásicos PCR a tiempo final, generalmente complementada con PCR anidada. En la actualidad, los sistemas de PCR múltiple en tiempo real han superado en gran parte estas limitaciones, aunque en determinados casos los enfoques anidados siguen proporcionando la mayor sensibilidad. Además, en cada serie de PCR se deben incluir controles positivos y negativos para asegurar la validez del ensayo.

7.3. SECUENCIACIÓN GENÓMICA

En casos muy seleccionados, como cuadros de meningoencefalitis con fuerte sospecha clínica y resultados negativos, puede recurrirse a técnicas de secuenciación genómica. Existen principalmente dos enfoques: la secuenciación metagenómica sin hipótesis previa (*shotgun* o mNGS) y la secuenciación dirigida por amplicones. Esta última genera librerías a partir de *primers* diseñados frente a distintos virus neurotrópicos, ofreciendo alta sensibilidad, pero no universalidad. En cambio, la estrategia metagenómica permite el análisis global del contenido genético de la muestra (incluidos virus, bacterias, hongos y parásitos), siendo el que cuenta con más evidencia de uso en infección del SNC, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 9 de 12

La mNGS a partir de LCR o tejido cerebral comienza con la extracción de ácidos nucleicos y su posterior enriquecimiento mediante depleción del genoma humano (que suele representar el 99% de la muestra). Entre los enfoques disponibles se incluyen la digestión enzimática del ADN libre humano mediante DNAsas selectivas, el uso de sondas de captura por hibridación que eliminan secuencias humanas o métodos químicos que eliminan preferentemente ADN metilado. Si solo se busca la detección de virus, se puede incluir una filtración por membranas de 0,22 µm. A continuación, se preparan las librerías de secuenciación y se procede a la secuenciación masiva, que debe realizarse en un secuenciador de alto rendimiento, ya que es necesario un elevado número de lecturas por muestra. El análisis bioinformático mínimo incluye: 1) control de calidad de las lecturas crudas, 2) eliminación de secuencias humanas mediante alineamiento con el genoma de referencia, y 3) clasificación taxonómica de las secuencias no humanas comparando contra bases de datos actualizadas. Se recomienda incluir controles negativos (blancos de extracción y secuenciación) para descartar contaminantes de laboratorio y aplicar umbrales de detección (número mínimo de lecturas, cobertura y profundidad) para evitar falsos positivos.

Los hallazgos deben interpretarse con precaución y correlacionarse con el contexto clínico del paciente. Siempre que sea posible, se sugiere la confirmación mediante técnicas ortogonales (p. ej., PCR específica o serología), teniendo en cuenta las limitaciones de este abordaje (referidas en el apartado 5.2.4).

7.4. SEROLOGÍA

La detección de anticuerpos IgM y/o IgG frente a virus neurotrópicos en suero puede realizarse mediante diversos ensayos comerciales validados. Como ya se explicó en el apartado 5.1, antes de realizar serología en LCR es imprescindible confirmar la integridad de la barrera hematoencefálica, ya que su alteración puede permitir el paso pasivo de anticuerpos desde el suero, impidiendo distinguir si su origen es intratecal. El índice de albúmina (relación LCR/suero), obtenido mediante técnicas como la turbidimetría, es el método más común para evaluar esta integridad; se considera barrera intacta si el índice es <0,0075. Solo en ese caso puede interpretarse la presencia de anticuerpos específicos en LCR como síntesis intratecal, indicativa de infección activa del SNC. En situaciones con barrera alterada, la detección de IgG o IgM en LCR no permite asegurar su origen. No obstante, la detección de IgM en LCR conserva valor diagnóstico en ciertos virus, como arbovirus neuroinvasores.

7.5. AISLAMIENTO EN CULTIVO

7.5.1. Preparación de tubos de cultivo de tejidos: Se deben disponer viales con monocapas confluyentes de las líneas celulares adecuadas, preferentemente listo para su uso (shell-vials, ver 5.1).

