

3° Jornada Nacional de Medicina Interna Pediatrica
11 Agosto 2012, Buenos Aires
Sociedad Argentina de Pediatría

Mesa Redonda
Afecciones del Sistema Nervioso Central

**Nuevos Estudios Anatomopatologicos para Infecciones del
Sistema Nervioso Central**

Eugenia Arias Cebollada

Medica-Magister Scientiarum

Genetica Humana.

Departamento de Neuropatologia y Biologia molecular

FLENI earias@fleni.org.ar



Técnica directa de detección

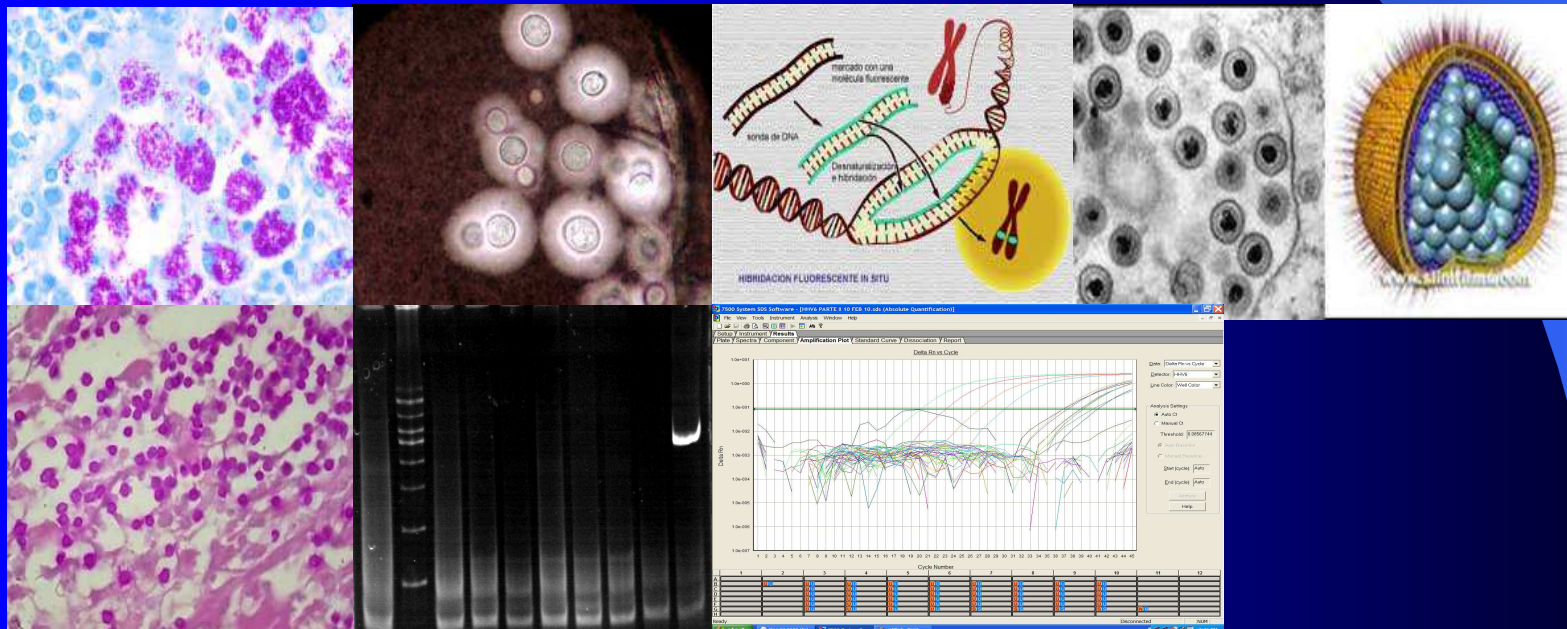
LABORATORIO DE PATOLOGIA

Descripción y estudio anatómo-patológico

- Microscopia luz
- Microscopia electrónica
- Demostración de antígenos

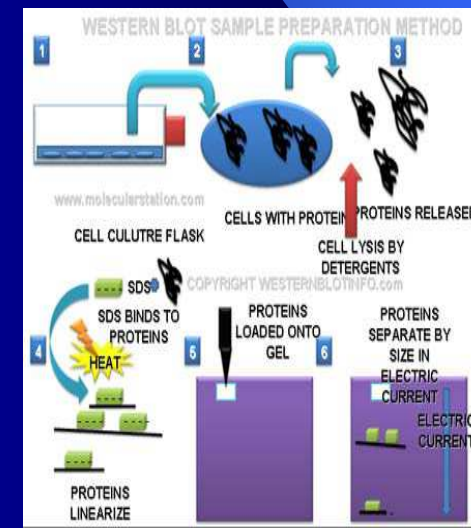
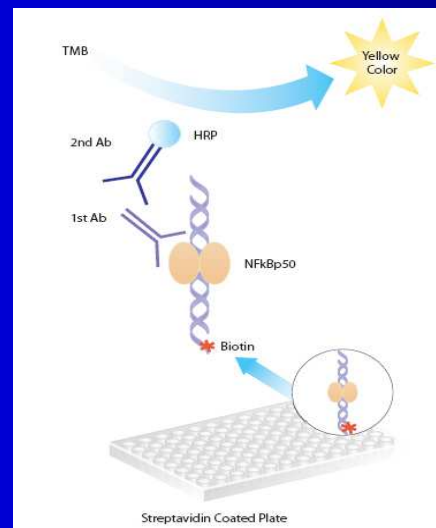
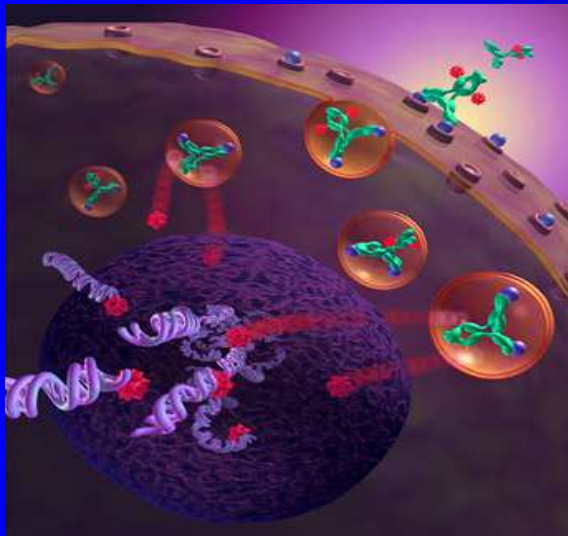
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

- Evidencia de material genético.



Técnica indirecta de detección

- Corresponden a las técnicas serológicas.
- Fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, ELISA, inmunoblot o Western blot.



