

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ENCEFALITIS POR  
MÉTODOS MOLECULARES EN QUERÉTARO”.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**DIANA IRAÍS SALINAS BAUTISTA**

DIRIGIDA POR

**M. en IBB. JOSÉ CARMEN GUDIÑO ROSALES**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ENCEFALITIS POR  
MÉTODOS MOLECULARES EN QUERÉTARO”.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**DIANA IRAÍS SALINAS BAUTISTA**

**DIRIGIDA POR**

**M. en IBB. JOSÉ CARMEN GUDIÑO ROSALES**

**SINODALES**

**M. en IBB. JOSÉ CARMEN GUDIÑO ROSALES  
DIRECTOR**

**Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES  
SINODAL**

**Dr. CARLOS FRANCISCO SOSA FERREYRA  
SINODAL**

**Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ  
SINODAL**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Encefalitis viral	3
II.2 Patogénesis y manifestaciones clínicas de las infecciones virales	3
II.3 Incidencia de la encefalitis y/o meningitis	5
II.4 Patógenos	6
II.4.1 Virus del Herpes	6
II.4.1.1 Virus del Herpes Simple	6
II.4.1.2 Virus del Herpes Humano 6	7
II.4.2 Flavivirus	8
II.4.2.1 Virus del Oeste del Nilo	9
II.4.3 Enterovirus	9
II.4.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
II.5 El diagnóstico de las infecciones virales en el SNC	11
II.6 PCR y RT-PCR	13
II.6.1 PCR y RT-PCR estándar	13
II.6.2 PCR y RT-PCR tiempo real	14
II.7 RNAsa P humana	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
IV.1 General	18
IV.2 Específicos	18
V. METODOLOGÍA	19

V.1 Materiales	19
V.1.1 Reactivos	19
V.1.2 Equipo y materiales	20
V.1.3 Software	21
V.2 Métodos	21
V.2.1 Extracción de ácidos nucleicos	21
V.2.2 Amplificación	22
V.2.2.1 PCR	24
V.2.2.1.1 PCR tiempo real	24
V.2.2.1.2 PCR estándar	24
V.2.2.2 RT-PCR	25
V.2.2.2.1 RT-PCR tiempo real	25
V.2.2.2.2 RT-PCR estándar	26
V.2.3 Electroforesis	28
V.2.4 Historias clínicas	29
V.3 Diseño experimental	29
VI. RESULTADOS	31
VI.1 Datos epidemiológicos	31
VI.2 Amplificaciones de DNA	33
VI.2.1 Detección de Herpes Simple	35
VI.2.2 Detección de Virus del Oeste del Nilo	36
VI.2.3 Detección de Flavivirus (RT-PCR genérico)	36
VI.2.4 Detección de Enterovirus	37
VI.2.5 Detección de <i>M. Tuberculosis</i>	38
VI.2.1 Detección de Herpes Humano 6	39
VI.2.1 Detección de la RNAsa P humana	39
VII. DISCUSIÓN	41
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. BIBLIOGRAFÍA	46

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunos agentes virales causantes de la encefalitis viral humana (DeBiasi y Tyler, 2004; Gastón y col., 2008).	4
2	Información de los oligonucleótidos.	23
3	Condiciones de las distintas fases de la reacción de amplificación por PCR tiempo real y estándar.	26
4	Condiciones de las distintas fases de la reacción de amplificación por RT-PCR tiempo real y estándar.	27
5	Condiciones de las distintas fases de la reacción de amplificación por PCR en dos pasos para EV.	28
6	Resultados de PCR y RT-PCR.	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diseño experimental.	30
2	Distribución por sexo, en porcentajes, de hombres (M) y mujeres (F).	31
3	Distribución por edad, en porcentajes, por categorías.	31
4	Frecuencia por mes del inicio de síntomas.	32
5	Distribución de los síntomas más frecuentes, mostrados en las historias clínicas anexas.	32
6	Ejemplos del análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, para los ensayos de PCR y RT-PCR.	33
7	Ejemplos del análisis por curvas de disociación de DNA, para los ensayos de PCR y RT-PCR tiempo real, con SYBR Green.	34
8	Ejemplo del análisis para la detección de HSV por PCR tiempo real con SYBR Green.	35
9	Ejemplo del análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, de la amplificación por RT-PCR estándar.	36
10	Ejemplo del análisis para la detección de EV por RT-PCR tiempo real con SYBR Green.	37
11	Ejemplo del análisis para la detección de Mtb por PCR tiempo real con SYBR Green.	38
12	Análisis por curva de amplificación mediante PCR tiempo real, con sonda, para la detección de RP.	39

## RESUMEN.

La encefalitis es un proceso inflamatorio del sistema nervioso central, causado principalmente por infecciones bacterianas y virales. Debido a que las manifestaciones clínicas son muy semejantes en la mayoría de los casos, es difícil determinar al patógeno causante. El Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro, recibe muestras de pacientes con cuadro clínico compatible con encefalitis, etiquetadas para la búsqueda del patógeno más probable, de acuerdo con la(s) características clínicas. Sin embargo, entre el 2008 y 2009, la cifra de los casos en donde no se encontró el patógeno cuyo diagnóstico fue solicitado, alcanzan el 79.3% de las muestras. Con el fin de reducir este porcentaje, se procesaron 23 muestras de líquido cefalorraquídeo, se realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar o descartar la presencia de *M. tuberculosis*, virus del herpes simple y del herpes 6; y de PCR acoplado a la transcripción reversa (RT-PCR) para enterovirus, virus del Nilo y otros Flavivirus; y se analizaron las historias clínicas anexas a las muestra en cuanto a las manifestaciones clínicas proveídas. El resultado de este análisis permitió conocer que la mayoría de las muestras son de pacientes masculinos, de 0 a 11 años, cuyo inicio de síntomas fue predominante en el mes de enero, presentando cefalea, fiebre y convulsiones, en la mayoría de los casos. Se logró detectar la presencia de *M. tuberculosis* en dos muestras y de virus del herpes simple en una, habiendo identificado la presencia del agente infeccioso en 3/23 (13%). Sin embargo, no se logró disminuir la cantidad de casos, en los que no se identificó algún patógeno.

## I. INTRODUCCIÓN.

La encefalitis es un proceso inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) con diversas características clínicas, entre las principales están dolores de cabeza, fiebre y alteraciones del estado mental. Esta inflamación es causada por la infección de diferentes agentes, como bacterias, parásitos, hongos y virus.

La mayoría de los casos de encefalitis son de origen bacteriano o viral, aunque en muchas ocasiones resulta difícil definir su etiología. Debido a que la encefalitis tiene un significativo grado de morbilidad y mortalidad, es importante conocer al patógeno causante de la infección, ya que con ello resulta más fácil dar un tratamiento o manejo adecuado al paciente.

El Sistema Nacional de Salud realiza la vigilancia epidemiológica de meningitis, meningitis meningocócica, meningitis por *Haemophilus Influenzae*, meningoencefalitis amebiana primaria, parálisis flácida aguda y meningitis tuberculosa, que pueden dar una idea de la situación estadística de la encefalitis, ya que en ocasiones son parte de la sintomatología y es posible interrelacionarlas.

El promedio de estas enfermedades, a nivel nacional entre el 2004 y 2009, fue de 1594 casos detectados por año. De estos, aproximadamente el 82.1% corresponden a meningitis y parálisis flácida aguda, que son, en su mayoría, los casos en los que el patógeno no ha sido identificado, por lo que se pueden tomar como referencia para visualizar el reto en la identificación de los patógenos causantes de la infección.

En el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro, las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con características clínicas compatibles con encefalitis, se reciben etiquetadas para la búsqueda de un patógeno causal probable, de acuerdo con la sospecha clínica. Sin embargo de las muestras que se



recibieron en el área de diagnóstico molecular entre el 2008 y 2009, el resultado del PCR, para el patógeno solicitado, fue negativo en el 100%. No obstante cuando se utilizó un algoritmo de diagnóstico, en el cual cada muestra se somete a una segunda prueba de PCR, cuando la primera es negativa, se logró dar un resultado positivo a algún patógeno (*Mycobacterium tuberculosis* o virus del herpes simple) en el 20.7 % de ellas.

Por lo anteriormente descrito, el propósito de este trabajo es validar la implementación de un diagnóstico diferencial, es decir un procedimiento por el cual se identifique al patógeno causal mediante la exclusión de otros agentes que presenten un cuadro clínico semejante. Y así mismo conocer a los patógenos causantes de la encefalitis de mayor frecuencia en el estado. Con ello se pretende reducir el número de muestras en las cuales no se identifica a un patógeno como el probable responsable del cuadro clínico.

Para este fin, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a sus ventajas de sensibilidad y tiempo respecto a otras técnicas de diagnóstico. Con esta técnica se analizaron muestras de LCR, para detectar o descartar la presencia de *M. tuberculosis*, virus del herpes simple y del herpes 6. También se utilizó una variante de esta técnica denominada PCR acoplado a la transcripción reversa (RT-PCR), esta para detectar o descartar enterovirus, virus del oeste del Nilo y otros Flavivirus.

## **II. ANTECEDENTES.**

### **II.1 Encefalitis viral.**

La encefalitis es un proceso inflamatorio del parénquima cerebral causado por una infección (Rey-Pérez, 2005). A menudo se puede hablar de “meningoencefalitis” debido a que la reacción inflamatoria alcanza el líquido cefalorraquídeo (LCR) y produce síntomas de irritación meníngea, o a que el agente infeccioso puede infectar simultáneamente el encéfalo y las meninges (Álvarez-Hernández y col., 2006). Al igual que otras infecciones del sistema nervioso central (SNC), la etiología puede ser de origen bacteriano, parasitario, micótico y viral, de las cuales las más comunes son las bacterianas y virales (Gastón y col., 2008). Se conoce que existen más de 150 virus (Cuadro 1) que pueden causar la encefalitis viral humana (Glaser y col., 2006; Yao y col., 2009).

Para algunos virus las infecciones del SNC son comunes como parte benigna del síndrome (Ejemplo: Virus de las paperas). En otros virus estas forman parte de la característica clínica predominante (Ejemplo: Virus de la encefalitis japonesa). También existen virus en las que la infección inevitablemente y exclusivamente resulta en una enfermedad del SNC (Ejemplo: Rabia). Por último están los virus, como los del herpes (Ejemplo: Herpes simple), que ocasionalmente causan encefalitis (Whitley y Gnann, 2002).

### **II.2 Patogénesis y manifestaciones clínicas de las infecciones virales.**

El acceso de los virus al SNC puede ocurrir por la ruta hematológica o neuronal. La primera se da después de una viremia, por la inoculación directa del virus, es la más común y puede resultar en la alteración de la barrera hemato-encefálica, ejemplo de esto son las infecciones de enterovirus (EV). La ruta alternativa es el acceso al sistema nervioso por la vía intraneuronal, después del contacto con las

terminaciones nerviosas en sitios especializados (sistema olfativo, mucosa entérica, labios, córnea, etc.). En esta el virus se replica localmente y los viriones son transportados por los axones y antes de alcanzar la médula espinal, los virus son llevados al hipotálamo y tallo cerebral. Ejemplos de esto son: el virus del herpes simple (HSV), el cual puede ingresar por el tracto olfatorio, y de la rabia, que afecta al sistema límbico (Coria-Lorenzo y col., 2001; Whitley y Gnann, 2002).

Cuadro 1. Algunos agentes virales causantes de la encefalitis viral humana (DeBiasi y Tyler, 2004; Gastón y col., 2008).

Ejemplos de virus causantes de la encefalitis viral humana	
Grupo	Ejemplos
Herpes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herpes simple 1 y 2</li> <li>• Varicela-Zoster</li> <li>• Citomegalovirus</li> <li>• Virus de Epstein-Barr</li> <li>• Herpes humano 6, 7 y 8</li> </ul>
Mixovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Influenza</li> <li>• Parainfluenza</li> <li>• Parotiditis (virus de las paperas)</li> <li>• Sarampión</li> </ul>
Arbovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavivirus: virus del oeste del Nilo, Encefalitis japonesa, Encefalitis de San Luis, Encefalitis de Europa central, Encefalitis Rusa.</li> <li>• Togavirus: Encefalitis equina del oeste, Encefalitis equina del este, Encefalitis equina venezolana.</li> <li>• Bunyavirus: Encefalitis de California</li> </ul>
Picornavirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enterovirus</li> <li>• Coxsackievirus</li> <li>• Poliovirus</li> <li>• Rinovirus</li> </ul>
Arenovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus de la coriomeningitis linfocítica</li> </ul>
Rabdovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rabia</li> </ul>
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus linfotrópico humano 1 y 2</li> <li>• Virus de la inmunodeficiencia humana</li> </ul>
Papovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus de John Cunningham</li> <li>• Virus BK</li> </ul>

Las características clínicas de la encefalitis son muy variadas pero la fiebre, el dolor de cabeza y alteración del estado mental permiten distinguir una encefalitis de una disfunción cerebral por causas no infecciosas (Whitley y Gnann, 2002; DeBiasi y

Tyler, 2004). Otras características comunes incluyen: desorientación, cambios en el comportamiento, trastornos del lenguaje (disfasia), cefalea, disminución de la fuerza motora o parálisis parcial (hemiparesia), convulsiones, alteración en el estado de conciencia; además pueden presentarse vómitos, crisis epilépticas, incapacidad para producir o comprender el lenguaje (afasia), pérdida o disminución del olfato (anosmia), trastorno de la memoria o alteración de los pares craneales, entre otros (Whitley y Gnann, 2002; Rey-Pérez, 2005).

