

XVI CONGRESO NACIONAL  
DEL LABORATORIO CLÍNICO

**LABCLIN**

MÁLAGA 19-21 OCTUBRE 2022

PALACIO DE FERIAS Y CONGRESOS DE MÁLAGA / FYCMA

AEBM-ML  
Asociación Española de  
Especialistas Médicos y Veterinarios de Laboratorio

AEFA  
Asociación Española de  
Fisiología y Anestesiología

SEQC<sup>ML</sup>  
Sociedad Española de  
Química Clínica

# DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Jorge Galán Ros

FEA Microbiología y Parasitología

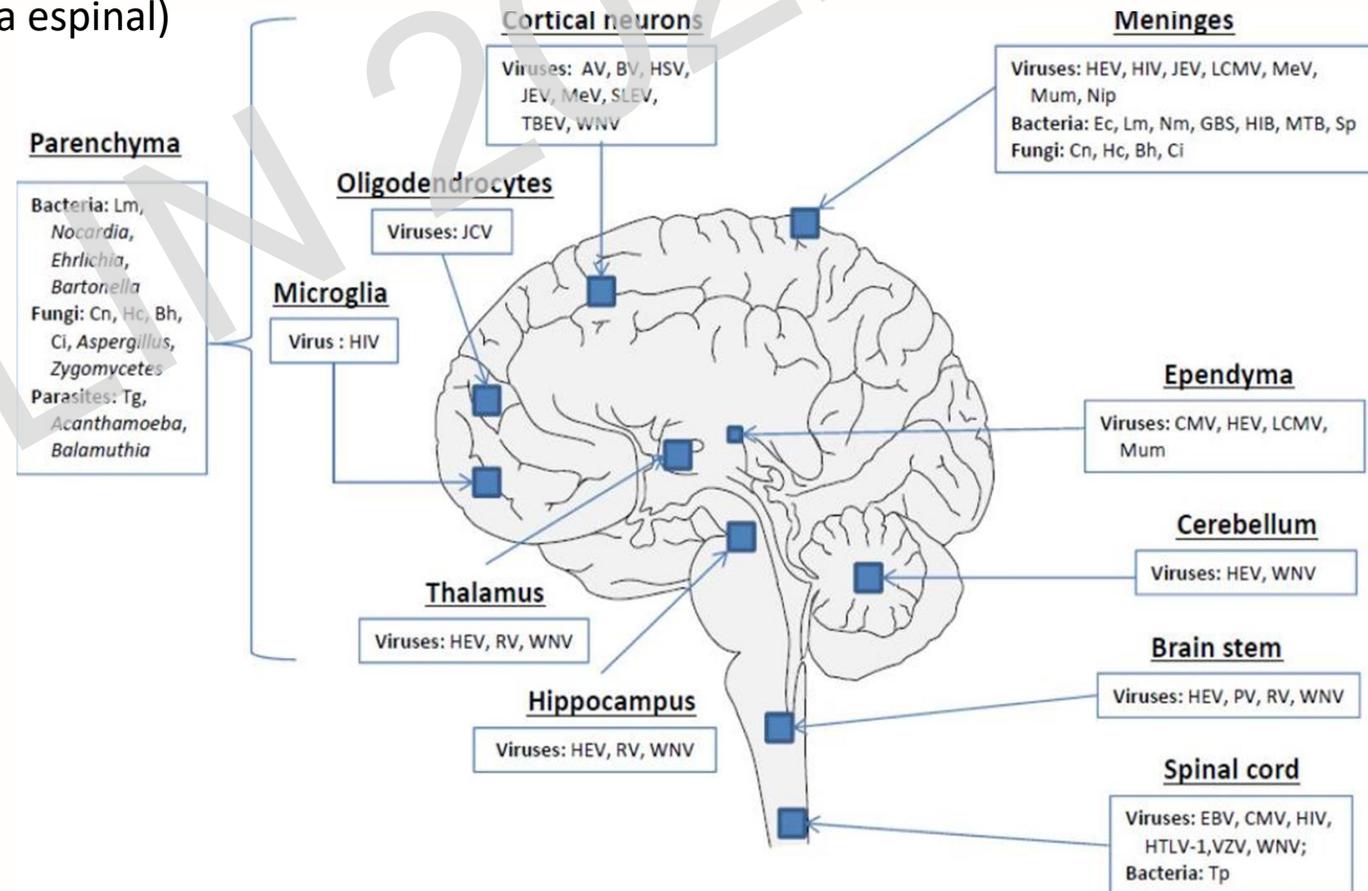
Hospital Universitario Los Arcos del Mar Menor

# ASPECTOS GENERALES

- Meningitis y encefalitis → Emergencias médicas y dx rápido.
- Bacterias, virus, hongos o parásitos pueden migrar al SNC.
- La diseminación microbiana al SNC:
  - Diseminación hematógena
  - Por extensión de un foco contiguo
  - Paso intraneural de organismos.
- Métodos de diagnóstico microbiológico
  - Convencionales: muestran limitaciones: tiempo de respuesta, sensibilidad.....
  - Molecular: PCR-singleplex, matrices moleculares sindrómicas rápidas (PCR-multiplex).

# CLASIFICACIÓN

- **Según localización:**
  - Meningitis (inflamación meninges)
  - Encefalitis (inflamación parénquima)
  - Mielitis (inflamación medula espinal)
  - Meningoencefalitis (inflamación parénquima + meninges)
  - Encefalomielitis (inflamación parénquima + médula espinal)
- **Según agente etiológico**
  - Bacteriana
  - Vírica
  - Fúngica
  - Parasitaria
- **Según duración:**
  - Aguda
  - Subaguda
  - Crónica
  - Recurrente
- **Clásicamente tras punción lumbar**
  - Purulenta
  - Líquido claro



# DIAGNÓSTICO DE LA ETIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

- **Historia clínica y epidemiológica personal:**
  - **Edad.**
  - **Vacunas recibidas:** *H. influenzae* b, *S. pneumoniae* , *N. meningitidis*(C o A, C, Y, W135 y/o B), paperas (triple viral) y varicela.
  - **Brotos epidémicos:** brote de rombencefalitis por EV-A71 en Cataluña.
  - Antecedentes de **traumatismo** craneoencefálico o procedimientos **neuroquirúrgicos**.
  - **Inmunosupresión** (infección por VIH, trasplante, neoplasias, entre otros).
  - **Historial de viajes** a áreas donde ciertas infecciones son endémicas; contacto con animales o exposición a picaduras de artrópodos
  - Coexistencia de infecciones de oído, nariz o garganta (**otitis media, sinusitis o mastoiditis**) o infecciones de transmisión sexual (**sífilis o herpes simple**).

# DIAGNÓSTICO DE LA ETIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

- **Sintomatología y datos de laboratorio:**

- **Los síntomas de estas infecciones pueden ser variados**
- **El curso de la enfermedad:** aguda, subaguda o crónica → será diferente según la etiología.
- **Los resultados del análisis de sangre pueden guiar el diagnóstico:**
  - Leucocitosis con neutrofilia y elevación de reactantes de fase aguda son más frecuentes en la meningitis bacteriana.
  - Anomalías en la coagulación puede conducir a la meningitis meningocócica.
- **El análisis citoquímico (LCR):**
  - **Meningitis bacteriana:** un aumento significativo de **leucocitos** con predominio de **neutrófilos**, **proteínas altas** y **bajos niveles de glucosa**
  - **Meningitis viral:** aumento moderado de **leucocitos** con **predominio de linfocitos**, **proteínas altas**, y **glucosa normal**
  - **Etiología tuberculosa o criptocócica:** aumento moderado de **leucocitos** con **predominio linfocítico**, **proteínas altas** y **bajos niveles de glucosa**.