7.5.2. Preparación de la muestra: El LCR puede inocularse directamente en los viales de cultivo. Las orinas se deben neutralizar con NaOH, comprobando la neutralidad del pH con papel indicador. Las orinas neutralizadas y los exudados deben tratarse con la solución de descontaminación con antibióticos y antifúngicos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7.5.3. Inoculación en viales: Inocular 200 microlitros de muestra por vial. Centrifugar a 700 × g durante 45 minutos para facilitar la penetración viral en las células.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición Nº 01	Página 10 de 12

7.5.4. Mantenimiento de viales y fijación: incubar los viales a 35–37 °C con 5% de CO₂ durante 24–72 horas, según el virus sospechado (24–48 h para HSV/VZV, 48–72 h para CMV). Finalizada la incubación, se retira el medio y se fija la monocapa celular con acetona fría (–20 °C, 10 minutos) o metanol-acetona, según el protocolo del kit.

7.5.5. Tinción y observación: realizar tinción de la monocapa fijada mediante inmunofluorescencia directa (IFD), aplicando un anticuerpo monoclonal fluorescente específico que se incuba durante 30–60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras lavar con PBS, se monta con medio apropiado y se coloca cubreobjetos. La lectura se realiza al microscopio de fluorescencia (filtro FITC), observando fluorescencia nuclear (HSV/VZV) o nuclear y citoplásmica (CMV). Si no hay señal, puede prolongarse la incubación hasta 5-7 días, y repetir la tinción o volver a inocular. Alternativamente, pueden extraerse ácidos nucleicos directamente del sobrenadante o células infectadas y realizar PCR para confirmar la identidad del virus.

7.6 CONTROL DE CALIDAD

- Comprobar que los ensayos comerciales empleados tienen marcado CE (o aprobación regulatoria equivalente) y que están validados para su uso en LCR.
- Participación en ejercicios de intercomparación externos (Programa de Control de Calidad de la SEIMC) para evaluar el rendimiento de los métodos del laboratorio en el diagnóstico molecular y serológico de infecciones del SNC.
 - Incluir controles en cada serie de pruebas para asegurar la confiabilidad de los resultados.
 - Verificar fechas de caducidad y condiciones de almacenamiento de todos los reactivos antes de usarlos.
 - Realizar mantenimiento y calibración periódica de los equipos (termocicladores, cabinas, etc.), así como verificar regularmente la caducidad y correcto almacenamiento de los reactivos, siguiendo las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de PCR se reportarán por agente, como positivo o negativo (detectado/no detectado). Todo resultado debe ser interpretado en el contexto clínico-epidemiológico del paciente. En el caso particular de los paneles sindrómicos, debe especificarse en el informe qué virus han sido analizados, incluso si el resultado es negativo, para que el clínico conozca el alcance del cribado realizado. Si no se obtiene señal del control interno, se repetirá la extracción y la PCR, ya que suele deberse a inhibidores o errores técnicos. Si el resultado persiste sin señal del control, se informará como: “No es posible emitir un resultado debido a la presencia de inhibidores de la amplificación en la muestra”.

La cuantificación de carga vírica en LCR no tiene relevancia clínica en la mayoría de infecciones del SNC, ya que la detección de genoma viral en este contexto es siempre significativa y suele ser transitoria, por lo que no se realiza seguimiento de carga. En caso de emitir un resultado cuantitativo, el laboratorio deberá establecer (o guiado por lo que aparece en los de kits comerciales) los rangos de variabilidad de la técnica, necesarios para calcular intervalos de confianza; sin ellos, no se debe emitir una carga viral numérica. Por último, en el caso de emitir resultados derivados de secuenciación masiva (bien sea mNGS o amplicones), se recomienda indicar el punto de corte de profundidad (o número de lecturas) que se considera necesario por parte del laboratorio o casa comercial para validar un hallazgo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición Nº 01	Página 11 de 12

La serología se informará siguiendo las indicaciones del fabricante, habitualmente como positivo, negativo o indeterminado, para cada marcador (IgM, IgG) y tipo de muestra (suero, LCR). Si no puede realizarse determinación en LCR por índice de albúmina inválido, esta circunstancia se indicará expresamente en el informe.

En caso de disponer de técnicas de cultivo, el resultado se informará como negativo o positivo, especificando en este último caso el virus aislado. Si la línea celular no puede mantenerse durante el periodo de observación, se informará como contaminado (por sobrecrecimiento bacteriano o fúngico) o tóxico (por efectos citopáticos directos de la muestra). Se recordará al clínico que el valor predictivo negativo del cultivo en LCR es limitado para la mayoría de los virus.