No obstante, no están descritos los síntomas de manera específica para cada patógeno, un ejemplo de ello se puede observar con el cuadro clínico causado por HSV, que inicialmente puede presentar cefalea, malestar general, fiebre y vómito. Subsecuentemente la mayoría de los pacientes, experimenta alteraciones del campo visual, ataxia (incoordinación), hemiparesia y crisis convulsivas. Debido a la predisposición del virus por los lóbulos temporal y frontal se pueden encontrar datos clínicos como afasia, anosmia, crisis convulsivas del lóbulo frontal. Sin embargo otros virus como el del herpes seis (H6) también pueden presentar un cuadro similar a este (Coria-Lorenzo y col., 2001).

### II.3 Incidencia de la encefalitis y/o meningitis.

Glaser y colaboradores, realizaron un estudio observacional prospectivo de 1998 al 2005, en California, EUA. A partir de 1570 pacientes con encefalitis; se confirmaron o identificaron los agentes causales de un 16% (248), de estos, las etiologías más importantes fueron la viral (69%) y la bacteriana (20%). Los virus identificados con más frecuencia fueron EV con un 25% y HSV con un 24% (Glaser y col., 2006).

El Sistema Nacional de Salud realiza la vigilancia epidemiológica de: meningitis, meningitis meningocócica, meningitis por *Haemophilus Influenzae*, meningoencefalitis amebiana primaria, parálisis flácida aguda y meningitis tuberculosa, indicando que existen, en la República Mexicana, entre el 2004 y

2009, 1594 casos detectados por año, que pueden interrelacionarse con aquellos casos de meningoencefalitis. De estos datos, los casos en los cuales el patógeno no ha sido identificado, en su mayoría, se agrupan en la vigilancia de meningitis y parálisis flácida aguda, y representan el 82.1% del total. Con ello se puede visualizar el reto que representa la identificación de los patógenos causantes de la infección (CENAVECE, 2009).

A nivel estatal, se tomaron de referencia estadística, a partir de los registros en bitácoras, los datos de las muestras de LCR, con características clínicas compatibles con encefalitis o meningitis, recibidas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Querétaro (LESPQ). Estas muestras se analizan para la identificación de un patógeno solicitado, sin embargo, entre el 2008 y 2009, el 79.3% de estas quedaron sin una identificación positiva a algún patógeno (LESPQ, 2010).

## II.4 Patógenos.

### II.4.1 Virus del Herpes

La familia de los herpes virus (*Herpesviridae*) se divide en tres subfamilias: alpha-herpesvirinae, beta-herpesvirinae y gamma-herpesvirinae. Su genoma está compuesto por DNA de doble cadena (Acha y Szyfres, 2003; Virtanen, 2008). Varios virus pertenecientes a esta familia son capaces de provocar una infección del SNC (Cuadro 1), entre ellos se consideran el virus del herpes simple y el virus del herpes humano 6 (DeBiasi y Tyler, 2004; Gastón y col., 2008).

#### II.4.1.1 Virus del Herpes Simple.

El virus del herpes simple pertenece a la subfamilia alpha-herpesvirinae. Su tamaño es de 180-200 nm de diámetro con una simetría icosaédrica. Existen dos tipos de

herpes simple, el 1 y 2 (Acha y Szyfres, 2003; Virtanen, 2008). El gran tamaño de su genoma le permite codificar numerosas proteínas de replicación y del metabolismo celular, lo que le permite persistir intracelularmente y por lo tanto mantenerse en la población. Su replicación tiene lugar principalmente en las células epiteliales humanas, de aquí su material genético puede ser encapsulado y trasladado al sistema nervioso (Ulla-Díez, 2001; Sapp y col., 2006).

El HSV es una de las causas más comunes de encefalitis, principalmente el HSV tipo 1, al igual que uno de los que provoca las infecciones del CNS más devastadoras, con altos niveles de morbilidad y mortalidad, aun con el tratamiento cerca de la mitad de los pacientes mueren o quedan en un estado de deterioro avanzado (Big y col., 2009).

#### II.4.1.2 Virus del Herpes Humano 6.

El H6 pertenece a la subfamilia de los virus del herpes, betaherpesvirinae. Existen dos variantes: la A (H6A) y la B (H6B), homologas en su genoma en un 95%, sin embargo difieren en su epidemiología, ya que mientras la variante H6B es la causa del exantema súbito, la variante H6A aún no tiene una participación definida, aunque se le atribuyen los desórdenes neurológicos (Virtanen, 2008; Yao y col., 2009).

La infección primaria ocurre durante los primeros tres años de edad en arriba del 90% de los niños a través del mundo y un tercio presenta una invasión al SNC. De igual manera, las enfermedades cerebrales también han sido reportadas durante la reactivación de la infección (DeBiasi y Tyler, 2004; Virtanen, 2008).

La mayoría de los casos han sido reportados en los pacientes inmunocomprometidos pero también hay casos en personas inmunocompetentes, donde la manifestación clínica de encefalitis es la mas común y representa

aproximadamente el 7% de los casos de encefalitis por virus de la familia del herpes (DeBiasi y Tyler, 2004; Virtanen, 2008).

En un estudio realizado por Yao y colaboradores, en California, se analizaron a 35 pacientes con encefalitis, en un periodo de 6 meses entre febrero y agosto de 2006, resultando positivos para H6 en un 40% (Yao y col., 2009).

#### II.4.2 Flavivirus.

Los flavivirus son virus con un diámetro de 40-60 nm, con una nucleocápside esférica y pequeñas proyecciones superficiales de glicoproteína E, importante para la adhesión del virus y la entrada a las células del hospedero. Su genoma contiene RNA de cadena sencilla.

Una vez inoculados en el hospedero se reproducen en los tejidos locales y nódulos linfáticos, luego se disemina por la vía linfática al conducto torácico y luego por la corriente sanguínea, en esta parte es importante la respuesta inmune del huésped para controlar la replicación viral antes de que el virus penetre al cerebro (Solomon, 2004; Romero-Cabello, 2007).

Algunos de los virus que forman parte de esta familia y que ocasionan encefalitis son: virus del oeste del Nilo, Encefalitis japonesa (EJ), Encefalitis de San Luis, Encefalitis de Europa central, Encefalitis Rusa, Encefalitis del valle de Murray, virus del Rocío y virus de Powassan. De estos se puede catalogar al virus de EJ como uno de los mas importante, después del virus del oeste del Nilo, ya que en Asia provoca entre 30,000 y 50,000 casos de encefalitis y 10,000 fallecimientos anuales (Solomon, 2004; Gastón y col., 2008).

Recientemente se sugiere que el virus del dengue puede causar, directamente, una infección en el SNC. Los virus del dengue tipo 2 y 3 han sido aislados a partir de

LCR de pacientes con encefalitis. Al igual que el virus tipo 4, el cual ha sido detectado por inmunohistoquímica y RT-PCR, en el núcleo inferior y en la capa granular del cerebelo. También se ha visto en estudios con animales que el virus es capaz de liberar citosinas que pueden alterar la barrera hemato-encefálica (Murthy, 2010).

#### II.4.2.1 Virus del Oeste del Nilo.

Es un virus de genoma RNA de cadena sencilla con un diámetro aproximado de 50 nm, perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Se divide en dos linajes genéticos, al linaje 1 se le han atribuido los casos de encefalitis humana. Generalmente, es transmitido a humanos por medio de la picadura de mosquitos, infectando la corriente sanguínea o el tejido subcutáneo donde se lleva a cabo la replicación inicial del virus. Cuando la barrera hemato-encefálica se altera, el virus puede penetrar hacia el CNS infectando directamente a las neuronas (Acha y Szyfres, 2003; Hayes y col., 2005).

En Estados Unidos (2010), de las infecciones totales del VON el 62% fueron infecciones neurológicas. Sin embargo, para México los casos de infección por este virus son escasos, no obstante se mantiene bajo vigilancia de acuerdo con el Reglamento Sanitario Internacional (CDC, 2010; CENAVECE, 2009; RSI, 2005).

#### II.4.3 Enterovirus.

Los enterovirus forman parte de la familia de *Picornaviridae* y tiene un tamaño pequeño (22-30 nm de diámetro) con un genoma de RNA de cadena sencilla, con polaridad positiva. Incluyen más de 100 serotipos divididos en 5 grupos que son poliovirus, enterovirus humano A, B, C y D (Ausina-Ruiz y Moreno-Guillén, 2005; Hymas y col., 2008). Generalmente ingresan por la vía enteral, y se localizan en la faringe y en el intestino delgado, donde ocurre la primera replicación y más tarde en



el sistema reticuloendotelial (hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea). Muchas veces el virus detiene su replicación en el intestino o en el sistema reticuloendotelial. Si esto no sucede, se puede producir otra viremia con diseminación al CNS (Coria-Lorenzo y col., 2001; Ausina-Ruiz y Moreno-Guillén, 2005).

Son el agente infeccioso en aproximadamente el 26% de los casos en adultos con infecciones del CNS. Aunque las infecciones ocurren principalmente durante el verano y otoño, pueden ocurrir durante todo el año y son difíciles de distinguir de los cuadros clínicos bacterianos. Para los EV el PCR a partir de LCR ha resultado ser un análisis sensible y con capacidad para reducir costos, ya que el tiempo de diagnóstico y tratamiento es más rápido, la estancia hospitalaria y los costos que esta implica también se reducen (Big y col., 2009).

#### II.4.4 *Mycobacterium tuberculosis*.

De los agentes no virales que causan la encefalitis el más común es *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), esta infección representa el 1% de los casos totales (137 casos por 100 000 habitantes), de infecciones causadas por este patógeno (Glaser y col., 2006; WHO, 2010; Cherian y Thomas, 2011). No obstante las características que presenta el LCR de pacientes infectados con este patógeno son muy semejantes a aquellas presentes en las infecciones virales (Glaser y col., 2006).

*M. tuberculosis* pertenece al género de *Mycobacteriaceae* y es un bacilo pequeño, no móvil y aerobio obligatorio, y se distingue por ser el principal agente de la tuberculosis (Schaible y Haas, 2009). Este entra a los pulmones por inhalación y coloniza a los macrófagos dentro de los alvéolos, diseminándose a los nódulos linfáticos y al torrente sanguíneo. Después de esto pueden esparcirse al sistema circulatorio y así atravesar la barrera hemato-encefálica (Be y col., 2009).

## II.5 El diagnóstico de las infecciones virales en el SNC.

Para obtener una orientación hacia la etiología de los patógenos causantes de la infección, primeramente se revisan las características epidemiológicas como: edad del paciente, época del año, exposición a animales, enfermedades familiares, vacunaciones recientes, enfermedades prevalentes en la comunidad, viajes, actividades y riesgos ocupacionales (Palencia, 2000; Whitley y Gnann, 2002). Por ejemplo al final del verano e inicio del otoño predominan los EV y en verano los virus transmitidos por artrópodos como el VON, entre otros flavivirus (González, 2005). Para la confirmación o diagnóstico específico se realizan otros estudios, como los que se refieren más adelante.

Varios de los estudios necesitan la extracción del LCR, por medio de una punción lumbar. Este presenta ciertas características en las infecciones virales como son: una presión normal o alta, un aspecto incoloro y transparente (agua de roca), leucocitos por  $\text{mm}^3$  mayores a 1000, en su mayoría células mononucleares; sus niveles de proteína son elevados (0.5-1.0 g/L) y sus niveles de glucosa son discretamente reducidos (glucosa LCR/glucosa sérica  $< 0.6$ ) o normales (Coria-Lorenzo y col., 2001; Gastón y col., 2008). De igual manera se pueden realizar estudios a partir de una biopsia cerebral, sin embargo no se lleva a cabo de manera habitual, ya que se corre el riesgo de hemorragia o sobreinfección (Palencia, 2000).

Entre los estudios que se realizan, tanto como orientación como para confirmación o diagnóstico, están: los análisis sanguíneos, donde se mide la velocidad de sedimentación; las modificaciones en la cantidad de glóbulos blancos; el tipo de proteínas en suero y los títulos de interferón ( $\text{IFN-}\alpha$ ), que son indicadores biológicos cuyos niveles se modifican en una infección (Palencia, 2000). También se realizan pruebas serológicas para la detección de anticuerpos IgM, cultivos y pruebas de tinción Gram, que permiten identificar algunos patógenos bacterianos, como *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* (Gastón y col., 2008).

Otros estudios que se realizan son: el electroencefalograma, la resonancia magnética nuclear y la tomografía computarizada. Estos generalmente sirven para valorar la evolución del paciente y diferenciar las infecciones de otros procesos distintos como son: hematomas, tumores y accidentes vasculares; pocas veces ayudan en la identificación de la etiología. La tomografía también se utiliza cuando hay sospecha de hipertensión endocraneal, antes de extraer el LCR para evitar complicaciones (Palencia, 2000; Gastón y col., 2008).

Por último se puede resaltar la técnica de amplificación de ácidos nucleicos mediante de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta permite la identificación del patógeno mediante la síntesis *in vitro* de millones de copias de un fragmento de DNA propio de este. La síntesis también se puede llevar a cabo a partir de RNA, para lo cual antes de realizar el PCR, se sintetiza el DNA complementario (cDNA) con la enzima transcriptasa reversa. A esta técnica se le denomina RT-PCR (Coria-Lorenzo y col., 2001; DeBiasi y Tyler, 2004).

La amplificación de DNA tiene varias ventajas respecto a los otros estudios de identificación. Por ejemplo, respecto a los métodos de cultivo, facilita el análisis de aquellos organismos difíciles de cultivar, y reduce el tiempo del diagnóstico, ya que el tiempo de cultivo puede ser de entre 1 hasta 28 días, mientras que un PCR se realiza en aproximadamente 24 horas. Otra ventaja ante estos es que el PCR mantiene su sensibilidad aun después de un corto tiempo de la administración de antibióticos o antivirales (DeBiasi y Tyler, 2004).