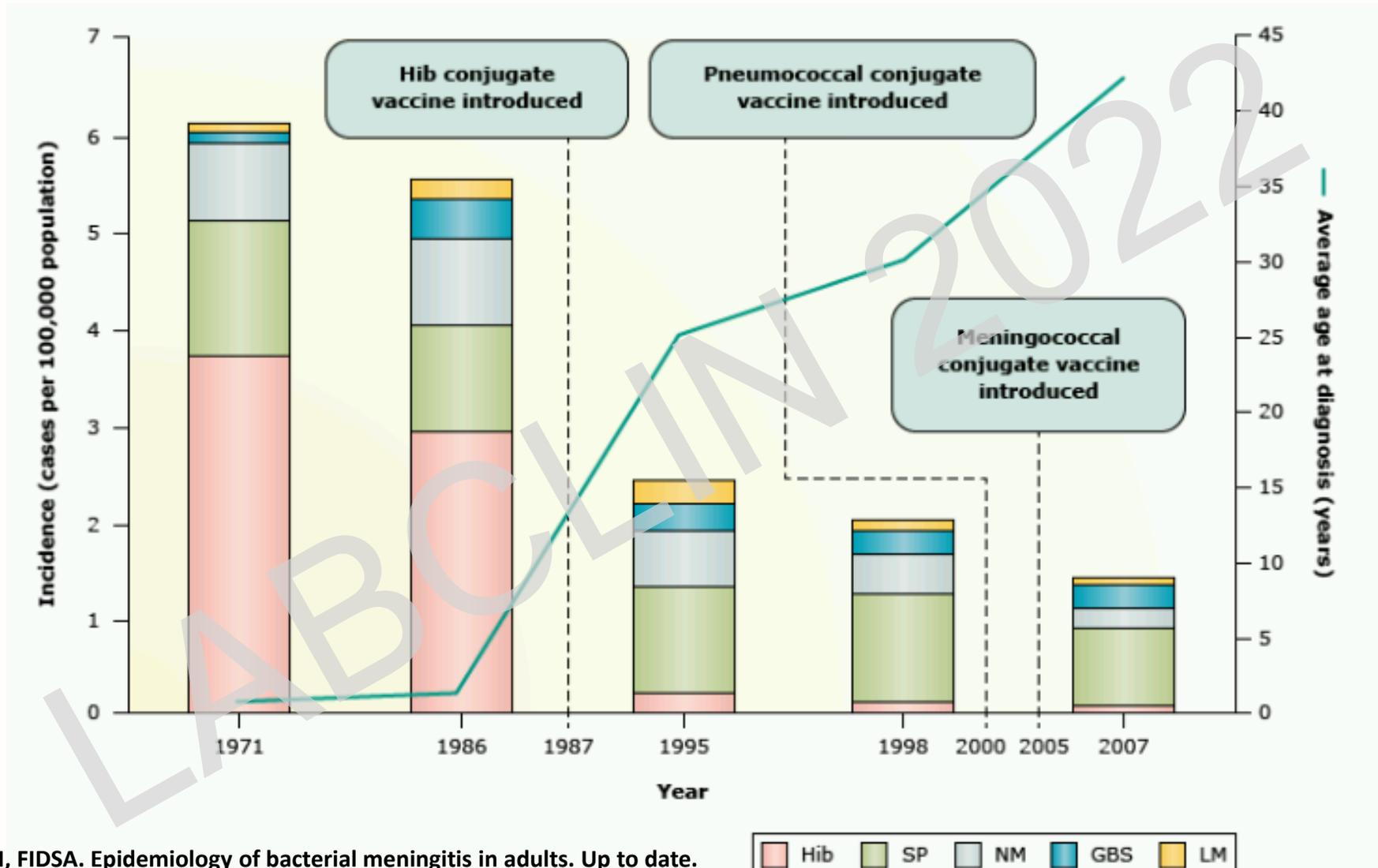
# MENINGITIS AGUDA BACTERIANA

- **Agentes etiológicos más frecuentes clasificados por grupos de edad:**
  - Neonatos (< 1 mes): *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* y *E. coli* K1
  - Niños (< 2 años): *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* y *H. influenzae* b
  - Niños y adolescentes (2-18 años) y adultos (18-65 años): *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*
  - Adultos mayores de 65 años: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *L. monocytogenes*.
- **Otra situación:**
  - Trauma post-craneal: bacilos gramnegativos
  - Intervención post-quirúrgica: *S. aureus*
  - Endocarditis: *S. aureus*, *Enterococcus* sp, microorganismos grupo HACEK
  - Derivación LCR: SCN
- ***S. pneumoniae* > *N. meningitidis*** : principales organismos causantes de meningitis adquirida en la comunidad
- ***L. monocytogenes* > *S. agalactiae* > *H. influenzae* (no serotipo-b)**: menos frecuentes

# MENINGITIS AGUDA BACTERIANA

- Serotipos *N. meningitidis* (A,B,C,W135,Y).
  - **Serotipo B** es la **primera causa** de meningitis meningocócica en **España**.
- Serotipos de *S. pneumoniae* implicados en meningitis en adultos han variado en después de la **introducción de la vacuna heptavalente**, con un incremento de los **serotipos no vacunales**.
- *L. monocitogenes* se asocia principalmente a **pacientes de riesgo**: embarazadas, inmunodeprimidos y neonatos - mayores de 60 años.
- La distribución por edad se ve preferentemente en **grupos extremos de edad**, en menores de 1 año y mayores de 64 años.
- La **vacunación** es la forma más efectiva para **prevenir** la meningitis bacteriana.

# EFFECTO TRAS LA INSTAURACIÓN DE VACUNAS



R Rodrigo Hasbun, MD, MPH, FIDSA. Epidemiology of bacterial meningitis in adults. Up to date. Septiembre 2022

# Invasive meningococcal disease

Annual Epidemiological Report for 2018



## Key facts

- In 2018, 3 233 confirmed cases of invasive meningococcal disease (IMD), including 324 deaths, were reported in 30 European Union/European Economic Area (EU/EEA) Member States.
- France, Germany, Spain, and the United Kingdom accounted for 59% of all confirmed cases in 2018.
- The notification rate of IMD was 0.6 cases per 100 000 population, similar to the 2015-2017 period.
- Age-specific rates were highest in infants, followed by 1-4-year-olds, with a second peak in 15-24-year-olds.
- Serogroup B remains the major cause of IMD. It caused 51% of cases overall and was the dominating serogroup in all age groups below 65 years. Incidence remained stable between 2014 and 2018.
- The incidence of serogroups W and Y has been increasing. Serogroup W is now the second cause of IMD reported in 18% of cases.
- The continued strengthening of disease surveillance for IMD is essential to evaluate the impact of ongoing immunisation programmes and support decision-makers concerning vaccination strategies.

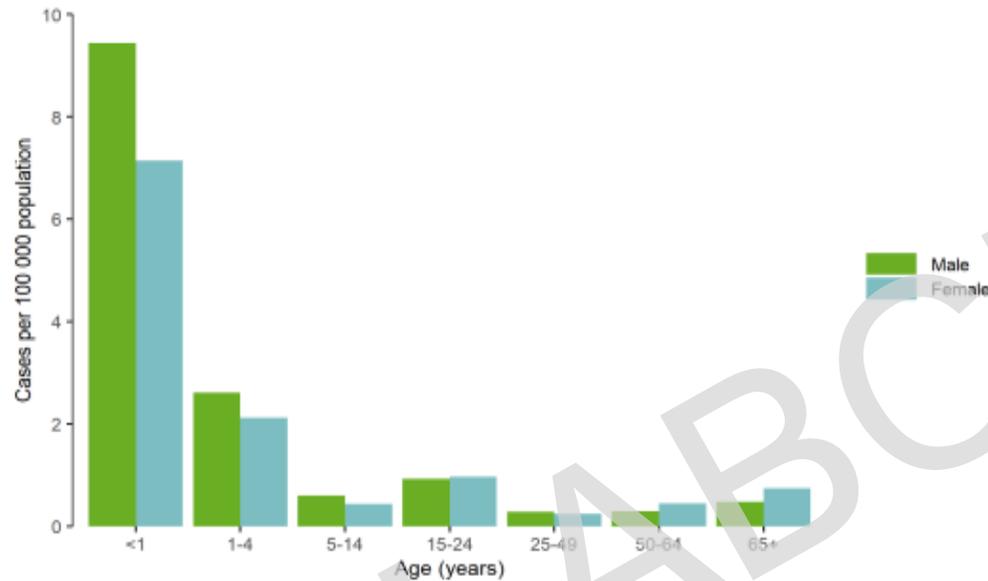
Informe de Vigilancia publicado Junio 2022