Obtención y preservación de la muestra

- **Sangre** se extrae en tubo con EDTA, o citrato y se enviará a 4°C. **Suero o Plasma** .

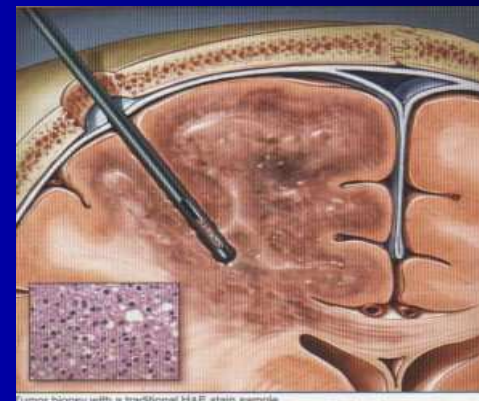
Líquido Cefalorraquídeo (LCR) o BAL

- **TRANSPORTE:** Debido a la facilidad de la destrucción del ARN, las muestras deben ser transportadas en perfecto estado de **CONGELACION**.
- **CONDICIONES:** LCR no hemático, preferiblemente debido a la dificultad en la interpretación de los resultados y posibilidad de no ser apto para diagnóstico.
- **VOLUMEN:** se requiere al menos 250ul de LCR para una determinación y dependerá de la cantidad de células que contenga el líquido la calidad de la determinación. Si es inflamatorio aunque tengamos 250ul, se pueden realizar al menos 8 determinaciones.

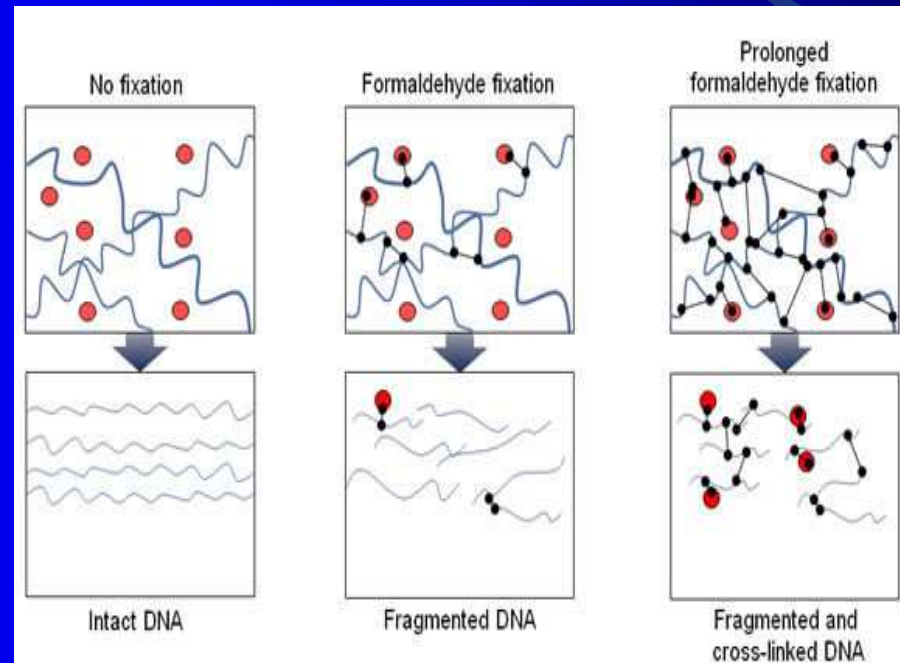
En caso de ser un líquido con escaso contenido celular (1-2 células) se requiere de al menos 2ml para 8 determinaciones.