También presenta ventajas ante la pruebas serológicas, ya que permite realizar el diagnóstico en la fase aguda de la infección, cuando existe mayor replicación viral, a diferencia de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que requiere que transcurran de 2 a 4 semanas después de la infección, para detectar los títulos de anticuerpos, y cuando la presencia del virus ya no es tan frecuente. Por último, el PCR a partir de LCR es menos invasivo que la biopsia cerebral (DeBiasi y Tyler, 2004).

## II.6 PCR y RT-PCR.

### II.6.1 PCR y RT-PCR estándar.

El PCR estándar consiste en el empleo de dos oligonucleótidos (oligos) que flanquean un fragmento o gen de interés. Estos se utilizan como iniciadores para la síntesis de DNA a partir de un molde o muestra de DNA desnaturalizado. El procedimiento se basa principalmente en tres etapas. La primera es la desnaturalización que se lleva a cabo por un calentamiento (95-98 °C) donde el molde de DNA, de doble cadena, es separado en cadenas sencillas. La segunda etapa es la hibridación en la cual los oligos se unen a la cadena sencilla que es complementaria a su secuencia, la temperatura usada depende de esta secuencia (50-70 °C). La última etapa es la síntesis, donde se inicia la amplificación de la cadena complementaria mediante la DNA polimerasa, a 72 °C, a partir de los oligos y en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (Alberts y col., 2004; Jiménez-Cardoso, 2004; Smith, 2004; Clark, 2005).

Estos tres pasos comprenden un ciclo y se repiten generalmente de 25 a 40 veces, obteniendo al final una acumulación exponencial de copias del fragmento de DNA, de interés. Por último el DNA generado se analiza por medio de electroforesis en gel, técnica que sirve para separar y purificar el DNA, por tamaño (pares de bases, pb), esto debido a su carga intrínseca, negativa, que al aplicar un campo eléctrico migrara hacia el electrodo positivo. Así mismo debido a la composición del gel, el cual puede estar compuesto de agarosa o poliacrilamida, se forma una red que dificulta el paso de las moléculas de mayor tamaño por lo que los fragmentos de menor tamaño migraran más rápido (Alberts y col., 2004; Smith, 2004; Clark, 2005).

Estos geles pueden ser teñidos con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las moléculas de DNA, y al ser sometido a luz UV produce una fluorescencia naranja, que permite observar la migración de los fragmentos. Al conocer el tamaño del

fragmento de interés se puede comparar su migración con la de un marcador de peso molecular, colocado en uno de los carriles de gel, con fragmentos de DNA de tamaños conocidos (Clark, 2005).

El ensayo de RT-PCR estándar se puede utilizar para aquellos virus cuyo material genético es el RNA. El procedimiento involucra dos pasos: la fabricación de una copia de cDNA a partir del RNA y la amplificación de este mediante PCR (Clark, 2005).

#### II.6.2 PCR y RT-PCR tiempo real.

El PCR y RT-PCR tiempo real combinan la técnica del PCR/RT-PCR con la detección del producto amplificado por medio de moléculas fluorescentes, que se pueden ir observando mientras ocurre la amplificación (Espy y col., 2006).

Una forma de detección del producto amplificado en el PCR/RT-PCR tiempo real, es el empleo del fluorocromo SYBR Green, que se une solamente al DNA de doble cadena y al hacerlo puede emitir fluorescencia a una longitud de onda de 530 nm. Sin embargo la detección del producto de DNA no es específica por lo que se recurre al análisis de la disociación del producto. Este análisis permite determinar la temperatura de disociación ( $T_m$ ) del producto específico, la cual depende de su porcentaje de guaninas más citosinas (Clark, 2005; Espy y col., 2006).

El análisis de disociación del producto se realiza calentando a 95°C, posterior a la amplificación, a continuación se enfría a 50-60°C y se calienta paulatinamente hasta 95°C, al mismo tiempo que se colecta la fluorescencia emitida. Conforme aumenta la temperatura el DNA se desnaturaliza perdiendo fluorescencia. La pérdida de fluorescencia es mayor al alcanzar la temperatura específica de disociación, del producto de amplificación. Al graficar la primera derivada negativa de la fluorescencia,  $-(d/dt)$ , contra la temperatura (°C), se obtiene un pico que

representa la  $T_m$  a la cual disocia el producto específico. Así, una muestra positiva será aquella que presenta el pico a la  $T_m$  correspondiente (Hoffmann y col., 2007).

Otro método de detección es mediante sondas fluorescentes. Una de las más usadas son las sondas TaqMan que consisten en una molécula de DNA, de cadena sencilla, complementaria al DNA blanco. Dos fluoróforos flanquean esta secuencia: un fluoróforo unido a 5' denominado molécula reportera (Ejemplo: 6-carboxifluoresceína, FAM) y el otro unido a 3' denominado molécula apagadora (Ejemplo: Blackhole Quencher 1, BHQ1). Debido a que ambos fluoróforos se encuentran muy cerca la señal de fluorescencia emitida por la molécula reportera es capturada (apagada) por el apagador. Al ocurrir la síntesis de DNA durante la amplificación, la enzima Taq polimerasa, con su actividad nucleasa, corta la sonda permitiendo que se separen los fluoróforos lo que elimina el efecto apagador. Conforme se sintetiza el DNA específico ocurre la acumulación de fluorescencia debido a la degradación de la sonda (Clark, 2005; Espy y col., 2006).

Las curvas de amplificación se forman mediante la señal de fluorescencia de la molécula reportera. La representación gráfica es la diferencia entre la señal de fluorescencia de todos los componentes y la señal de la línea basal o el valor detectado en el control negativo ( $\Delta R_n$ ), esto en función al número de ciclos. Para interpretar los resultados se coloca una línea umbral por arriba del ruido de fondo, aquellas gráficas de amplificación que crucen esta línea se consideran positivas a la amplificación de interés. El punto en donde las gráficas atraviesan la línea basal se denomina ciclo umbral (Ct) y dependerá de la cantidad de DNA (Dorak, 2007).

## II.7 RNAsa P humana.

La ribonucleasa P humana (RNAsa P humana) es una ribonucleoproteína compuesta de al menos diez subunidades protéicas. Los análisis bioquímicos de su purificación muestran la existencia de una gran cantidad de esta en el núcleo

celular, de igual manera los análisis de inmunofluorescencia demuestran que subunidades de la RNAsa P (RP) se encuentran en distintos compartimientos celulares como el nucléolo y el nucleoplasma (Liu y Altman, 2010).

De acuerdo con los experimentos de Luo y colaboradores, los oligonucleótidos y la sonda de la RNAsa P pueden servir como control positivo interno para monitorear la calidad de la muestra, la extracción de ácidos nucleicos y para la detección de inhibidores de la reacción de PCR (Luo y col., 2005).

### **III. HIPÓTESIS.**

La implementación de un diagnóstico diferencial por PCR o RT-PCR, para la búsqueda de los patógenos virales, reportados como más frecuentes, en el diagnóstico de encefalitis, permitirá reducir el porcentaje de muestras clínicas en las que no se identifica un patógeno como el causante del cuadro clínico.



## **IV. OBJETIVOS.**

### IV.1 General.

Detectar o descartar la presencia de HSV H6, EV, Mtb, VON u otros flavivirus, mediante la amplificación de DNA en muestras de LCR de pacientes con sospecha de encefalitis y/o meningitis de etiología viral o causada por *M. tuberculosis*.

### IV.2 Específicos.

- Establecer un banco de muestras de LCR de pacientes con cuadro clínico compatible con encefalitis y/o meningitis de etiología viral o causada por *M. tuberculosis*.
- Detectar o descartar la presencia de HSV, H6 y Mtb, mediante PCR en los ácidos nucleicos totales obtenidos del LCR.
- Detectar o descartar la presencia de EV, VON u otros flavivirus, mediante RT-PCR en los ácidos nucleicos totales obtenidos del LCR.
- Analizar la posible correlación entre los resultados de la amplificación de DNA con la sintomatología manifestada en las historias clínicas.

## V. METODOLOGÍA.

### V.1 Materiales.

#### V.1.1 Reactivos.

- Kit para la extracción de ácidos nucleicos totales: “MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit” (Roche).
- Kit para la amplificación en tiempo real a partir de DNA: “LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I” (Roche).
- Kit para la amplificación en tiempo real a partir de DNA: “TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase<sup>®</sup> UNG” (Applied Biosystems).
- Kit para la amplificación a partir de DNA: “iTaq<sup>™</sup> DNA polymerase” (Bio-Rad).
- Kit para la amplificación en tiempo real a partir de RNA: “LightCycler RNA Master SYBR Green I” (Roche).
- Kit para la amplificación a partir de RNA: “OneStep RT-PCR Kit” (QIAGEN).
- Kit para la amplificación a partir de RNA: “iScript One-Step RT-PCR Kit” (Bio-Rad).
- Kit para la síntesis del cDNA: “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche).
- Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) 10mM.
- Agua libre de DNAasas y RNAsas ( $H_2O_{PCR}$ ).
- Marcador de peso molecular “AmpliSize Molecular Ruler 50-2000bp Ladder” (Bio-Rad).
- Poliacrilamida al 40% (Mezcla acrilamida-bisacrilamida 19:1).
- TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina).
- Amortiguador TBE10X (Tris 1 M, Ácido bórico 1 M, EDTA 20 mM, pH 8.3).
- Glicerol 50%.
- Persulfato de amonio 10% (APS10%).
- Agua destilada (dH<sub>2</sub>O).

- Bromuro de etídio 1X (10 µg/mL).
- Colorante de muestras Sample Loading Buffer 5X (Bio-Rad).
- Mezcla de oligonucleótidos HSV (5 pmoles/µL).
- Mezcla de oligonucleótidos EV (1.5 pmoles/µL).
- Mezcla de oligonucleótidos Mtb (2.5 pmoles/µL).
- Mezcla de oligonucleótidos VON (2.5 pmoles/µL).
- Mezcla de oligonucleótidos H6 (5 pmoles/µL): H6-R y H6-F.
- Mezcla de oligonucleótidos H6 (10 pmoles/µL): 397F y 493R.
- Oligonucleótidos Flavivirus: mFU1 forward primer (40 pmoles/µL) y CFD2 reverse primer (40 pmoles/µL).
- Oligonucleótidos Flavivirus: mFU-Fw (40 pmoles/µL) y CDF-Rv (40 pmoles/µL).
- Mezcla de oligonucleótidos RP (40 µM) y sonda RP (20 µM) (Biosearch Technologies).
- Control positivo HSV (c+HSV): Exudado faríngeo de paciente con infección activa de herpes labial.
- Control positivo de EV: Exudado faríngeo de muestras de pacientes con enfermedad febril exantemática (c+EV) y una dilución 1:10 (c+EV 10<sup>-1</sup>).
- Control positivo VON (c+VON): Sobrenadante de cultivo de virus del oeste del Nilo.
- Control positivo flavivirus: Sobrenadante de cultivos de virus del dengue de los serotipos 1, 2 y 4 (c+D1, c+D2 y c+D4) y de VON (c+VON).
- Control positivo *M. tuberculosis*: Diluciones seriadas 1:10 (10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>) de la cepa vacunal BCG (c+Mtb 10<sup>-4</sup> y c+Mtb 10<sup>-5</sup>).
- Control positivo para RP (c+RP): Exudado faríngeo de muestra humana.

#### V.1.2 Equipo y materiales.

- Microcentrífuga Eppendorf 5415 D.
- Centrifuga IEC CL40R (Thermo Scientific).
- Termociclador estándar C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad).

- Termociclador en tiempo real LightCycler 2.0 (Roche).
- Termociclador en tiempo real 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
- Agitador Vortex Genie 2 (Daigger).
- Equipo de electroforesis para mini geles de poliacrilamida con fuente de poder PowerPac Basic (Bio-Rad).
- Fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).
- Tubos capilares de 20  $\mu$ L para PCR (Roche).
- Charola para tinción de geles.
- Magneto.
- Micropipetas de volumen variable de 0.5-10, 2-20, 20-200 y 200-1000  $\mu$ L.
- Puntas con filtro para micropipetas de 10, 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
- Tubos eppendorf estériles de 1.5 mL y 0.2 mL.
- Placas de 96 pozos, 200  $\mu$ L.
- Tiras de 8 tapas ópticas Micro Amp (Applied Biosystems).
- Guantes de nitrilo estériles.
- Batas desechables.

### V.1.3 Software.

- LightCycler Software 4.1 (Roche).
- 7500 Fast System Sequence Detection Software 1.4 (Applied Biosystems).
- Quantity One 1-D Analysis Software 4.6.8 (Bio-Rad).

## V.2 Métodos.

### V.2.1 Extracción de ácidos nucleicos.

Antes de la extracción, para algunas muestras, se centrifugaron 500  $\mu$ L de LCR a 13 300 rpm durante 90 min., se retiraron 300  $\mu$ L de sobrenadante y los 200  $\mu$ L

restantes se utilizaron en la extracción de ácidos nucleicos, esto con la finalidad de incrementar la sensibilidad del ensayo, al concentrar las posibles partículas virales de la muestra.

Las muestras y los controles positivos se procesaron con el Kit MagNA Pure. Se colocaron 200  $\mu$ L de la muestra de LCR o control positivo, se añadieron 200  $\mu$ L de buffer de lisis y 100  $\mu$ L de proteinasa K. Se mezcló con el vortex por 20-30 seg. y se incubó por 10 min. A continuación se anexaron 150  $\mu$ L de perlas magnéticas y se mezclaron en el vortex por 5 seg. Se dejó reposar por 15-20 seg. (con repeticiones mezclar-reposar de 5-10 veces hasta completar 4-5 min.). De ser necesario después del mezclado se centrifugaron 5 seg. a 5,000 rpm, para colectar toda la muestra al fondo. Se capturó el botón de perlas con la ayuda de un magneto y se retiró el sobrenadante.