# Invasive meningococcal disease

Annual Epidemiological Report for 2018



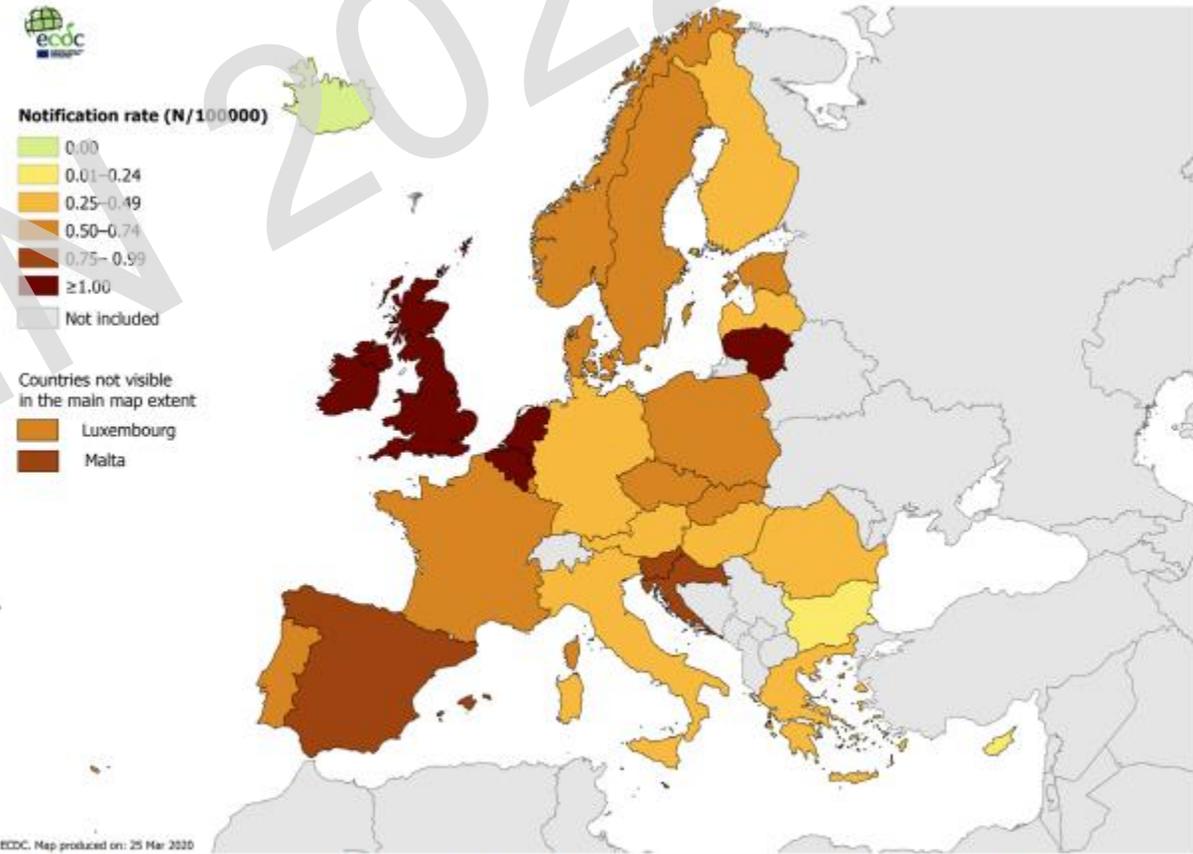
**Figure 2.** Distribution of confirmed invasive meningococcal disease cases per 100 000 population, by age and sex, EU/EEA, 2018



Source: Country reports from Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czechia, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and the United Kingdom.

Informe de Vigilancia publicado Junio 2022

**Figure 1.** Distribution of confirmed invasive meningococcal disease cases per 100 000 population by country, EU/EEA, 2018



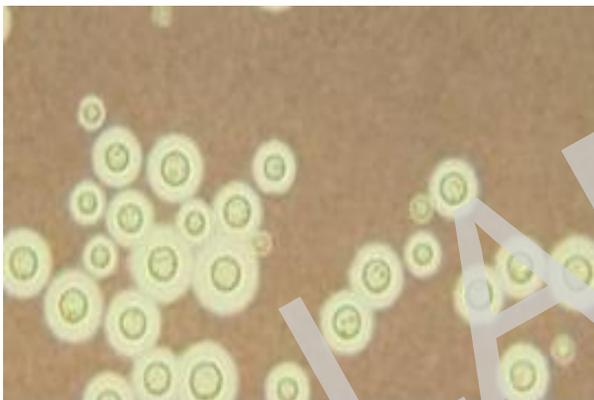
Source: Country reports from Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czechia, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and the United Kingdom.

# INFECCIONES VIRICAS DEL SNC

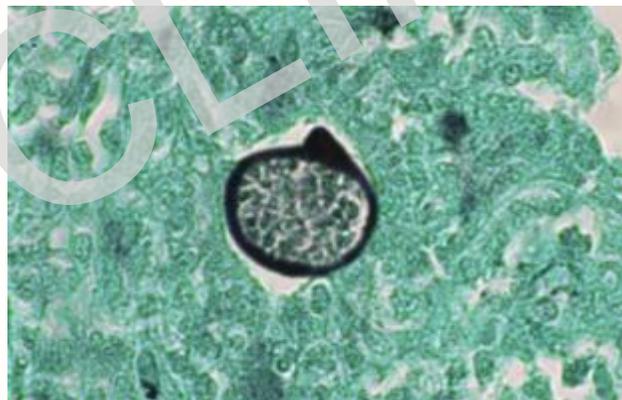
- Infecciones del SNC **más comunes** y en su mayoría **leves** y **autolimitadas**.
- Manifestación clínica: meningitis, **encefalitis** o meningoencefalitis.
- La incidencia de infecciones virales del SNC puede variar según la **región geográfica** y la **temporada**.
- Los **EV** no poliomiélicos representan la mayoría de los casos de **meningitis / encefalitis** que generalmente alcanzan su punto máximo entre **finales de la primavera y el otoño**.
- Las **infecciones más graves** del SNC son debidas a **VHS** y se asocian con **encefalitis (VHS-1)** esporádica y **meningitis (VHS-2)** con secuelas graves si no se tratan con rapidez.
- **Parechovirus (HPeV)** es la segunda causa más común de meningitis en pediatría

# INFECCIONES FÚNGICAS DEL SNC

- **Micosis oportunistas:** *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.*
- **Micosis dimórficas:** *Coccidioimicosis*, *Histoplasmosis*, *Blastomycosis...*
- **Mucormicosis:** Mucorales (*Rhizopus*, *Rhizomucor*)



Tinta china: *Cryptococcus neoformans*



Gomori-Grocott: esferulas de *Coccidioides immitis*



Azul de lactofenol: *Rhizopus*

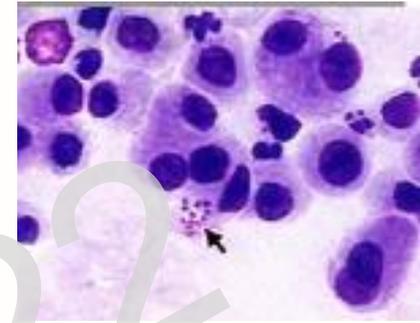
# INFECCIONES PARASITARIAS DEL SNC

## • Protozoos

- Amebas de vida libre  
(*Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp.)
- *Entamoeba histolytica*
- *Trypanosoma brucei rhodesiense* – *gambiense*
- *Trypanosoma cruzi*
- *Toxoplasma gondii*
- *Plasmodium falciparum*

## • Helmintos

- *Cisticercus cellulosae* (*T. solium*)
- Quiste hidatídico (*E. granulosus*)
- *Angiostrongilus canto*



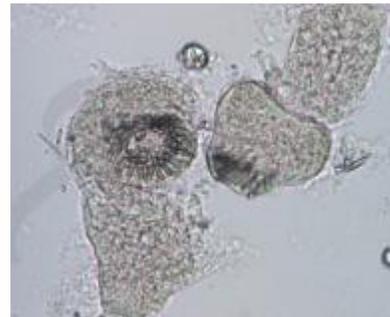
*T. gondii*



*Trypanosoma* spp.



Quiste *Acanthamoeba* spp.