Se recomienda añadir observaciones que faciliten la interpretación clínica siempre que se ajusten al contexto. Por ejemplo:

- La detección de múltiples virus o virus inesperados requiere valoración crítica. Esto es especialmente relevante en resultados obtenidos a partir de mNGS, donde es más habitual este tipo de hallazgos.
- La detección de HHV-6 en LCR puede deberse a reactivación latente sin relevancia clínica o a integración cromosómica (presente en el 1% de la población general). Ante un resultado positivo, se sugiere cuantificar HHV-6 en sangre periférica y/o investigar su integración (por PCR en cabello o dPCR en sangre).

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio clínico 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 pre-analítica de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción e identificación de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras. El personal técnico del laboratorio de Microbiología es responsable de la recepción y almacenamiento de las muestras, de la realización de las técnicas (cultivos, PCR, ELISA, etc.), 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 propio, 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 clínicos receptores de los resultados en cuanto a su correcta interpretación. Asimismo, el facultativo 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 o consultas.

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 tanto, solo se deben rechazar muestras de LCR bajo circunstancias muy justificadas y tras consulta con el médico responsable del paciente (ver 4.4).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Víricas del Sistema Nervioso Central	PNT-SNC-03	
		Edición N° 01	Página 12 de 12

En niños pequeños el volumen de muestra puede ser muy limitado y en ocasiones muy inferior al establecido como mínimo; por lo que deben establecerse prioridades en las pruebas a realizar y, en ocasiones, incluso procesar volúmenes menores de lo ideal, lo cual puede afectar a la sensibilidad de las técnicas (circunstancia que habrá de reflejarse en el informe de resultados, indicando, por ejemplo: “volumen de LCR escaso, resultado negativo a interpretar con cautela”).

11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Incluso con las técnicas actuales más sensibles, diversos estudios muestran que solo en el 40-60% de los casos de encefalitis se logra identificar el agente causal; el resto permanece sin etiología confirmada. Esto puede deberse a la existencia de patógenos no incluidos en las pruebas realizadas, a una toma de muestra tardía o inadecuada (cuando el virus ya no es detectable en LCR), a infecciones localizadas donde el patógeno no se libera al LCR (p. ej., abscesos, encefalitis focal), o a etiologías no infecciosas (p. ej., encefalitis autoinmunes) que deben considerarse en el diagnóstico diferencial cuando los estudios microbiológicos resultan negativos. Por tanto, un resultado negativo obliga a replantear diagnósticos alternativos y, en casos seleccionados, puede justificarse el envío de muestras a centros especializados para técnicas avanzadas (mNGS, investigación de autoanticuerpos en LCR, etc.), puede deberse a la existencia de patógenos no incluidos en las pruebas realizadas, a una toma de muestra tardía o inadecuada (cuando el virus ya no es detectable en LCR), a infecciones localizadas donde el patógeno no se libera al LCR (p. ej., abscesos, encefalitis focal), o a etiologías no infecciosas (p. ej., encefalitis autoinmunes) que deben considerarse en el diagnóstico diferencial cuando los estudios microbiológicos resultan negativos. Por tanto, un resultado negativo obliga a replantear diagnósticos alternativos y, en casos seleccionados, puede justificarse el envío de muestras a centros especializados para técnicas avanzadas (mNGS, investigación de autoanticuerpos en LCR, etc.).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2023;76(Suppl3):S155–S164. doi:10.1093/cid/ciad018.
2. Carroll KC, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 13th ed. Washington, DC: ASM Press; 2023 Sep 13.
3. Leber AL, Burnham CAD, eds. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 5th ed. Washington, DC:ASM Press; 2023 Mar 21.
4. Pérez-Roth E, Martró E, Morón A, editores. *Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas*. 2.ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2023.
5. UpToDate. *Viral encephalitis in adults*. Última revisión: 2025.
6. Marx PA et al. Metagenomic next-generation sequencing in patients with infectious meningoencephalitis: a comprehensive systematic literature review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2024;11(6):ofae206.