A este botón se le añadió 1 mL de buffer de lavado I, se mezcló 5 seg., se capturaron las perlas y se descartó el sobrenadante como se describió arriba. Se agregaron 500  $\mu$ L del buffer de lavado II, se mezcló 5 seg., se capturaron las perlas y se descartó el sobrenadante. Después se añadió 1 mL de Buffer de lavado III, se mezcló 5 seg., se capturaron las perlas y se descartó el sobrenadante. Por último se agregaron 100  $\mu$ L de buffer de elusión, se incubó 10 min. a 60°C. Se recuperó el sobrenadante con ácidos nucleicos en solución y se almacenó a 4°C (máximo una semana) o a -20 o -70°C (indefinido) hasta su uso.

### V.2.2 Amplificación.

Después de la extracción, los ácidos nucleicos se sometieron a una amplificación mediante PCR ó RT-PCR, para esto se usaron diferentes pares de oligonucleótidos (oligos), específicos para amplificar un fragmento de material genético, propio de cada patógeno a buscar, así mismo se utilizaron un par de oligos y una sonda TaqMan, específicos para el gen humano RP, como control de calidad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Información de los oligonucleótidos.

Patógeno	Oligos	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)*	Secuencia genética	Tamaño de Amplicón	Referencia
EV	EV-PCR1	ACA CGG ACA CCC AAA GTA GTC GGT CC	71.5	5' NTR	114pb	Oberste y col., 2000
	EV-PCR2	TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C	78.1			
VON	WN-ntr-F	CCC AAT GTC AGA CCA CGC T	62.3	3' NTR	99pb	No publicados
	WN-ntr-R	GGG GCG TTG GTT TGC CT	62.0			
Mtb	INS-1	CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	71.0	Elemento de Inserción IS6110	245pb	Mirza y col., 2003
	INS-2	GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA	66.9			
HSV	TK-HSV-f	GAC MAG CGC CCA GAT AAC AA	51.8	Timidin Quinasa (TK)	335pb	Mitchell y col., 1997
	TK-HSV-r	MCA GCA TRG CCA GGT CAA GC	53.8			
H6	H6-R	CGC TAG GTT GAG GAT GAT CGA	62.6	Marco abierto de lectura U67	133pb	Locatelli y col., 2000
	H6-F	CAA AGC CAA ATT ATC CAG AGC G	60.8			
	493R	CGG AGT TAA GGC ATT GGT TGA	59.9	Gen U22	99pb	Collot y col., 2002
	397F	TCG AAA TAA GCA TTA ATA GGC ACA CT	60.8			
Flavivirus	mFUI	TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AAA AA	69.5	Dominio RNA polimersa de la proteína NS5	Aprox. 266pb	Chien y col., 2006
	CFD2	GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC	80.5			Modificación Chien y col., 2006
	CDF-Rv	GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TC	76.2			
	mFU-Fw	TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG A	66.7			
RP	RP-F	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	64.1	RNAasa P	65pb	Luo y col., 2005.
	RP-R	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	63.0			
	RP-P	FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1	72.8			

\*Temperatura de Disociación.

### V.2.2.1 PCR.

#### V.2.2.1.1 PCR tiempo real.

Las mezclas de reacción para la amplificación a partir de DNA se prepararon con el Kit FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup>. Se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla 5X, previamente adicionada con la enzima; 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de oligos, la concentración de las mezclas o oligos para cada patógeno esta indicada en los materiales; y 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ , por cada reacción, colocando 7  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción en cada capilar. A continuación se sembraron 3  $\mu\text{L}$  de control negativo ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ ) en el primer capilar, y así se continuó sembrando las muestras en el orden correspondiente, en los siguientes capilares, y en los últimos capilares el o los controles positivos. Después estos capilares se centrifugaron 5 seg. a 6,000 rpm, se colocaron en el termociclador LigthCycler y se corrieron con el protocolo correspondiente (Ver Cuadro 3).

Como control de calidad del los ácidos nucleicos extraídos, se realizó un PCR para la detección del gen RP. La mezcla de reacción se preparó con el estuche TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X); para cada muestra se añadieron 4.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ , 1.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de oligos y sonda, y 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla Master 2X; colocando 16  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y 4  $\mu\text{L}$  del control negativo, la muestra o el control positivo, en cada pozo. La placa se centrifugó 2 min. a 1500 rpm y se colocó en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System para su análisis (Cuadro 3).

#### V.2.2.1.2 PCR estándar.

Aunque se intento, no se logró contar con una muestra o cultivo de H6 que pueda ser utilizado como control positivo (en México no hay quien trabaje aislamientos de este virus). Debido a ello, se trabajó con dos juegos de oligos (H6-R/H6-F ó

397F/493R) para el análisis de este patógeno mediante PCR estándar, con el Kit iTaq™ DNA polymerase.

Cada mezcla estaba constituida por 2.0 µL de Buffer 10X, 2.0 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µL de la mezcla de dNTP's (10mM), 1.0 µL de la mezcla de oligos correspondiente, 0.3 µL de la enzima taq polimerasa y 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>. En cada tubo se añadieron 18 µL de la mezcla de reacción y 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, (control negativo) o muestra clínica. Los tubos se colocaron en el termociclador C1000 Thermal Cycler con el programa para PCR estándar de H6 (Cuadro 3).

#### V.2.2.2 RT-PCR.

##### V.2.2.2.1 RT-PCR tiempo real.

Para la detección de los virus con genoma de RNA, las mezclas de reacción para la amplificación se prepararon con el Kit RNA Master. Por cada reacción, se colocaron 1.6 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, 0.65 µL de Mn (OAc)<sub>2</sub>, 1 µL de la mezcla de oligos y 3.75 µL de la mezcla 2.7X. De la mezcla de reacción se colocaron 7 µL y se añadieron 3 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, muestra o control positivo; en cada capilar. Estos capilares se centrifugaron (6,000 rpm, 5 seg.), se colocaron en el termociclador LigthCycler y se programó con el protocolo correspondiente (Ver Cuadro 4).

Como alternativa para aumentar la sensibilidad del ensayo, para la detección de enterovirus, se realizó un RT-PCR en dos pasos. La síntesis por separado del cDNA, se llevo acabo con el kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit",. Cada mezcla de reacción estaba constituida por 4 µL de Buffer 5X, 0.5 µL de inhibidor de RNAsa, 2 µL de dNTP's, 0.5 µL de enzima retrotranscriptasa, 1 µL de el oligo anti-sentido o 1 µL de oligo dT y 2 µL de los hexámeros al asar, propios del kit; y 7 µL o 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>. Después se colocaron 5 µL de la muestra, del control positivo o del control negativo (H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>), en cada capilar de reacción.



Cuadro 3. Condiciones de las distintas fases de la reacción de amplificación por PCR tiempo real y estándar.

Protocolos para PCR tiempo real

Patógeno	Activación	PCR (40 ciclos)			Disociación			Enfriamiento
		Desnaturalización	Hibridación	Síntesis	Calentamiento	Enfriamiento	Rampa de T (0.05°C/seg)	
Mtb	95°C, 10'	95°C, 5"	64°C, 5"	72°C, 15"	95°C	65°C, 1'	95°C	40°C, 1'
H6			55°C, 5"			55°C, 1'		
HSV			65°C, 5"	72°C, 30"		55°C, 1'		
RP			95°C, 15"	55°C, 30"		-		

Protocolo PCR estándar

Patógeno	Activación	Desnaturalización	Hibridación	Síntesis	Elongación	Enfriamiento
H6	95°C, 2'	PCR (35 ciclos)			72°C, 1'	40°C, 1'
		94°C, 5"	54°C, 5"	72°C, 20"		

(')- Minutos, (")- Segundos.

Los capilares se colocaron en el termociclador C1000 Thermal Cycler para la síntesis de cDNA (paso 1) como se muestra en el Cuadro 5. Del producto de esta síntesis se tomaron 3 µL y se añadieron en una mezcla preparada en un tubo capilar, con el Kit FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup>, que contenía: 2 µL de la mezcla 5X, 1 µL de la mezcla de oligos y 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> que se sometió al PCR (paso 2), en el termociclador LigthCycler (Cuadro 5).

#### V.2.2.2.2 RT-PCR estándar.

La detección del virus del Nilo se realizó mediante el Kit iScript One-Step RT-PCR. En la mezcla de reacción se colocaron 6.8 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, 0.8 µL de la mezcla de oligos, 0.4 µL de la enzima transcriptasa reversa y 10 µL de la mezcla 2X. Se

añadieron 18 µL de la mezcla de reacción y 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, muestra o control positivo, en cada tubo de 0.2mL. La amplificación se llevó a cabo en termociclador C1000 Thermal Cycler con el programa indicado en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de las distintas fases de la reacción de amplificación por RT-PCR tiempo real y estándar.

Protocolo RT-PCR tiempo real

Patógeno	RT	Activación	PCR (40 ciclos)			Disociación			Enfriamiento
			Desnaturalización	Hibridación	Síntesis	Calentamiento	Enfriamiento	Rampa de T (0.05°C/seg)	
EV	61°C, 20'	95°C, 30"	95°C, 10"	69°C, 10"	72°C, 15"	95°C	60°C, 45"	95°C	40°C, 30"

Protocolos de RT-PCR estándar

Patógeno	RT	Activación	PCR (40 ciclos)			Elongación	Enfriamiento	
			Desnaturalización	Hibridación	Síntesis			
VON	50°C, 10'	95°C, 5'	95°C, 10"	60°C, 10"	72°C, 1'	72°C, 2'	40°C, 1'	
Patógeno	RT	Activación	PCR (1 ciclo)			PCR (45 ciclos)		
			Desnaturalización	Hibridación	Síntesis	Desnaturalización	Hibridación	Síntesis
Flavivirus	50°C, 30'	95°C, 15'	50°C, 30"	72°C, 1'	95°C, 15"	48°C, 3'		

(')- Minutos, (")- Segundos.

El análisis para la detección de flavivirus se realizó con el Kit OneStep RT-PCR. Se añadieron 5 µL de Buffer 5X, 1 µL de la mezcla de dNTP's, 0.5 µL del oligo mFU1 o mFU-Fw, 0.5 µL del oligo CFD2 o CDF-Rw, 1 µL de enzima y 12 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>; para cada reacción. Se colocaron 20 µL de esta mezcla más 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>,

muestra o control positivo en cada tubo y se amplificaron en el C1000 Thermal Cycler (Cuadro 4).

Cuadro 5. Condiciones de las distintas fases de la reacción de amplificación por PCR en dos pasos para EV.

Protocolo de RT-PCR en dos pasos para EV

Paso 1		Paso 2						
Desnaturalización	Síntesis de cDNA	PCR (40 ciclos)			Disociación			Enfriamiento
		Desnaturalización	Hibridación	Síntesis	Calentamiento	Enfriamiento	Rampa de T (0.05°C/seg)	
65°C, 10'	55°C, 30'	95°C, 10"	69°C, 10"	72°C, 15"	95°C	60°C, 45"	95°C	40°C, 30"

(')- Minutos, (")- Segundos.

### V.2.3 Electroforesis.

Se preparó una solución de acrilamida al 7.5%, colocando 1.406 mL de poliacrilamida al 40%, 0.750 mL de TBE10X, 1.500 mL de glicerol al 50% y 3.844 mL de dH<sub>2</sub>O. De esta solución se tomaron 5 mL, se le agregaron 15 µL de TEMED y 50 µL de APS 10%, se mezcló y se vertió dentro de los cristales, previamente ensamblados en los soportes para geles; y se colocó el peine. Después de 30 min., se retiró el peine y se lavaron los pozos con dH<sub>2</sub>O. El gel se colocó en el sistema de electrodos de la cámara de electroforesis y se llenaron los pozos con una dilución 1:10 del amortiguador TBE10X (TBE1X).

A continuación se preparó una solución de colorante con 500 µL de glicerol 50%, 400 µL de TBE10X, 100 µL de dH<sub>2</sub>O y 100 µL de colorante 5X comercial. De esta se tomó una gota (~2 µL) para cada producto de la reacción de amplificación. En el primer pozo del gel se colocó 1 µL (250 ng totales) del marcador de peso molecular, mezclado con una gota de colorante; para el siguiente pozo se tomaron

5 µL del producto de la amplificación y se mezcló con una gota y así sucesivamente con todas las muestras amplificadas.

Una vez sembrados todos los productos, se llenó la cámara superior e inferior con TBE 1X; y se corrió a 175 voltios por 45 min. Al terminar se desensambló la cámara y el gel se colocó en una charola para tinción, allí se tiñó con 50 mL de bromuro de etidio 1X (1 µg/mL), incubando a temperatura ambiente durante 2 min. Se retiró la solución y se enjuagó con dH<sub>2</sub>O. Por último se observó en el fotodocumentador y se registro la imagen.

#### V.2.4 Historias clínicas.

De la información asentada en los formatos acompañantes de las muestra se recabó la siguiente información en una base de datos: Número de muestra, sexo y edad del paciente, fecha de inicio de síntomas y de toma de muestra. Así mismo se registró si presentaban los siguientes síntomas: fiebre, fatiga (astenia y adinamia), cefalea, convulsiones, incoordinación (ataxia), cambios de conducta, meningitis, hidrocefalia, parálisis, hipertensión endocraneal, trastorno de la memoria, dolor abdominal, trastorno o incapacidad para producir/comprender el lenguaje (disartria o afasia), vomito, mareos, diarrea y nauseas. La recolección se llevó a cabo dando un código numérico a cada paciente, para mantener su confidencialidad.