*E. granulosus*



Quiste *E. histolytica*

# MENINGITIS ASÉPTICAS

- **Infecciosas**

- Víricas (40 - 50%)
- Bacterianas parcialmente tratadas
- Bacterianas (*M. tuberculosis*, *T.pallidum*, *Leptospira* spp.)
- Fúngicas
- Parasitarias (*Toxoplasma gondii*, amebas)
- Postinfecciosas (sarampión, rubéola, varicela)

- **No infecciosas**

# INFECCIONES DEL SNC EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS

- **Bacterias**

- *Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis, Nocardia spp, S.pneumoniae, bacilos gramnegativos*

- **Virus**

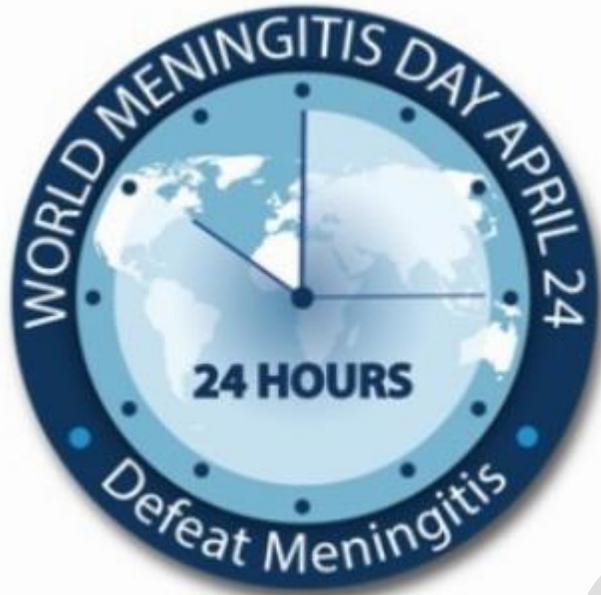
- VHS 1-2-6, VVZ, CMV, Virus JC

- **Hongos**

- *Cryptococcus neoformans, Mucorales.*

- **Parasitos**

- *Toxoplasma gondii, Acanthamoeba spp. o Balamuthia spp.*



Durante toda la jornada del Día Mundial de la Meningitis celebrada el día 24 de abril

# TIPO DE MUESTRA: LCR

- **El LCR** de paciente con sospecha de meningitis es una **muestra clínica prioritaria**.
- **Obtención del LCR antes** de la instauración del **tratamiento antibiótico**
- Siempre que sea posible, la muestra se repartirá en **tres tubos estériles**:
  1. Estudios bioquímicos e inmunológicos
  2. Estudio microbiológico
  3. Recuento de leucocitos y su contaje diferencial.

# Aspectos a tener en cuenta:

1. Una vez recibida la muestra hay que comprobar que cumple los requisitos necesarios para su procesamiento:
  - a) Correcta identificación
  - b) Enviar la cantidad máxima posible de LCR (mejor >3 mL)
  - c) Cuando el volumen obtenido es inferior al requerido para múltiples estudios resulta preceptivo indicar en la petición la prioridad de los estudios
  - d) Condiciones de transporte-conservación.
2. Siempre debe tomarse muestra de sangre para hemocultivos, bioquímica y serología

# ANÁLISIS CITOQUÍMICO DEL LCR

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

- La **meningitis** por *L. monocytogenes* constituye una excepción ya que el número de células puede ser inferior a 10<sup>3</sup> cel/mm, **con predominio linfocítico**.
- Hasta dos tercios de los pacientes con **meningitis enteroviral** tienen un **predominio polimorfonuclear** en el LCR cuando se **examinan al principio** del curso de la enfermedad
- La **meningitis** por *B. burgdorferi* cursa con **pleocitosis linfocítica, glucorraquia normal** y **proteínorraquia elevada**

# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Examen microscópico

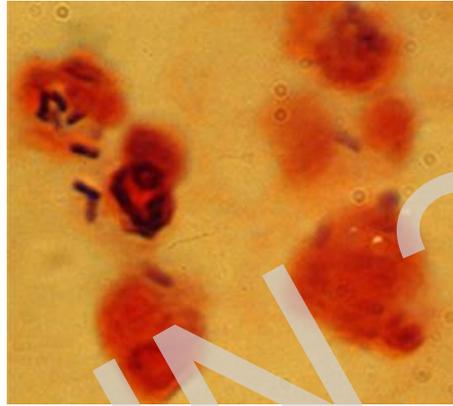
- **Tinción de Gram**
  - Alta especificidad
  - Sensibilidad:
    - 60 ~ 80% en pacientes que no han recibido tratamiento antimicrobiano
      - $\leq 10^3$  UFC/ml: 25%
      - $10^3 - 10^5$  UFC/ml: 60%
      - $> 10^5$  UFC/ml: 97%
    - 40 ~ 60% entre los que reciben tratamiento antibacteriano.
    - Detección: *Streptococcus pneumoniae* (90%) y *Listeria monocytogenes* (50%) en LCR recolectados de pacientes con meningitis bacteriana confirmada por PCR <sup>26</sup>
- **Tinción de Zhiel-Neelsen / Auramina-Rodamina:** *Mycobacterium tuberculosis*. Muestra una sensibilidad del 10-20%
- **Tinta China:** *Cryptococcus neoformans*. Baja sensibilidad

**Si bien estos métodos mantienen especificidades satisfactorias, las sensibilidades son relativamente pobres por lo tanto es necesario realizar siempre un cultivo en paralelo**

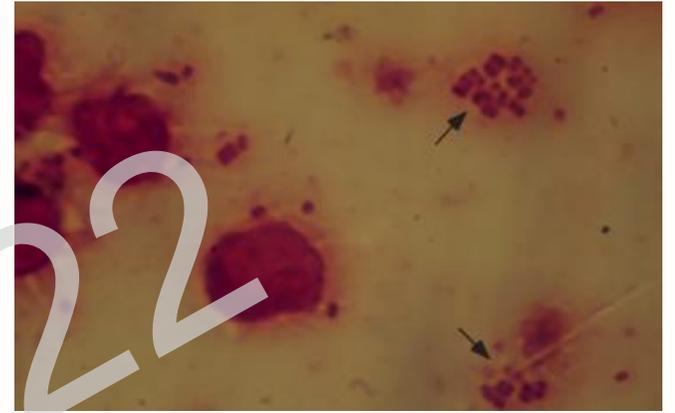
# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Examen microscópico

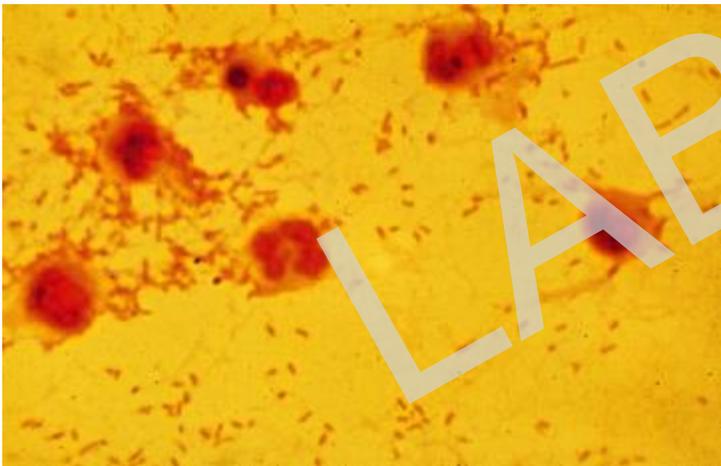
- Meningitis por *N. meningitidis*
- Meningitis por *S. pneumoniae*
- Meningitis por *H. influenzae*
- Meningitis por *L. monocytogenes*
- Meningitis por *S. agalactiae*



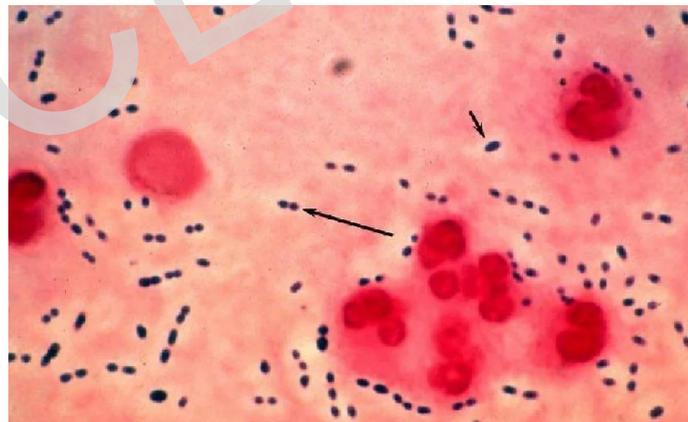
*L. monocytogenes*: bacilos grampositivos



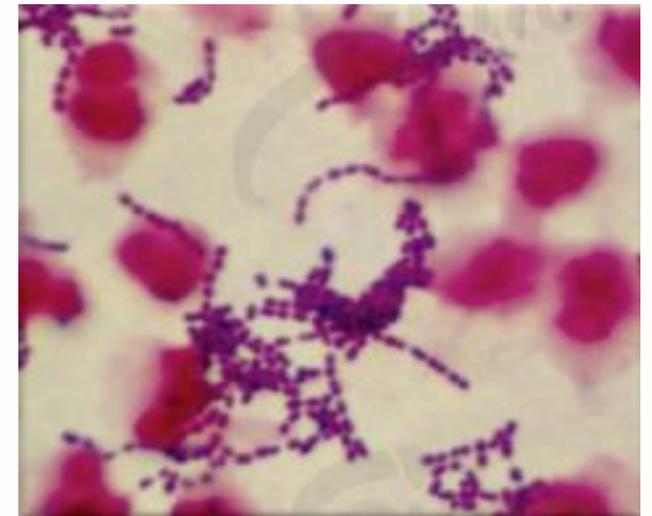
*N. meningitidis* diplococos gramnegativos