#### V.3 Diseño experimental.

Las muestras de LCR que llegaron al LESPQ, con cuadro clínico neurológico, se recolectaron durante el periodo de agosto 2010 a febrero 2011 (se incluyeron en el estudio 8 muestras históricas, colectadas desde 2009 y hasta antes de agosto de 2010). Cada muestra fue sometida a la extracción de ácidos nucleicos totales, después estos ácidos nucleicos se analizaron mediante las técnicas de PCR y RT-PCR, para búsqueda de los diferentes patógenos estudiados (Figura 1).

Para la corroboración del resultado, algunos ensayos de PCR o RT-PCR en tiempo real se analizaron por electroforesis. De igual manera se realizó un PCR para identificar un fragmento de la RNAsa P humana, como comprobación de la calidad de la extracción y para validar los resultados (Figura 1).

De forma paralela se capturó la información relevante de los historiales clínicos anexos a cada muestra. Al terminar de procesar y capturar todas las muestras, se llevó a cabo el análisis de los resultados, considerando la distribución por sexo, edad, el mes del inicio de síntomas y la sintomatología de las muestras, así como los resultados para cada patógeno (Figura 1).

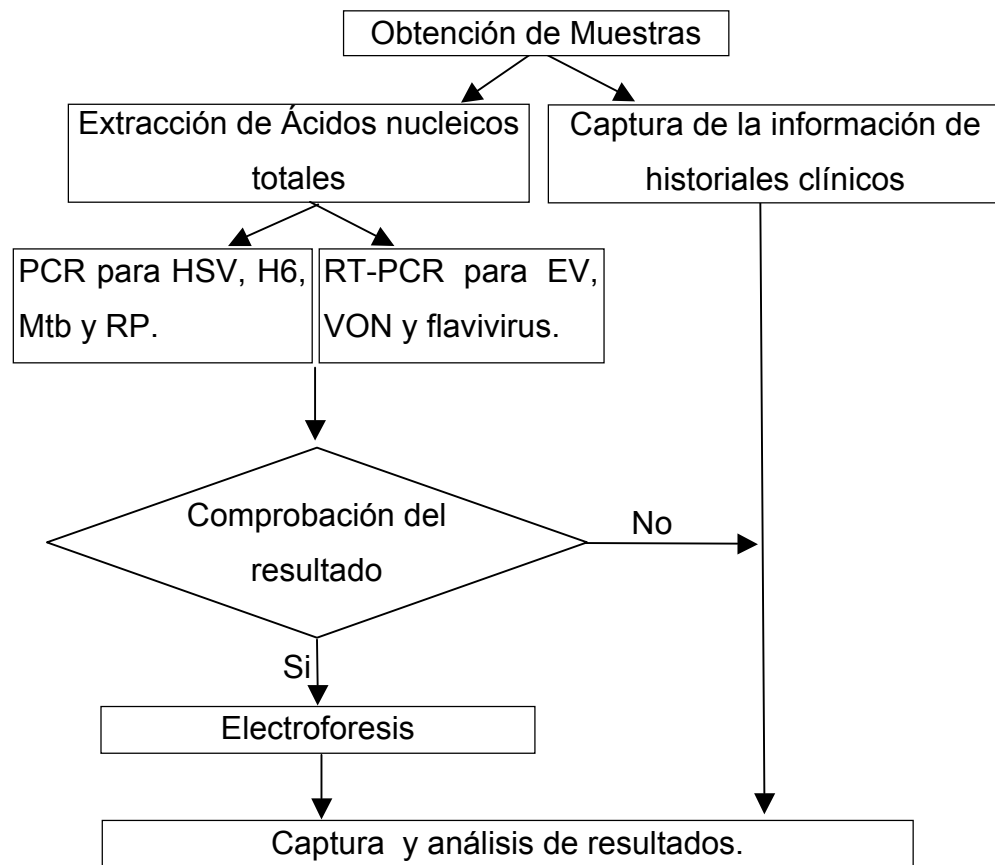


Figura 1. Diseño experimental.

## VI. RESULTADOS.

### VI.1 Datos epidemiológicos.

Se procesaron un total de 23 muestras incluyendo ocho muestras históricas; cinco (1-5) del 2009 y tres muestras (6-8) del 2010, colectadas antes de iniciarse con el trabajo experimental de la tesis. El 60.87% de las muestras correspondió a pacientes de sexo masculino, como se puede observar en la Figura 2. Los grupos de edad en los cuales se colectaron la mayor cantidad de muestras fue de entre los recién nacidos hasta los 11 años (40.91%), seguido de personas entre 48 y 59 años (22.73%), como se muestra en la Figura 3.



Figura 2. Distribución por sexo, en porcentajes, de hombres (M) y mujeres (F).

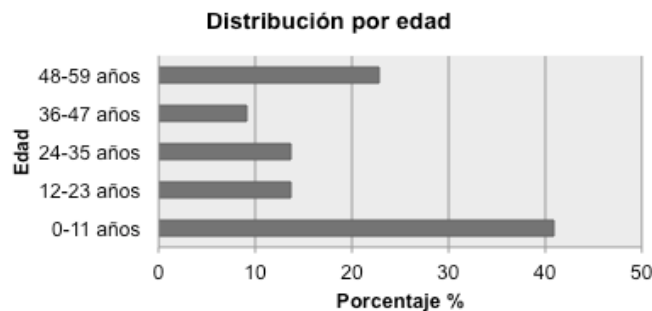


Figura 3. Distribución por edad, en porcentajes, por categorías.

El análisis de la fecha de inicio de síntomas, mostró una mayor frecuencia, de infecciones, en el mes de enero (23%), seguido por los meses de octubre y

septiembre (14% cada uno), mientras que en los meses de agosto y diciembre no se registró ningún caso (Figura 4).

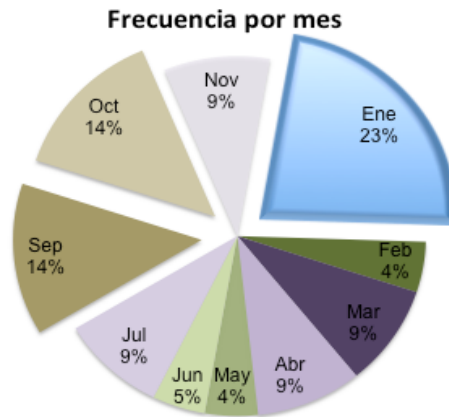


Figura 4. Frecuencia por mes del inicio de síntomas.

En cuanto a la sintomatología que presentó el grupo de pacientes estudiados, se observó principalmente: cefalea en el 50% de los pacientes, fiebre en el 40.9% y convulsiones en el 36.4% de ellos, como se observa en la Figura 5.

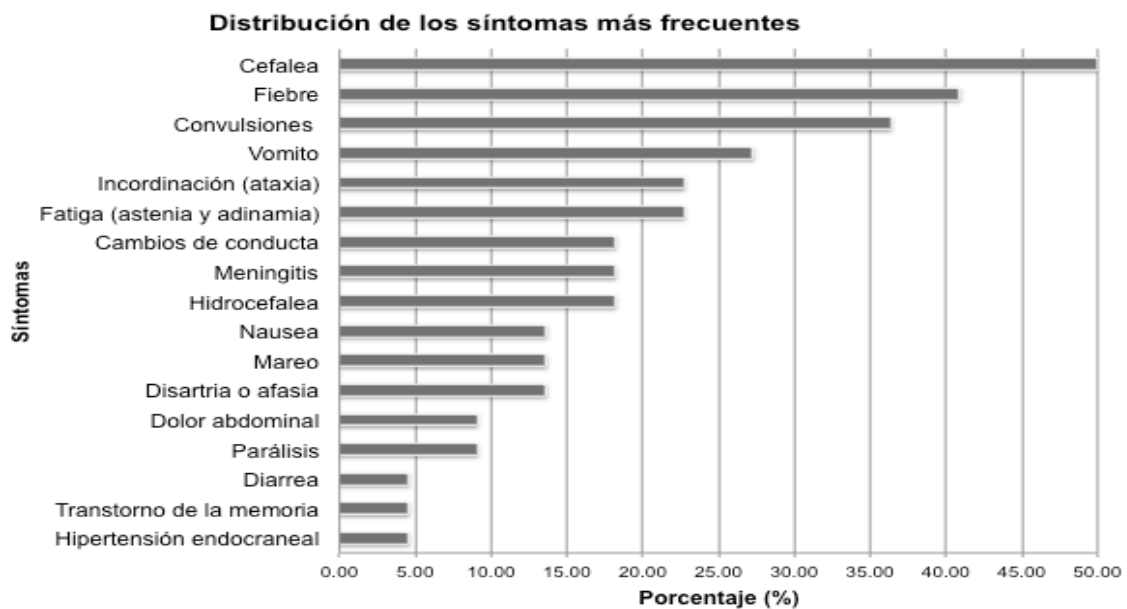


Figura 5. Distribución de los síntomas más frecuentes, mostrados en las historias clínicas anexas.

## VI.2 Amplificaciones de DNA.

Las 23 muestras se emplearon para la búsqueda de los siguientes patógenos: herpes humano 6 (PCR estándar); *Micobacterium tuberculosis* y herpes simple (PCR en tiempo real con SYBR Green); Flavivirus y Virus del Oeste del Nilo (RT-PCR estándar); Enterovirus (RT-PCR en tiempo real con SYBR Green). Los ensayos de PCR y RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en acrilamida. La figura 6 muestra un ejemplo del análisis por electroforesis, para los diferentes patógenos, donde se puede observar el tamaño del fragmento específico para cada uno y su migración en el gel de poliacrilamida.

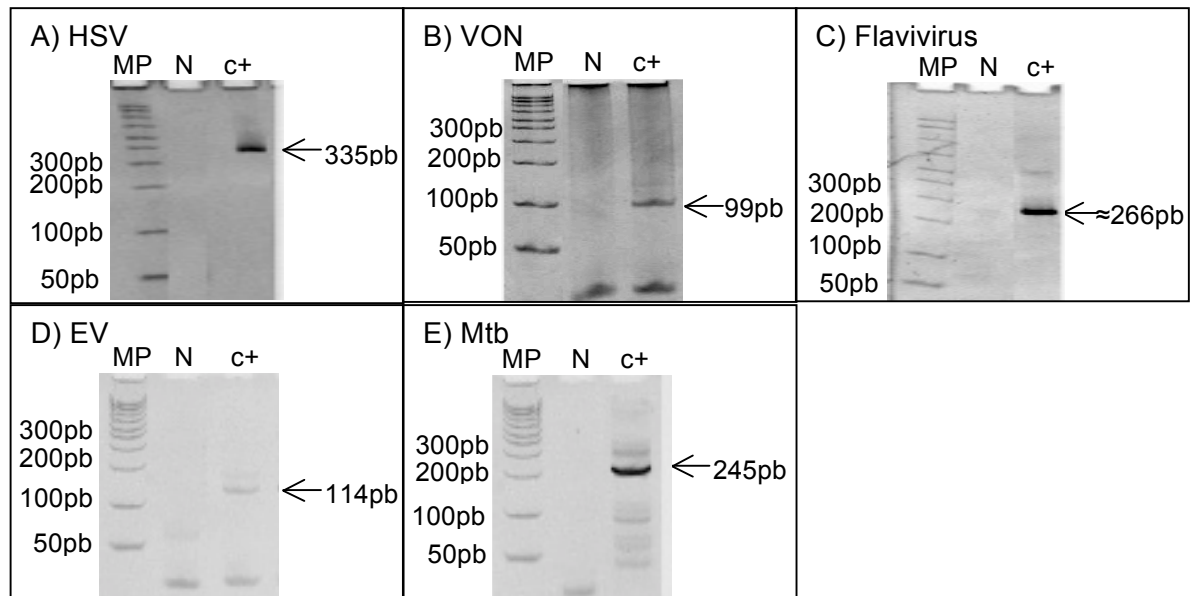


Figura 6. Ejemplos del análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, para los ensayos de PCR y RT-PCR. Detección de: A) HSV, B) VON, C) Flavivirus (mFU1/CFD2), D) EV y E) Mtb. En cada gel se observa el marcador de peso AmpliSize (MP), el control negativo sin DNA (N) y un control positivo específico para el patógeno analizado (c+). Las flechas señalan la posición de la migración del producto específico para cada patógeno.

Para los ensayos de amplificación en tiempo real con SYBR Green, se realizó un análisis de curvas de disociación de DNA para determinar la temperatura de desnaturalización del fragmento específico amplificado para cada patógeno



(además de la electroforesis en acrilamida, del producto de la reacción). La figura 7 muestra un ejemplo del análisis de los amplicones mediante los picos de disociación. Como se puede observar, cada fragmento de amplificación tiene un producto que desnaturaliza a una temperatura específica.

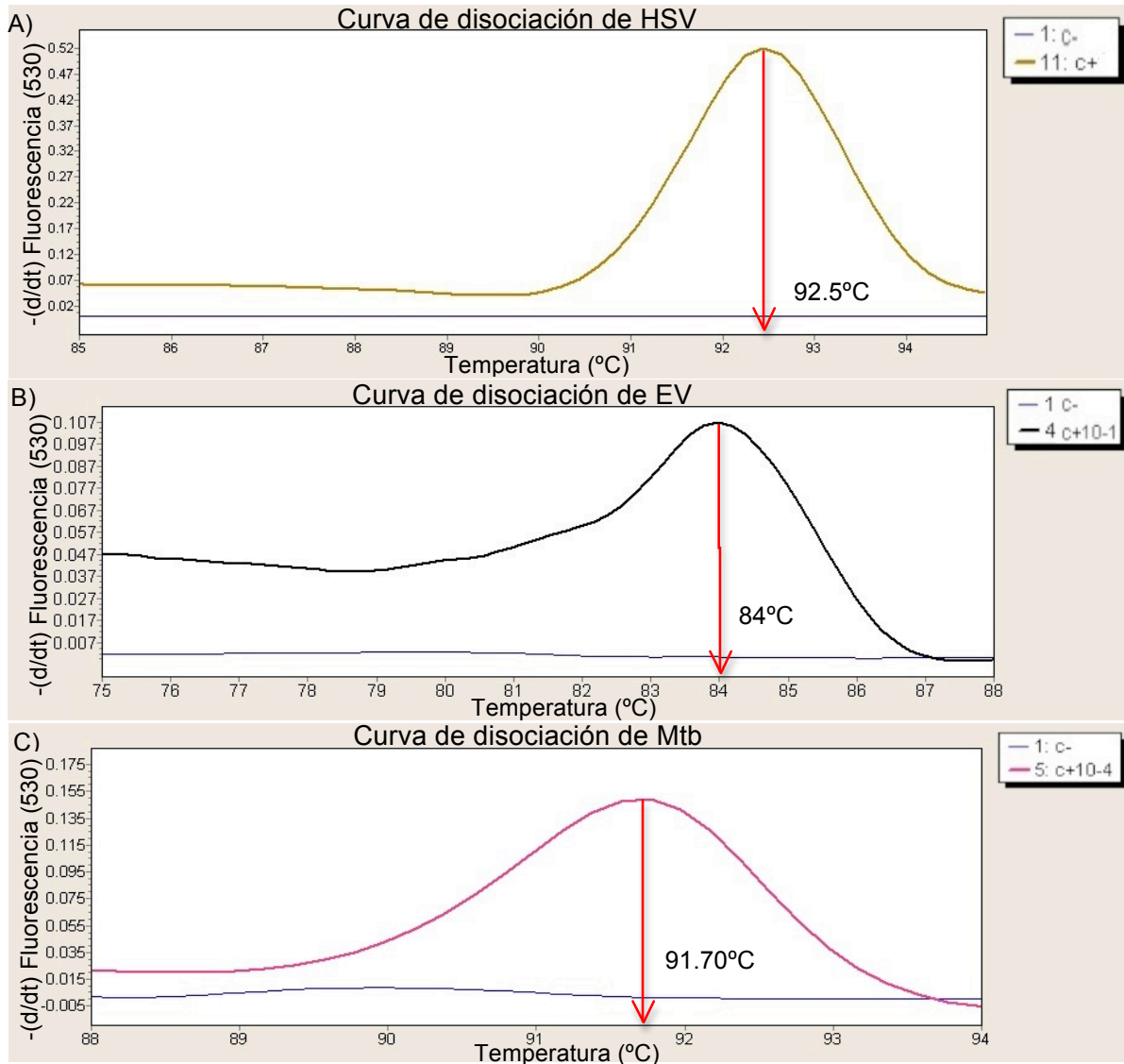


Figura 7. Ejemplos del análisis por curvas de disociación de DNA, para los ensayos de PCR y RT-PCR tiempo real, con SYBR Green. Detección de: A) HSV, B) EV y C) Mtb. En cada gráfica se muestra un control negativo sin DNA (c-) y un control positivo para el patógeno indicado (c+, c+10-1 y c+10-4). La flecha indica el pico a la temperatura de disociación del producto específico para cada patógeno.

## VI.2.1 Detección de Herpes Simple.

De las 23 muestras de LCR procesadas para la detección de herpes simple, solamente la muestra 9 resultó positiva (Cuadro 6). En la Figura 8 se muestra la amplificación del fragmento de 335 pb, del gen de la Timidin Quinasa del virus en la muestra 9 (9) y en el control positivo (c+HSV); analizadas por medio de electroforesis (Figura 8A) y mediante curvas de disociación (Figura 8B).

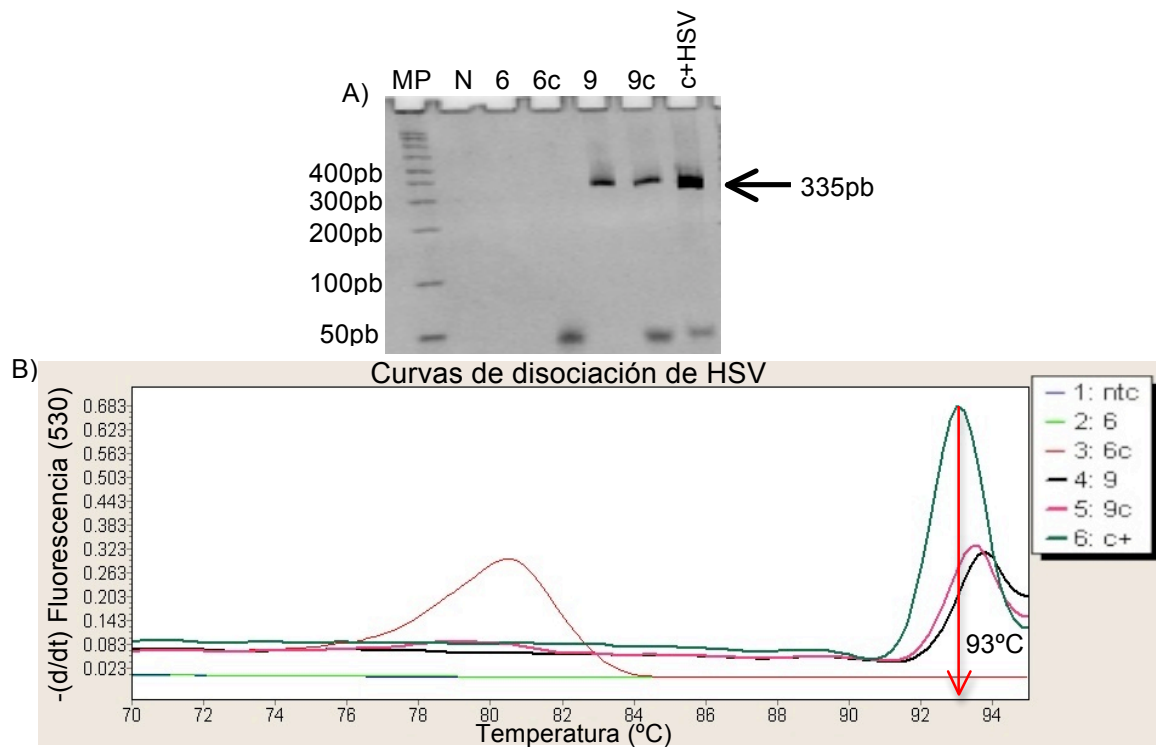


Figura 8. Ejemplo del análisis para la detección de HSV por PCR tiempo real con SYBR Green. A) Por electroforesis en geles de poliacrilamida. Carril 1; marcador de peso AmpliSize (MP), 2; control negativo sin DNA (N ó ntc), 3; muestra 6 (6), 4; muestra 6 centrifugada (6c), 5; muestra 9 (9), 6; muestra 9 centrifugada (9c), 7; control positivo (c+HSV). La flecha señala la posición de la migración del producto específico de 335 pb. B) Por curvas de disociación de DNA. La flecha indica la temperatura de disociación, aproximada, para el producto específico (92.5-94 °C) y la leyenda indica la identidad de cada muestra.

En la Figura 8 también se puede observar que no hay un incrementó en la sensibilidad para la detección al concentrar las muestras por centrifugación (ver

metodología), ya que no se presentó ninguna diferencia entre el resultado de las muestras concentradas (muestras 6c y 9c) y aquellas que no fueron sometidas a una centrifugación previa (muestras 6 y 9).

### VI.2.2 Detección de Virus del Oeste del Nilo.

Las 23 muestras analizadas resultaron negativas para la detección de VON (Cuadro 6). Como se puede observar en el ejemplo de la Figura 9A, donde solo el control positivo (c+VON) amplificó la banda correspondiente al fragmento de 99 pb de la región 3'NTR.

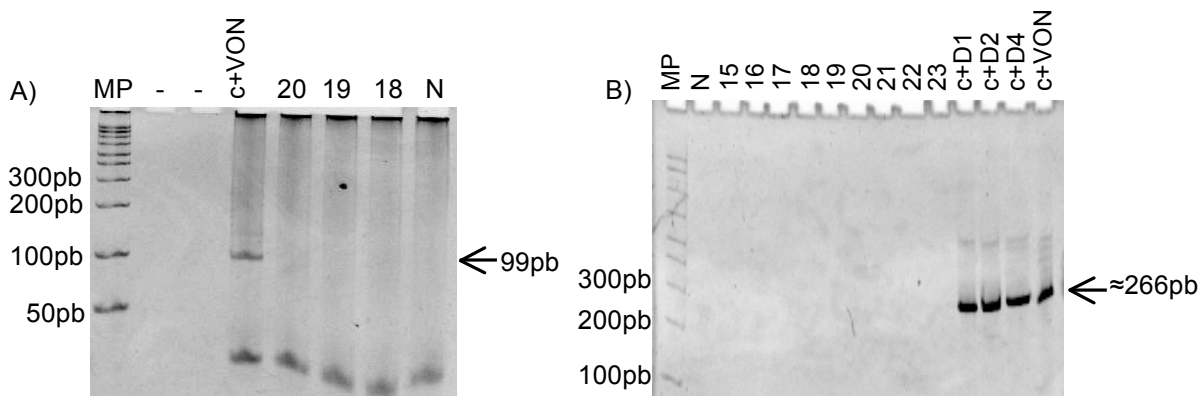


Figura 9. Ejemplo del análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, de la amplificación por RT-PCR estándar. A) Detección de VON. Carril 1; marcador de peso AmpliSize (MP), 2; vacío, 3; vacío, 4; control positivo (c+VON), 5; muestra 20 (20), 6; muestra 19 (19), 7; muestra 18 (18), 8; control negativo sin DNA (N). B) Detección de Flavivirus (mFU1/CFD2). Carril 1; MP, 2; N, 3-11; muestras 15-23 (15-23), 12; control positivo de dengue 1 (c+D1), 13; control positivo de dengue 2 (c+D2), 14; control positivo dengue 4 (c+D4), 15; control positivo VON (c+VON). Las flechas señalan la posición de la migración de los productos específicos de 99 pb y 266pb, respectivamente.

### VI.2.3 Detección de Flavivirus (RT-PCR genérico).

Las muestras estudiadas también resultaron negativas para la presencia de otros flavivirus (Cuadro 6), tanto con los oligos mFU1/CFD2, como con los oligos mFU-Fw/CDF-Rw. En la Figura 9B se observa un ejemplo del ensayo con los oligos

mFU1/CFD2, donde solamente los controles positivos de flavivirus amplificaron la región de 266pb, del dominio de la RNA polimerasa, de la proteína NS5.

#### VI.2.4 Detección de Enterovirus.

Las muestras también se procesaron para la detección de EV, dando en su totalidad negativas (Cuadro 6). La Figura 10A presenta un ejemplo de los ensayos de amplificación del fragmento de 114 pb correspondiente a la región 5'NTR, analizados por electroforesis, y la Figura 10B analizados por medio de curvas de disociación.

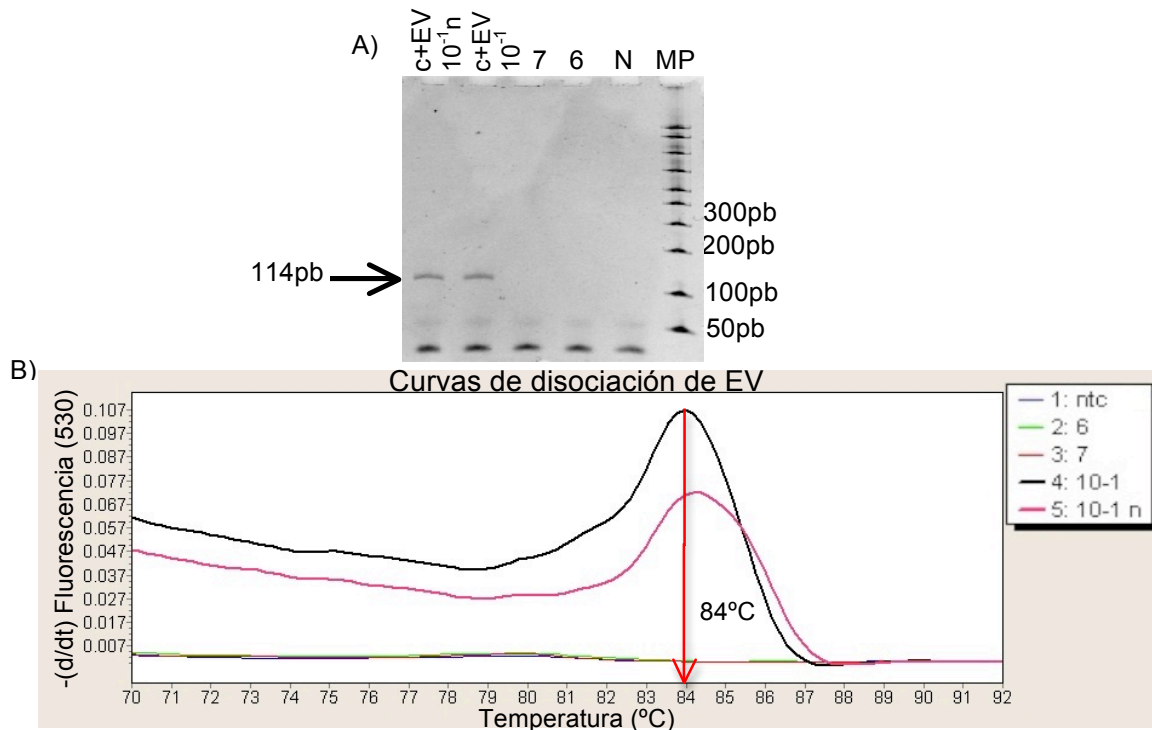


Figura 10. Ejemplo del análisis para la detección de EV por RT-PCR tiempo real con SYBR Green. A) Por electroforesis en geles de poliacrilamida. Carril 1; extracción nueva de la dilución 10<sup>-1</sup> del control positivo (c+10<sup>-1</sup>n), 2; dilución 10<sup>-1</sup> del control positivo (c+10<sup>-1</sup>), 3; muestra 7 (7), 4; muestra 6 (6), 5; control negativo sin DNA (N ó ntc), 6; marcador de peso AmpliSize (MP). La flecha señala la posición de la migración del producto específico de 114 pb. B) Por curvas de disociación de DNA. La flecha indica la temperatura de disociación, aproximada, para el producto específico (84-85 °C) y la leyenda indica la identidad de cada muestra.