*H. influenzae*: cocobacilos gramnegativos



*S. pneumoniae* diplococos grampositivos capsulados

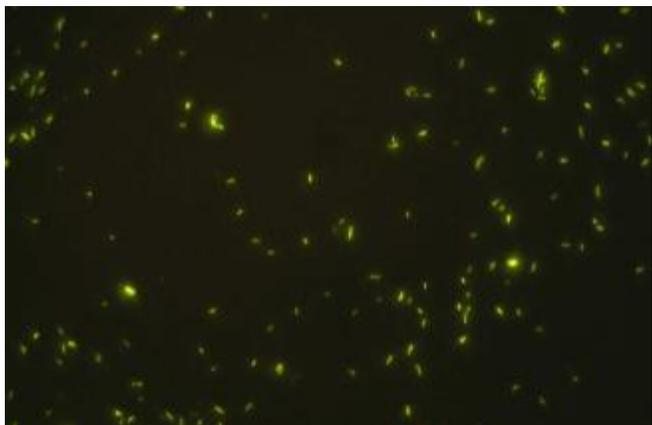


*S. agalactiae*: cocos grampositivos en cadena

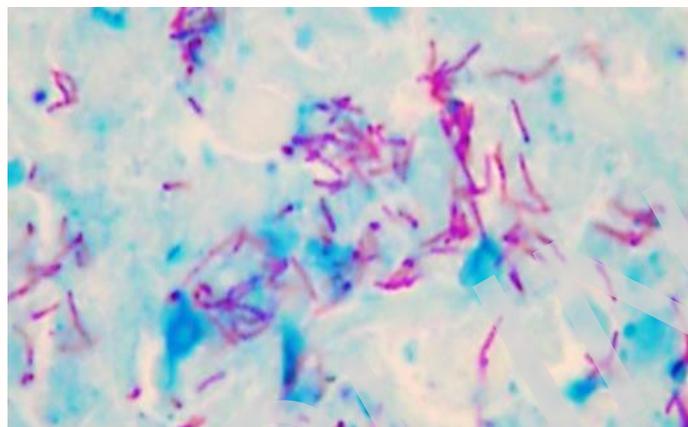
# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Examen microscópico

- Meningitis por *M. tuberculosis*

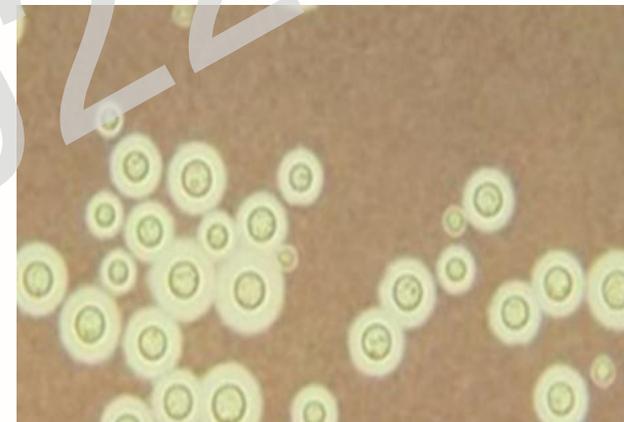


*T. Auramina-Rodamina: bacilos AAR*



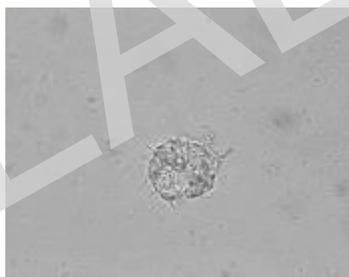
*T. Ziehl-Neelsen: bacilos AAR*

- Meningitis por *C. neoformans*

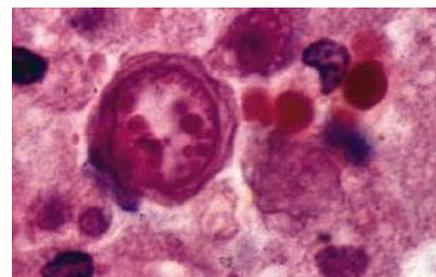


*Tinta china: levaduras capsuladas*

## Meningoencefalitis por amebas de vida libre: *Naegleria spp.*, *Acanthamoeba spp.* o *Balamuthia spp*



*Exámen fresco: trofozoito de Acanthamoeba*



*Tinción H-E: Quiste de Balamuthia*

# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Cultivo

- Tejido cerebral → diagnóstico definitivo → altamente invasivo.
- LCR → muestra de elección.
- Tipos: virales, bacterianos (incluido las micobacterias) y fúngicos:
  - Cultivo bacteriano habitual: 48 horas para la identificación final.
  - Cultivo de hongos: T. incubación hasta 10 días
  - Cultivo de micobacterias: T. incubación: 42 días. S:60-70%
  - Cultivo de virus: largo tiempo de respuesta → no proporciona el diagnóstico oportuno requerido para el manejo óptimo del paciente.
- El cultivo es el método diagnóstico de referencia, y permite realizar posteriormente estudios de sensibilidad y de tipificación

# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Medios de cultivo e incubación

Medios de cultivo enriquecidos



Agar chocolate



Agar sangre



Caldo thioglicolato



Incubación: 35- 37°C - 5%CO<sub>2</sub>, 5 días

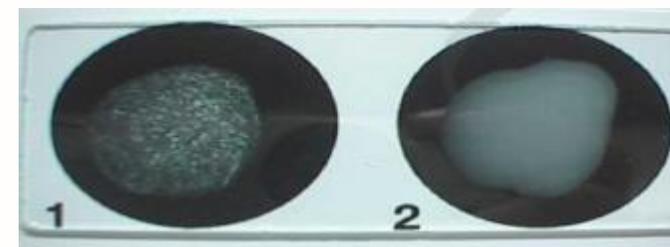
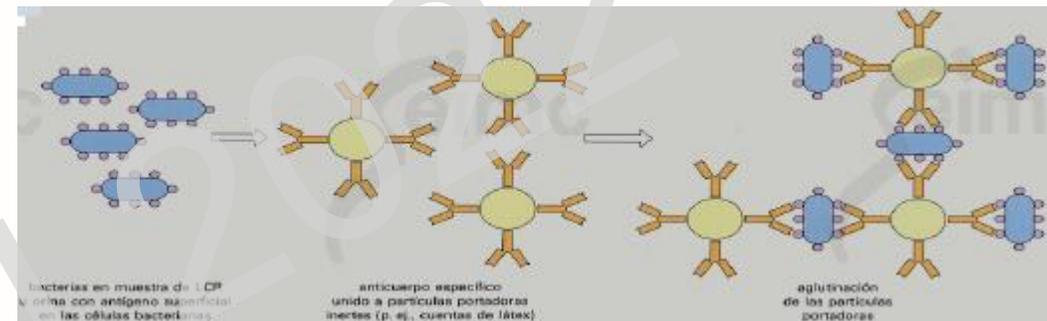


Lectura diaria y emisión de informes preliminares

# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Detección capsular

- *N. meningitidis* A, B, C, W, Y135
- *S. pneumoniae*
- *S. agalactiae*
- *E. coli* K1
- *H. influenzae* b



Sensibilidad en LCR 50-85%

Su principal indicación se centra en el diagnóstico de los casos tratados cuando no se dispone de técnicas de PCR.