El ensayo realizado mediante el RT-PCR en dos pasos, tanto con los oligos anti-sentido como con los hexámeros al asar, no mejoró la sensibilidad, en comparación al ensayo de RT-PCR.

#### VI.2.5 Detección de *M. Tuberculosis*.

Del total de muestras que se procesaron, para la identificación de Mtb solo dos muestras resultaron positivas (Cuadro 6). La Figura 11A muestran el análisis por electroforesis, donde la amplificación del fragmento de 244 pb, correspondiente a la secuencia de inserción IS6110 de Mtb, se puede observar en las muestras 4 y 5, así como en los controles positivos.

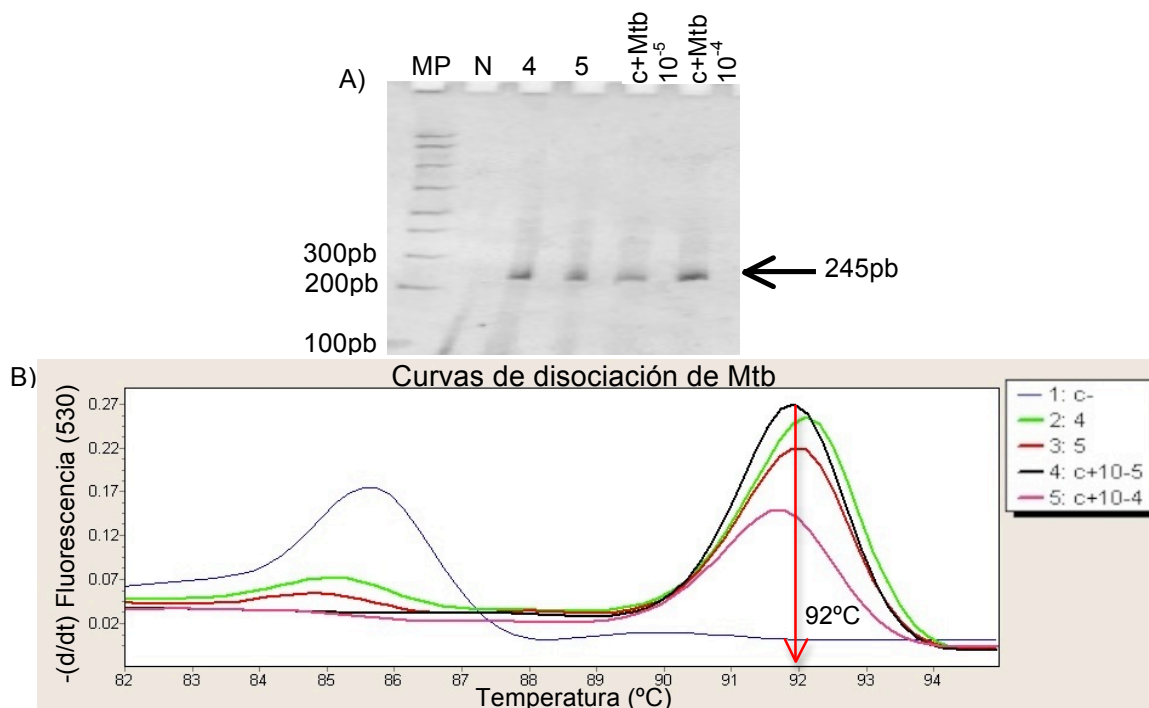


Figura 11. Ejemplo del análisis para la detección de Mtb por PCR tiempo real con SYBR Green. A) Por electroforesis en geles de poliacrilamida. Carril 1; marcador de peso AmpliSize (MP), 2; control negativo sin DNA (N), 3; muestra 4 (4), 4; muestra 5 (5), 5; dilución  $10^{-5}$  del control positivo (c+ $10^{-5}$ ), 5; dilución  $10^{-4}$  del control positivo (c+ $10^{-4}$ ). La flecha señala la posición de migración del producto específico de 245 pb. B) Por curvas de disociación de DNA. La flecha indica la temperatura de disociación, aproximada, para el producto específico (91.5-92.5 °C) y la leyenda indica la identidad de cada muestra.

De igual manera la Figura 11B muestra los picos de disociación de estas muestras dentro de la temperatura de disociación del producto específico (91.5-92.5 °C).

#### VI.2.6 Detección de Herpes Humano 6.

Aun cuando se careció de control positivo para detección de herpes 6 humano, se realizó el PCR en las 23 muestras de LCR utilizando dos juegos de oligonucleótidos y diferentes condiciones de reacción, sin embargo no se logró la detección de ninguna muestra positiva, que permitiera su caracterización posterior para ser empleada como control positivo en los ensayos.

#### VI.2.7 Detección de la RNAsa P humana.

El 100% de las muestras resultó positiva para la detección del gen de la RNAsa P humana, lo cual permitió asegurar la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos de las muestras y por lo tanto corroborar la validez de los resultados, en particular de las muestras negativas a los patógenos. Un ejemplo de la detección del gen de la RP se observa en la Figura 12, donde cada una de las muestras y el control positivo presentan curvas de amplificación, con un Ct entre los ciclos 26 y 36.

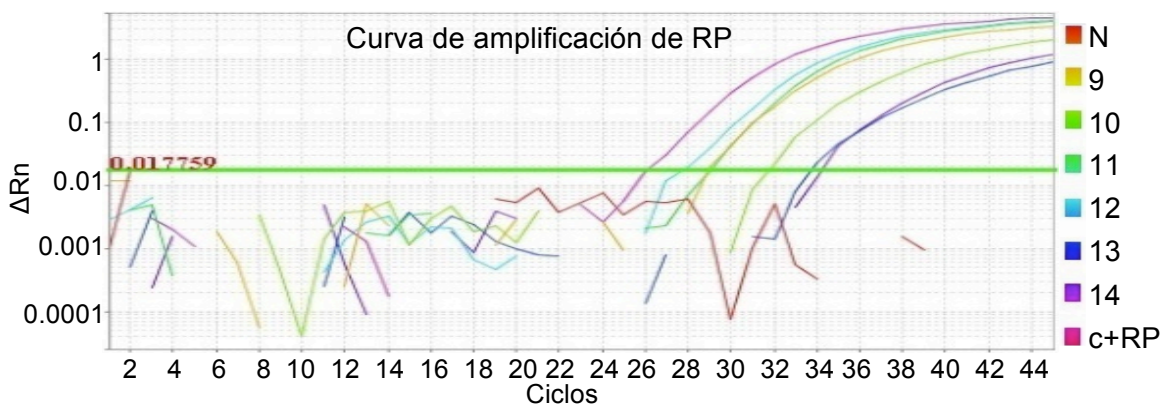


Figura 12. Análisis por curva de amplificación mediante PCR tiempo real, con sonda, para la detección de RP. La leyenda indica la identidad de cada muestra. Las curvas por arriba de la línea umbral (línea horizontal color verde) se consideran positivas.

El Cuadro 6 resume los resultados obtenidos de los ensayos de PCR y RT-PCR para la detección de los patógenos de interés para el estudio.

Cuadro 6. Resultados de PCR y RT-PCR.

Ensayo	Patógeno	# positivos / # analizados	% positividad
PCR	HSV	1/23	4.35
	H6	0/23	0
	Mtb	2/23	8.70
	RP*	23/23	100
RT-PCR	EV	0/23	0
	VON	0/23	0
	Flavivirus**	0/23	0

\*PCR control de calidad de las muestras

\*\*PCR genérico de flavivirus

## VII. DISCUSIÓN.

El análisis de la información contenida en las historias clínicas, anexas a las muestras, arrojó resultados que concuerdan con otros estudios, en los que se han revisado estas características. Uno de los puntos en común es que la mayoría de los pacientes son de sexo masculino (Álvarez-Hernández y col., 2006; Graneroda y Crowcrofta, 2007). En el caso de las infecciones transmitidas por mosquitos, esto se atribuye a que los varones, principalmente en su infancia, suelen estar más al aire libre o en áreas de agricultura, donde los mosquitos son más abundantes (Khinchi y col., 2010).

Otro punto en común es la distribución por edad, donde la incidencia es mayor en la población pediátrica (Graneroda y Crowcrofta, 2007). En relación con la distribución estacional, se reporta que la estación del año con mayor frecuencia es el invierno (Murthy y col., 2002), mientras que en el presente estudio, la frecuencia de los casos en invierno es igual a los casos reportados en otoño.

Lo anterior podría darnos una mayor variabilidad de los virus causantes de la infección, ya que como se ha mencionado, algunos virus se presentan más en cierta época del año. Para este caso, en invierno, los virus más comúnmente reportados son los respiratorios, entre ellos el virus de las paperas, sarampión e influenza. Mientras que en otoño son los virus de la Encefalitis: de San Luis, de Europa central, equina del oeste, equina del este; así como los EV. También están aquellos que se presentan durante todo el año, como el virus del herpes simple, de Varicela-Zoster y de la rabia (Koskiniemi y col., 1991; Aquino-Gondim, 2010).

Un último punto es la sintomatología, que comprende principalmente fiebre y crisis convulsivas, lo que concuerda con varios estudios (Álvarez-Hernández y col., 2006; Wang y Liu, 2011). Sin embargo, estos síntomas, principalmente, permiten distinguir una encefalitis de una disfunción cerebral por causas no infecciosas y se



sabe que existe un amplio espectro de enfermedades infecciosas e inflamatorias que pueden simular infecciones virales del SNC, así como que los signos meníngeos y encefálicos pueden no estar presentes en niños con meningoencefalitis, sobretodo en menores de 12 meses (Whitley y Gnann, 2002; DeBiasi y Tyler, 2004; Davies y col., 2005; Srinivasan y col., 2005).

Por ejemplo los síntomas de fiebre y convulsiones pueden relacionarse con convulsiones febriles, que son crisis convulsivas asociadas a fiebre no causada por infecciones del SNC, las cuales pueden presentarse en la niñez con una incidencia del 5%, entre el primer mes y aproximadamente hasta los 5 años (Pérez-Gil y Sánchez-Rodríguez, 2006; Prasad y Seshia, 2009; Mendonça-Siqueira, 2010).

Debido a lo anterior, no se podría descartar la posibilidad de un diagnóstico diferente a la encefalitis, ya que existen pacientes que no presentan ningún otro síntoma aparte de fiebre, crisis convulsivas, cefalea y malestar general (alrededor del 30%).

Si bien no se logró relacionar la sintomatología con el patógeno causante de la infección, debido a la poca cantidad de muestras positivas y a la diversidad de los síntomas presentados; estos puntos pueden dar una idea, epidemiológica, de las características y la distribución de la enfermedad a nivel estatal, y permitir enfatizar el cuidado de la enfermedad en los sectores y las estaciones del año, con mayor incidencia.

En cuanto a los resultados de los ensayos de PCR y RT-PCR, solo el 13.04% de las 23 muestras, de LCR recolectadas, resultaron positivas a algún patógeno. Se detectó la presencia de *M. tuberculosis* en el 8.7% (2/23) y del virus del herpes simple en un 4.3% (1/23) de las muestras, lo que concuerda con otros trabajos en los cuales se han reportado dentro de los agentes más comunes, causantes de la encefalitis (Glaser y col., 2006; Big y col., 2009).

De igual modo, como se ha reportado en otros estudios, un resultado negativo, no necesariamente permite descartar, con total confianza, a la infección o al patógeno en estudio, ya que aproximadamente un 17% de los resultados son falsos negativos, estos puede deberse a la sensibilidad de la prueba y a la calidad de la muestra, entre otras causas (Jeffery y col., 1997; Davies y col., 2005). Sin embargo, conforme a los autores que han utilizado los oligos de este estudio y lo reportado en la literatura, la sensibilidad del análisis por PCR, de estos patógenos, ha sido alrededor del 90-95% (Mitchell y col., 1997; Collot y col., 2002; Mirza y col., 2003; DeBiasi y Tyler, 2004; Chien y col., 2006).

Debido a que la presencia de H6, se ha reportado en un 40% de pacientes con cuadros encefálicos y representa el 7% de casos causados por los virus del herpes (DeBiasi y Tyler, 2004; Yao y col., 2009), se consideró dentro del panel de diagnóstico, aún sin contar con un control positivo. Así, el hecho de que la calidad de las muestras fue adecuada (ver amplificación de RP) y de la ausencia de positividad en la detección de H6, se sugiere que este patógeno, no es el causante de los cuadros observados. Sin embargo, hasta no contar con un control positivo, no se puede tener idea de la sensibilidad de detección del ensayo, para poder definirlo adecuadamente.

Como uno de los factores principales del porcentaje, en el cual no se identificó la etiología de la infección, pudiera contar el tiempo de la toma de muestra, ya que se ha sugerido que la punción lumbar se realice entre los 4 y 14 días, después del inicio de síntomas, a causa de que muestras tomadas alrededor de los primeros 3 días, o después de los 14 días, dificultan la detección de los virus (Davies y col., 2005). Y aun cuando esto pudiera variar de patógeno en patógeno, se ha observado, que en uno de los patógenos más frecuentes, HSV, la punción lumbar fuera de este rango llega a afectar el resultado del PCR (Weil y col., 2002; Wang y Liu, 2011). Lo anterior, cabe mencionarlo debido a que, alrededor del 63% de las muestras, en el presente estudio, fueron tomadas fuera de este rango.