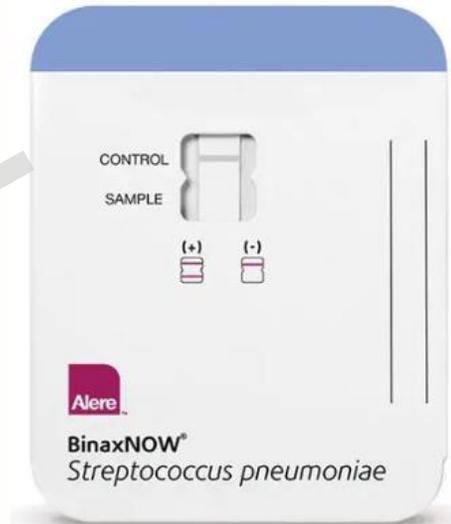
Actualmente descatalogado como KIT  
Hay que comprar los distintos reactivos por separado

# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Detección rápida de antígenos

- ***S. pneumoniae* Binax (IC):**

- Prueba rápida (15min) para la detección cualitativa del polisacárido C de *S. pneumoniae* en el LCR de pacientes con meningitis.
- S (80-94%) y E (90-100%)
- Diagnóstico de neumonía neumocócica y meningitis neumocócica.
- FP en niños < 12 meses (portadores). Resulta positiva durante meses tras la infección



- **Antígeno latex *Cryptococcus neoformans* (IC)**

- Antígeno criptocócico → S (93-100%) y E (93-98% ).
- Gran utilidad en el **diagnóstico rápido de meningitis** por este microorganismo.
- La **titulación de antígeno** polisacárido en suero o LCR ha demostrado ser un **marcador pronóstico**.
- Se han descrito **falsos positivos** (factor reumatoide, *Trychophyton beigelii*, y *Capnocytophaga canimorsus*) y **falsos negativos** (fenómeno de prozona)

# MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

## Serología

- Producción intratecal de anticuerpos específicos. En suero, un aumento de 4 veces el título de IgG entre el suero de fase aguda y el de fase convaleciente, o una única IgM positiva, pueden ser diagnósticas.
- Prueba serológica negativa no descarta infección.
- En poblaciones inmunocomprometidas: sensibilidad subóptima.
- Para ciertas infecciones, estos ensayos aún tienen un papel valioso:
  - VWN, VCML: IgM en LCR. IgM + IgG (neutralizantes) en suero
  - Virus de la varicela zoster (VZV): IgM o IgG (en LCR)
  - *Borrelia burgdorferi*: Serología IgM/ IgG → confirmación WB. En LCR o suero
  - *Treponema pallidum*: prueba VDRL (LCR)
  - *Brucella*. IgG + Ig A (suero).

# LIMITACIONES DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

- Exámen microoscópico y detección de antígenos: poco sensibles
- Cultivo: rendimiento limitado y aumento en el tiempo de respuesta
  - Varios patógenos humanos no se pueden cultivar
  - Sensibilidad limitada y la metodología requiere mucho tiempo.
- Serología: retraso en la respuesta inmunitaria
- Por tanto, muchas de estas limitaciones han sido superadas por la biología molecular que se describe a continuación.

# TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR: PCR

- Superan las limitaciones de las técnicas de diagnóstico convencional → herramientas rápidas y precisas en la detección e identificación de patógenos microbianos.
- Mayores tasas de detección
- Optimización del tratamiento antimicrobiano
- Actualmente, los métodos moleculares son consideradas técnicas altamente eficientes y alto valor diagnóstico .
- Varios ensayos moleculares comerciales autorizados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para la detección de patógenos microbianos objetivo en el LCR → singleplex o multiplex

# PCR Singleplex. EV y VHS

- PCR-RT basada en la detección de un SOLO agente infeccioso.
- La PCR es prueba de elección por su alta S y E respecto al cultivo de tejido cerebral en el diagnóstico de EV y VHS.
- Varios ensayos singleplex → detección cualitativa del EV y HSV.
  - Kit EV GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA) presenta una sensibilidad del 94% al 100%, con un tiempo de respuesta de alrededor de 2,5h. La técnica requiere 140 µl
  - Kit Simplexa HSV 1 y 2 (DiaSorin Molecular, Cypress, CA), presenta una sensibilidad del 96-98%, con un tiempo de respuesta de 1h. La técnica requiere es que solo requiere 50l de LCR, e incluso con 20µl
- Limitaciones
  - Excepcionalmente, en pacientes inmunocomprometidos se han descrito infecciones mixtas causadas por dos bacterias, dos virus y una bacteria y un virus.
  - Dada la variedad de microorganismos que causan meningitis y encefalitis dificulta confiar en los síntomas para inferir el agente causal de la infección.

# PCR: una diana o dos o tres dianas



- Epstein-Barr (EBV) + Citomegalovirus (CMV)
- Epstein-Barr (EBV)
- Epstein-Barr (EBV) + Citomegalovirus (CMV) + Herpesvirus 6 (VHH-6)
- *Escherichia coli* + *Streptococcus agalactiae*
- *Escherichia coli* + *Streptococcus agalactiae* + *Listeria monocytogenes*
- Enterovirus + Virus Herpes Simple (VHS-1 + VHS-2)+ Virus Varicela-Zóster (VZV) "
- Enterovirus
- Enterovirus + Parechovirus
- Enterovirus + Parechovirus + Virus parotiditis (MuV)
- Herpesvirus tipo 1 (VHS-1) + Herpesvirus tipo 2 (VHS-2) + Virus Varicela-Zóster (VZV) / Virus de Epstein-Barr (EBV) + Citomegalovirus (CMV)
- Herpesvirus tipo 6 (VHH-6)
- Herpesvirus tipo 1 (VHS-1) + Herpesvirus tipo 2 (VHS-2) / Virus Varicela-Zóster (VZV)
- Herpesvirus tipo 6 (VHH-6)"
- Herpesvirus tipo 6 (VHH-6) + Herpesvirus tipo 7 (VHH-7) + Herpesvirus tipo 8 (VHH-8) "
- Herpesvirus tipo 1 (VHS-1) + Herpesvirus tipo 2 (VHS-2)"
- Herpesvirus tipo 1 (VHS-1) + Herpesvirus tipo 2 (VHS-2) / Virus Varicela-Zóster (VZV)
- Coriomeningitis linfocitaria (LCMV)"
- *Listeria monocytogenes*
- *Neisseria meningitidis* + *Streptococcus pneumoniae* + *Listeria monocytogenes* / Enterovirus (EV) + Virus Herpes Simple (VHS-1 + VHS-2) + VZV
- *Neisseria meningitidis* + *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis* + *Streptococcus pneumoniae* + *Haemophilus influenzae*
- *Neisseria meningitidis* + *Streptococcus pneumoniae* + *Listeria monocytogenes*
- Enterovirus (EV) + Parechovirus + Virus de la Parotiditis / Herpesvirus tipo 1 (VHS-1) + Herpesvirus tipo 2 (VHS-2) + Virus Varicela-Zóster
- *Streptococcus agalactiae*
- Virus Toscana
- Varicela-Zóster (VZV)

- Alta sospecha clínica
- > Sensibilidad que multiplex para algunas dianas

# PCR Singleplex. MTB

- Ensayo Xpert MTB/Ri: sistema integrado y automatizado que permite la toma rápida de decisiones clínicas
- Metanálisis (13 estudios) → evaluar la detección de *M. tuberculosis* por PCR en LCR a partir de casos de meningitis tuberculosa:
  - S: 82% (IC del 95%: 75–87%) frente al cultivo
  - S: 68% (IC del 95%: 41–87%) frente al criterio clínico + cultivo.
  - Se requiere un volumen de muestra > 500 mcl y la centrifugación puede conducir a una mejora discreta en el rendimiento.
- A pesar de la falta de estandarización para el procesamiento de muestras, **la OMS ha aprobado** la prueba de LCR con el ensayo automatizado **Xpert MTB/RIF como prueba de primera línea** sobre la microscopía convencional en pacientes con sospecha de meningitis tuberculosa.
- La prueba **Xpert negativa NO excluye** MTB

(Méchaï, F., & Bouchaud, O. (2019). Tuberculous meningitis: challenges in diagnosis and management. *Revue neurologique*, 175(7-8), 451-457.)

- ❖ Metanálisis (20 estudios) ha demostrado que la medición del nivel **ADA en LCR** es una prueba adecuada en el **diagnóstico de MTB**.
  - La sensibilidad y la especificidad fueron del 89 % y 91% respectivamente .
  - Demuestra que las pruebas ADA tienen una precisión relativamente alta para MTB diagnóstico.
  - Se **recomienda** su uso para el **diagnóstico de MTB** en **IDSA/CDC/ATS** y **NICE**

Pormohammad A, Nasiri MJ, McHugh TD, Riahi SM, Bahr NC. A Systematic Review and Meta-analysis of the Diagnostic Accuracy of Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculous Meningitis. *J Clin Microbiol*. Jun 2019;57(6).

# PCR isotérmicas

- PCR basados en amplificación isotérmica (**LAMP**) tienen como ventajas el bajo coste del test, la rapidez con la que se puede obtener el resultado y no requieren ningún equipo especializado.
- Existen para detectar *N. meningitis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae-b*, *M. tuberculosis* y VEJ en el LCR.
- No existen estudios de validación publicados en la literatura → **se desaconseja su uso** por falta de sensibilidad

# PANELES PCR MULTIPLEX

- ¿Son lo suficientemente completos?
- ¿Son relevantes todas las dianas incluidas?
- ¿Reducen la administración y duración del tratamiento antimicrobiano?
- ¿Son rentables?

LABCLIN 2022

# Panel FilmArray® ME

El primer panel comercializado y aprobado por la FDA fue Filmarray Meningitis/Encefalitis – ME (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT).

Permite una detección rápida y precisa de los patógenos más comunes en las meningitis y/o encefalitis adquiridas en la comunidad, incluyendo virus, bacterias y levaduras.

## Bacterias

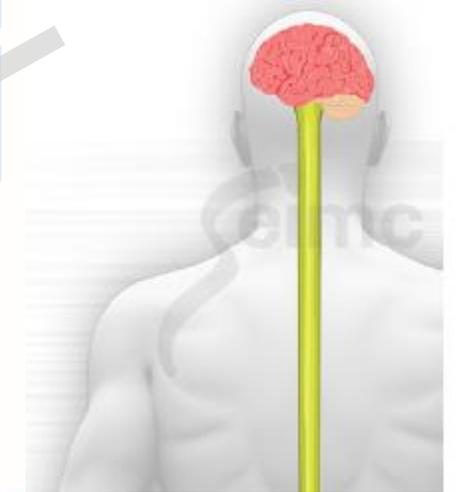
*E. coli*  
*H. influenzae*  
*L. monocytogenes*  
*N. meningitidis*  
*S. agalactiae*  
*S. pneumoniae*

## Levaduras

*Cryptococcus neoformans / gattii*

## Virus

*Citomegalovirus*  
*Enterovirus*  
*Herpes simplex type 1*  
*Herpes simplex type 2*  
*Human herpesvirus 6*  
*Parechovirus*  
*Varicella zoster virus*



## FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

1 Test. 14 Targets. All in about an hour.



### Bacteria

*Escherichia coli* K1  
*Haemophilus influenzae*  
*Listeria monocytogenes*  
*Neisseria meningitidis*  
*Streptococcus agalactiae*  
*Streptococcus pneumoniae*



### Viruses

Cytomegalovirus (CMV)  
Enterovirus  
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)  
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)  
Human herpesvirus 6 (HHV-6)  
Human parechovirus  
Varicella zoster virus (VZV)



### Fungi

*Cryptococcus neoformans/gattii*

Sensibilidad: 90% y Especificidad 97%

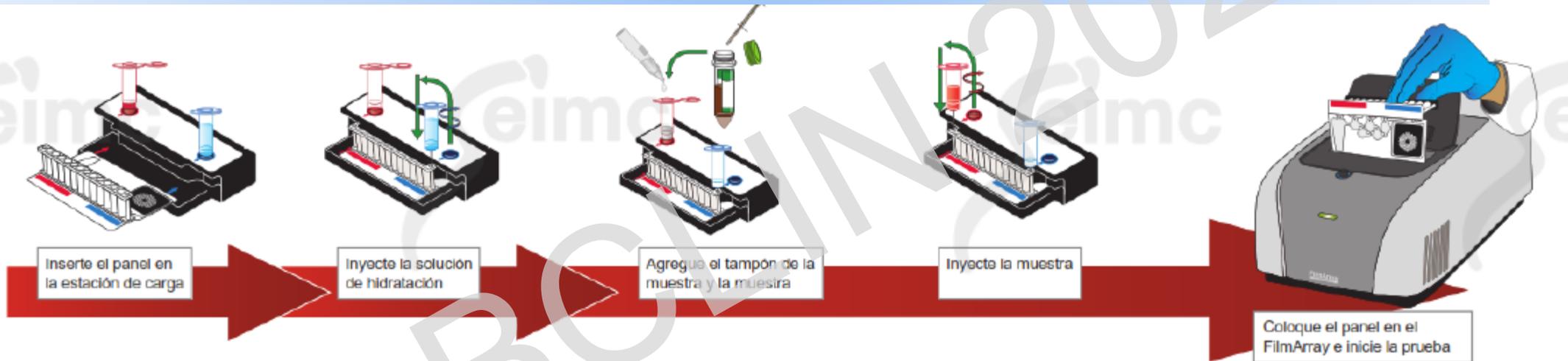
Tansarli, G. S., & Chapin, K. C. (2020).

Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(3), 281-290.

# Panel FilmArray® ME: Rapidez

## Tiempo de respuesta corto, mínima manipulación posible

Unos simples pasos de manipulación permiten la preparación de la prueba en apenas dos minutos.



**SIMPLE**  
Solo 2 min de manipulación

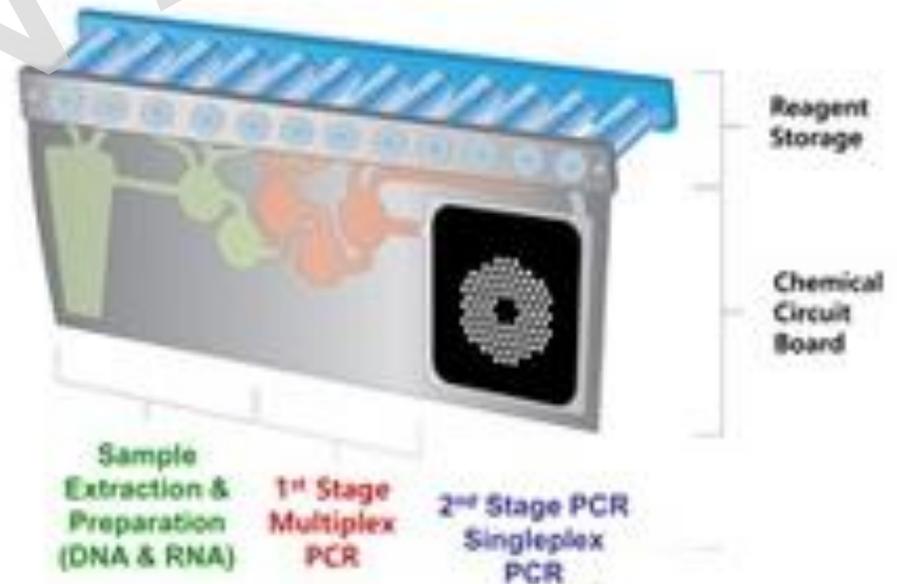
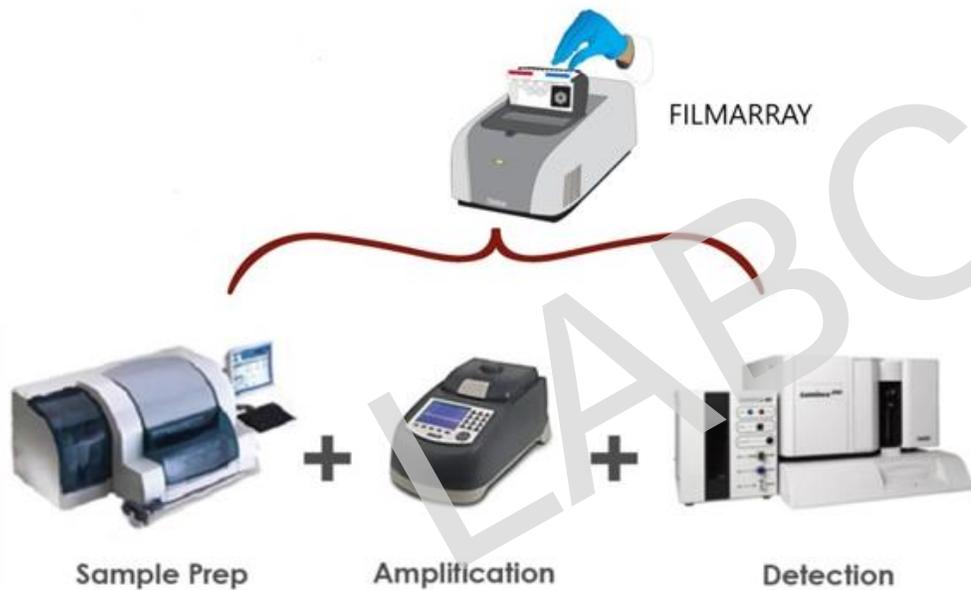
**FACIL**  
No precisa pipeteo  
200 µl de LCR

**RAPIDO**  
Run time de 1 hora

**Criterios de aplicación: pacientes con sospecha fundada de meningitis y/o encefalitis adquirida en la comunidad**

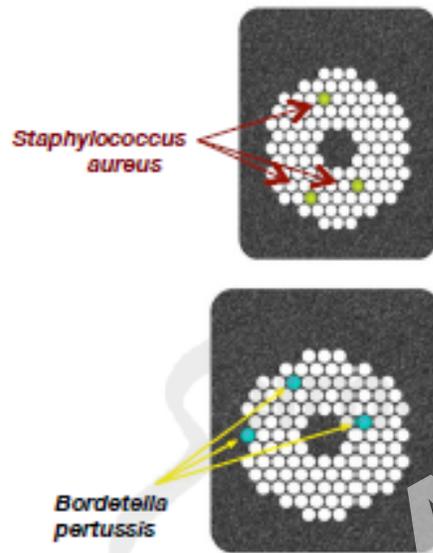
# Panel FilmArray® ME: Compacto

Integra la tecnología de extracción, amplificación y detección en un equipamiento compacto