Otra razón de los resultados, podría deberse a la gran cantidad de patógenos virales, causantes de la infección, así como de algunas bacterias que presentan cuadros que simulan una etiología viral (Glaser y col., 2006; Yao y col., 2009). Una de estas bacterias es *Mycoplasma pneumoniae*, que causa a menudo afecciones respiratorias, pero puede presentar complicaciones extrapulmonares, como la encefalitis; y aunque se creó que esta complicación se debe a una respuesta autoinmune, también existe evidencia de la invasión directa del propio microorganismo al tejido nervioso (Christie y col., 2007; Espinoza-Quinteros y Guillén-Pinto, 2008).

Aun cuando *M. pneumoniae* no se ha incluido en este estudio, cabe mencionarlo debido a que se ha considerado como uno de los agentes más comunes en las infecciones del SNC, en los niños (Christie y col., 2007). A pesar de que puede presentarse sin indicios de síntomas respiratorios, este patógeno no suele considerarse en los diagnósticos de encefalitis y debido a la concentración de microorganismos en el LCR, los cultivos raramente son positivos (Espinoza-Quinteros y Guillén-Pinto, 2008; Meyer-Sauteur y col., 2011).

También se encuentra el virus de Varicela-Zoster (VZV), que pertenece a la familia de los virus del herpes y se presenta con una frecuencia, en algunos estudios, de hasta el 60% de los casos de meningoencefalitis. Se puede presentar antes, después o en ausencia de la erupción del salpullido, por lo que se hace difícil la sospecha clínica en esta última condición la cual abarca la mitad de los casos (DeBiasi y Tyler, 2004; Davies y col., 2005; Big y col., 2009).

De esta manera, si se toma en cuenta el rango sugerido para la toma de muestras y se añaden algunos otros virus al panel de diagnóstico, como Varicela-Zoster y los reportados con más frecuencia, de acuerdo con la estación del año; al igual que otras bacterias como *M. Pneumoniae*, se podría tener una mayor visión de las causas y probablemente una disminución del porcentaje de resultados negativos.

## **VIII. CONCLUSIONES.**

Con el estudio se logró establecer un banco de 23 muestras de LCR, con cuadro clínico compatible con encefalitis y/o meningitis de etiología viral. Detectando la presencia de Mtb en dos muestras (4 y 5) y de HSV en una muestra (9), así mismo se descartó la presencia de EV, VON y otros flavivirus, en todas las muestras; mediante las técnicas de PCR y RT-PCR.

La mayoría de las infecciones del SNC ocurrieron en la población de sexo masculino, principalmente en menores de 11 años y cuyo inicio de síntomas fue predominante en el mes de enero.

Los síntomas presentados en la mayoría de los casos, son cefalea, fiebre y convulsiones, pero no se logró establecer ninguna relación entre estas y el tipo de patógeno detectado.

La implementación de la búsqueda de estos patógenos, no permitió disminuir el porcentaje de muestras, en las que la identidad del patógeno causante de la infección quedó indeterminado, ya que solo en el 13.04% de muestras dieron un resultado positivo.

Es necesario incluir en el análisis a otros patógenos, para incrementar el panel de pruebas que permitan la detección de estos y así fortalecer la vigilancia epidemiológica de la encefalitis en Querétaro.

## IX. BIBLIOGRAFÍA.

**Acha, P. N., Szyfres, B. 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ra. ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC: 278-317.

**Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2004.** Biología Molecular de la Célula. 4ta. ed. Ediciones Omega. España: 508-509.

**Álvarez-Hernández, L., Hernández-López, M., Velázquez-Corona, J. 2006.** Estudio clínico-epidemiológico de encefalitis viral en la edad pediátrica, experiencia de dos años en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Vol. 26: 72-77.

**Aquino-Gondim, F. A. 2010.** <http://emedicine.medscape.com/article/1166498-clinical#showall>

**Ausina-Ruiz, V., Moreno-Guillén, S. 2005.** Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1ra. ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid: 893-894.

**Be, N. A., Kim, K. S., Bishai, W. R. Jain, S. K. 2009.** Pathogenesis of central nervous system tuberculosis. Current Molecular Medicine. Vol.9: 94-99.

**Big, C., Reineck, L. A., Aronoff, D. M. 2009.** Viral infections of the central nervous system: a case-based review. Clinical Medicine & Research. Vol. 7: 142-146.

**CDC. 2010.** Centers for Disease Control and Prevention. Octubre 24 de 2010.

**CENAVECE. 2009.** Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Marzo 31 de 2011.

**Cherian, A., Thomas, S. V. 2011.** Central nervous system tuberculosis. African Health Science. Vol. 11: 116-127.

**Chien, L. J., Liao, T. L., Shu, P. Y., Huang, J. H., Glubler, D. J., Chang, G. J. 2006.** Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 44: 1295–1304.

- Christie, L. J., Honarmand, S., Talkington, D. F., Gavali, S. S., Preas, C., Pan, C.-Y., Yagi, S., Glasera, C. A. 2007.** Encefalitis pediátrica: ¿cuál es el papel de *Mycoplasma pneumoniae*?. *Pediatrics*. Vol. 64: 88-95.
- Clark, D. 2005.** *Molecular Biology*. 1ra. ed. Elsevier, USA: 570-572, 635-639, 655-657.
- Collot, S., Petit, B., Bordessoule, D., Alain, S., Touati, M., Denis, F., Ranger-Rogez, S. 2002.** Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 40: 2445–2451.
- Coria-Lorenzo, J. J., Juárez-Escobar, M., Velazco-Álvarez, V. H. 2001.** Meningoencefalitis viral. Enfoque clínico (Viral encephalitis. Clinical approach). *Revista Mexicana de Pediatría*. Vol. 68: 252-259.
- Davies, N. W. S., Brown, L. J., Gonde, J., Irish, D., Robinson, R. O., Swan, A. V., Banatvala, J., Howard, R. S., Sharief, M. K., Muir, P. 2005.** Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. Vol. 76: 82–87.
- DeBiasi, R. L., Tyler, K. L. 2004.** Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 17: 903-925.
- Dorak, M. T. 2007.** *Real-time PCR*. 1ra. ed. Taylor & Francis Group. UK: 39-58, 273-275.
- Espinoza-Quinteros, I., Guillén-Pinto, D. 2008.** Compromiso neurológico por *Mycoplasma pneumoniae* en niños: Experiencia del Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Revista Peruana de Pediatría*. Vol. 61: 8-15.
- Espy, M. J. Uhl, J. R., Slonan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill III, F. R., Smith, T. F. 2006.** Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19: 165-256.
- Gastón, I., Muruzábal, J., Quesada, P., Maraví, E. 2008.** Infecciones del sistema nervioso central en urgencias. *Anales del Sistema Sanitario Navarra*. Vol. 31: 99-113.

**Glaser, C. A., Honarmand, S., Anderson, L. J., Schnurr, D. P., Forghani, B., Cossen, C. K., Schuster, F. L., Christie, L. J., Tureen, J. H. 2006.** Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 43: 1565–1577.

**González, C. 2005.** Encefalitis viral. *Revista Pediátrica Electrónica*. Vol. 2: 29-31.

**Graneroda, J., Crowcroft, N. S. 2007.** The epidemiology of acute encephalitis. *Neuropsychological Rehabilitation: An International Journal*. Vol.17: 406-428.

**Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V., Campbell, G. L. 2005.** Virology, pathology, and clinical manifestations of west Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11: 1174.

**Hymas, W. C., Aldous, W. K., Taggart, E. W., Stevenson, J. B., Hillyard, D. R. 2008.** Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. *Clinical Chemistry*. Vol. 54: 406-413.

**Hoffmann, M., Hurlbauss, J., Weilke, C. 2007.** Novel methods for high-performance melting curve analysis using the LightCycler® 480 system. *Biochemica*. Vol. 1: 17-19.

**Jeffery, K. J., Read, S. J., Peto, T. E., Mayon-White, R. T., Bangham, C. R. 1997.** Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. *Lancet*. Vol. 349: 313-317.

**Jiménez-Cardoso, E. 2004.** Manual de Técnicas de Biología Molecular Básica. 1ra. ed. Editorial Prado. México, D.F: 12-16.

**Khinchi, Y. R., Kumar, A., Yadav, S. 2010.** Study of acute encephalitis syndrome in children. *Journal of College of Medical Sciences-Nepal*. Vol. 6: 7-13.

**Koskiniemi, M., Rauronen, J., Lehrokoski-Lehtiniemi, H., Vaberi, A. 1991.** Epidemiology of encephalitis in Children: A 20-year survey. *Annals of Neurology*.

**LESPQ. 2010.** Laboratorio Estatal de Salud Pública. Septiembre 29 de 2010.

**Liu, F., Altman, S. 2010.** Protein Reviews. Volumen 10: Ribonuclease P. 1ra. ed. Springer, New York: 223-231.

**Locatelli, G., Santoro, F., Veglia, F., Gobbi, A., Lusso, P., Malnati, M. S. 2000.** Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38: 4042–4048.

**Luo, W., Yang, H., Rathbun, K., Pau, C., Ou, C. 2005.** Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43: 1851–1857.

**Mendonça-Siqueira, L. F. 2010.** Febrile seizures: update on diagnosis and management. *Revista da Associação Médica Brasileira*. Vol. 56: 489-492.

**Meyer-Sauteur, P.M., Streuli, J.C., Iff, T., Goetschel, P. 2011.** Mycoplasma pneumoniae-associated encephalitis in childhood - nervous system disorder during or after a respiratory tract infection. *Klinische Pädiatrie*. Vol. 223: 178-179.

**Mirza, S., Restrepo, B. I., McCormick, J. B., Fisher-Hoch, S. P. 2003.** Diagnosis of tuberculosis lymphadenitis using a polymerase chain reaction on peripheral blood mononuclear cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 69: 461–465.

**Mitchell, P. S., Espy, M. J., Smith, T. F., Toal, D. R., Rys, P. N., Barbari, E. F., Osmon, D. R., Persing, D. H. 1997.** Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 35: 2873–2877.

**Murthy, S. N. K., Faden, H. S., Cohen, M. E., Bakshi, R. 2002.** Acute disseminated encephalomyelitis in children. *Pediatrics*. Vol. 110: 1-7.

**Murthy, J. 2010.** Neurological complications of dengue infection. *Neurology India*. Vol. 58: 581-584.

**Oberste, M. S., Maher, K., Flemister, M. R., Marchetti, G., Kilpatrick, D. R., Pallansch, M. A. 2000.** Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38: 1170–1174.

**Palencia, R. 2000.** Meningitis purulentas y encefalitis víricas. Protocolo diagnóstico terapéutico. *Boletín Pediátrico*. Vol. 40: 115-126.



- Pérez-Gil, E., Sánchez-Rodríguez, M. 2006.** Protocolos de neurología: convulsiones febriles. Boletín Pediátrico. Vol. 46: 258-260.
- Prasad, A. N., Seshia, S. S. 2009.** Susceptibility to febrile seizures: more than just a faulty thermostat. Canadian Journal of Neurological Sciences. Vol. 36: 277-279.
- Rey-Pérez, A. 2005.** Emergencias Neurológicas. 1ra. ed. Masson, Barcelona: 171-173.
- Romero-Cabello, R. 2007.** Microbiología y parasitología: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra ed. Médica Panamericana, México: 465-467.
- RSI. 2005.** Reglamento Sanitario Internacional. Octubre 24 de 2010.
- Sapp, J. P., Eversole, L. R., Wysocki, G. P. 2006.** Patología oral y maxilofacial contemporánea. 2da. ed. Elsevier, Madrid: 209-210.
- Schaible, U. E., Haas, A. 2009.** Intracellular niches of microbes: a pathogens guide through the host cell. 1ra. ed. Wiley-BlackWell, Alemania: 327.
- Smith, J. E. 2004.** Biotechnology. 4ta. ed. Cambridge, UK: 46-49.
- Solomon, T. 2004.** Flavivirus encephalitis. New England Journal of Medicine. Vol. 351: 370-378.
- Srinivasan, J., Wallace, K. A., Scheffer, I. E. 2005.** Febrile seizures. Australian Family Physician. Vol. 34: 1021-1025.
- Ulla-Díez, S. 2001.** Estudio de la influencia del estrés percibido sobre las recidivas del herpes simple – tipo 1. Universidad de Castilla- La Mancha. Tesis para obtener el título de Doctor en Psicología. 1-225.
- Virtanen, J. O. 2008.** Human herpesvirus 6 in multiple sclerosis and encephalitis. Helsinki. University of Helsinki. Tesis para obtener el título de Doctor en Fisiología (PhD).1-87.
- Wang, W.-S., Liu, C.-P. 2011.** The clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome of encephalitis: five years of experience at a medical center in northern taiwan. International Journal of Gerontology. Vol. 5: 9-12.

**Weil, A. A., Glaser, C. A. Amad, Z., Forghani, B. 2002.** Patients with suspected herpes simplex encephalitis: rethinking an initial negative polymerase chain reaction result. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 34: 1154-1157.

**Whitley, R. J., Gnann, J. W. 2002.** Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *The Lancet*. Vol. 359: 507–514.

**WHO. 2010.** World Health Organization. Mayo 30 de 2011.

**Yao, K., Honarmand, S., Espinoza, A., Akhyani, N., Glaser, C., Jacobson, S. 2009.** Detection of human herpesvirus-6 in cerebrospinal fluid of patients with encephalitis. *Annals Neurology*. Vol. 65: 257–267.