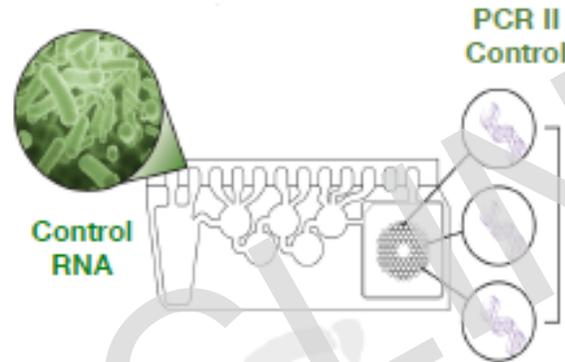
# FilmArray: Precisión

## Detección múltiple



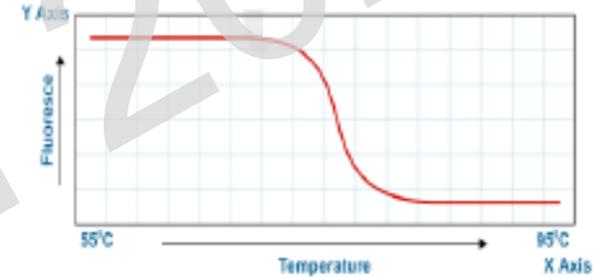
- Todas las dianas y controles se encuentran como mínimo por triplicado.
- Incrementa la sensibilidad de la técnica.

## Controles internos



- Control de PCR: DNA impreso en 3 pocillos del Array.
- Control del proceso: Levadura deshidratada que realiza todo el proceso.
- Garantizan el correcto funcionamiento de la prueba

## Curvas de Melting



- Incrementar la especificidad de la prueba al 99%
- Descartar reacciones cruzadas e hibridaciones.
- Confirmación del resultado

# PCR-Multiplex. Panel FilmArray® ME

- **Meta-análisis: 13 estudios**
  - Alta S y E: 90% y 97%, respectivamente
  - FP: 4% (*S. pneumoniae* y *S. agalactiae*)
  - FN: 1,5% (*HSV-1/2*, *EV*, *C. neoformans/gattii*)
  - La sensibilidad: bacterias > virus > levaduras

(Tansarli, G. S., & Chapin, K. C. (2020). Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(3), 281-290.)

- **FP.** Fundamentalmente bacteriana. Por contaminación en el momento de la recolección de LCR y / o técnica de manejo inadecuada por parte del personal del laboratorio.
- **FN *C. neoformans/gattii*:**
  - **Solo la mitad de muestras positivas** fueron detectados por el panel en comparación con la detección de antígenos → aclaramiento más prolongado del antígeno fúngico en comparación con el ácido nucleico fúngico
  - La mayoría de FN corresponde a una baja carga fúngica por debajo del límite de detección en **pacientes con tto antimicótico** que a menudo muestran AgCr positivo durante un período de tiempo prolongado. → esta observación es consistente con la mayor sensibilidad del panel en la detección de meningitis por *Cryptococcus* en una cohorte de pacientes con enfermedad aguda no tratada

# PCR-Multiplex. Panel FilmArray® ME

- FN *C. neoformans/gattii*:
  - La PCR **no es una prueba de seguimiento** a pacientes positivos conocidos durante el tratamiento y no debe reemplazar a AgCr en esta población de pacientes.
  - Este panel tiene un **alto VPP** y se ha demostrado que detecta la infección en pacientes con baja sospecha de enfermedad criptocócica.
  - No obstante, los retrasos diagnósticos en pacientes al principio de su enfermedad debe llevar a interpretar cualquier resultado molecular negativo con precaución, y por tanto la detección de **antígeno criptocócico probablemente siga siendo el estándar de referencia.**
- FN EV/VHS:
  - Ensayo multiplex negativo en un paciente con **alto índice de sospecha**, como el **VHS neonatal** o **el paciente inmunocomprometido**, es necesario **realizar un ensayo *singleplex*** para LCR, sangre y / o lesiones.
  - Detección VHS-1/2 y EV mediante PCR *singleplex* son más sensibles que los ensayos multiplex. La **aparición de mutaciones y las variaciones de las cargas virales** pueden explicar parcialmente estos hallazgos discrepantes
  - El **límite detección (más alto) del panel *FilmArray*** en comparación con RT-PCR *singleplex* explica el menor rendimiento del panel en la detección de VHS y EV.

# PCR-Multiplex. Panel FilmArray® ME

- Es importante destacar que un **ensayo multiplex negativo NO significa** que el paciente sea **negativo para meningitis / encefalitis** si existen otras circunstancias clínicas apropiadas, como un trauma externo donde los patógenos no serían los de la EM adquirida en la comunidad.
- **Descartar ME por VHS** puede conducir a una **disminución del uso profiláctico de aciclovir** y la nefrotoxicidad asociada en pacientes pediátricos
- **Descarta ME por EV** evitan **tratamientos antibióticos innecesarios**, la causa más común de meningitis aséptica en bebés y con presentación clínica similar a una infección bacteriana
- El panel **ME es la única prueba aprobada por la FDA** que también detecta **HPeV**,
- Los **virus latentes (CMV)** requieren una interpretación de los resultados. Un resultado positivo probablemente no **indique una infección activa** → es necesario cuantificar
- El **HHV-6** puede **integrarse** en el genoma humano (prevalencia aprox 1% de la población general). Valorar en **inmunodeprimidos**.
- **Punción lumbar traumática** resultados inespecíficos respecto al **patógeno detectado es del LCR o de la sangre periférica**

# PCR Multiplex: Otros paneles multiplex

- Además de Filmarray → otros paneles que tienen marcado CE
  - Allplex™ Meningitis (Seegene, KOR)
  - MeningoFinder® 2SMART (Pathofinder, NL)
  - Diagnóstico fast-track, que cuenta con diferentes paneles (adquirido por Siemens, DE)
  - CertTest, que también tiene varios paneles (CerTest Biotec, ES).

# Ventajas de la PCR

- Técnicas **fáciles** de usar
- **Resultados rápidos** que ayudan al manejo óptimo del paciente, pautando el correcto tratamiento y disminuyendo así el uso innecesario de antibióticos
- **Útil** en pacientes con **meningitis tratadas**
- El **impacto positivo** del sistema FilmArray® en los **costes sanitarios y la duración del tratamiento antimicrobiano** ha sido demostrado en pacientes inmunocompetentes.
- La PCR de **EV reduce** significativamente el **uso de antibióticos** y la **duración de la hospitalización** y sus **costos**
- La PCR **HSV y VZV reduce** la duración del **tratamiento innecesario con aciclovir**.

# Limitaciones de la PCR

- **No** se pueden **detectar patógenos distintos a los incluidos** en el panel ME:
  - Agentes infecciosos que afectan a pacientes inmunocomprometidos o pacientes post-neuroquirúrgicos.
  - VEJ, VJC, VCML, VEB, sarampión, adenovirus, *Leptospira* sp, *Treponema pallidum*
- Detección de **falsos positivos** (contaminación) y **falsos negativos** (baja carga) .
- **VVH-6**: No distingue entre microorganismos viables e inviables.
- Faltan más **análisis de costo-eficiencia de los paneles de EM**, y es probable que el alto costo de estos paneles en todos los pacientes con sospecha de meningoencefalitis no sea rentable.
- Un **ensayo multiplex negativo no puede excluir una infección**.
- Las pruebas de PCR para la **neuroborreliosis y la neurosífilis** están bien documentadas por ser menos sensibles que los ensayos serológicos.

# CONCLUSIONES

1. Las infecciones del SNC requieren de un diagnóstico rápido
2. Las técnicas de diagnóstico microbiológico convencionales siguen siendo de utilidad clínica, pues representan en algunos casos el método de referencia en la identificación del agente infeccioso y la única forma en la obtención del estudio de sensibilidad
3. Ante una alta sospecha de meningitis/encefalitis con pruebas diagnósticas negativas es necesario el empleo de pruebas complementarias que ofrezcan una mayor sensibilidad
4. Las técnicas basadas en biología molecular son altamente eficientes pero deben ser realizadas bajo ciertos criterios clínicos con el fin de obtener la máxima rentabilidad posible
5. Es aconsejable desarrollar paneles de PCR-multiplex bacterianos y víricos con formatos independientes, ya que la coinfección es poco probable