BIOPSIA

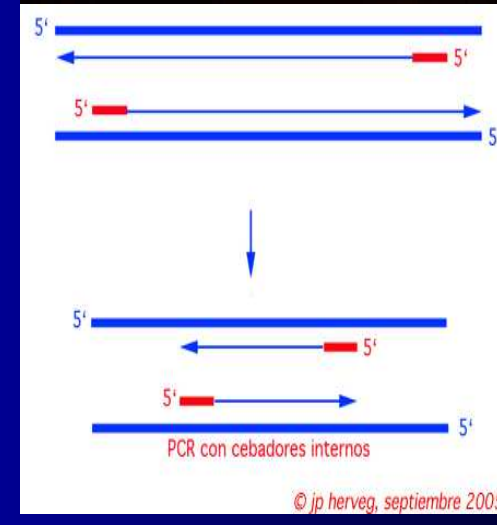
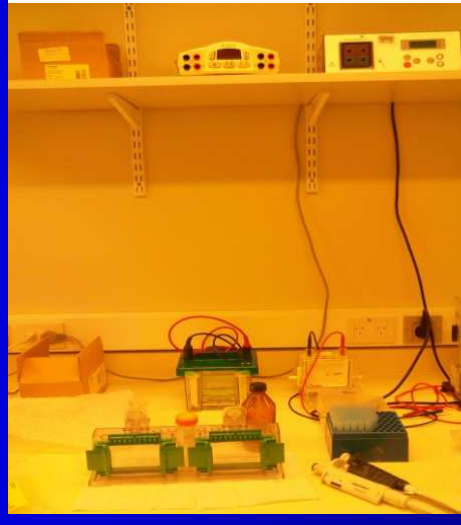
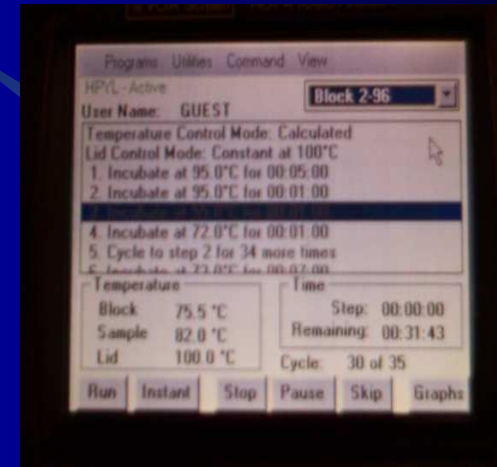
- El material en fresco es ideal para la obtención de ADN o ARN. Debe congelarse a -80 grados C. Debe ser conservado adecuadamente .



Fijación y procesamiento de la muestra

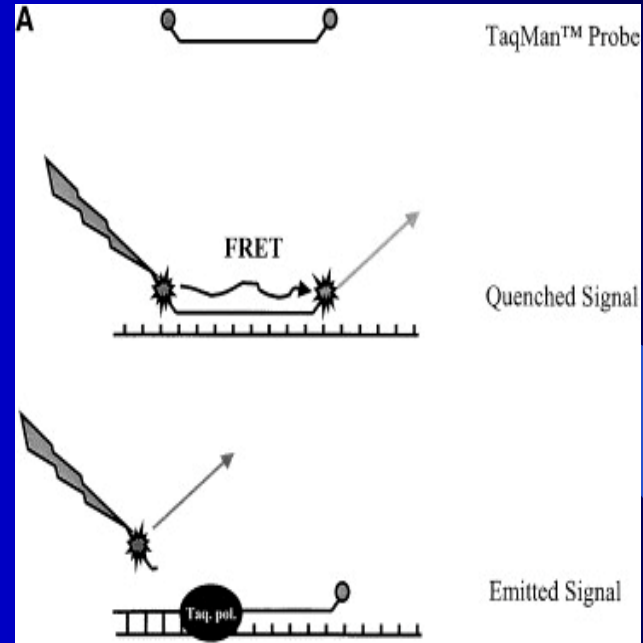


Método PCR anidada y tiempo de duración



© jp herveg, septiembre 2005

Método PCR en tiempo real y tiempo de duración



Sensibilidad y Especificidad

Falsos **Positivos**

Tipo de tejido a evaluar (LCR o Tejido)

Concentración de material genómico: contaminación por arrastre del amplicon

Tipo de PCR directa (tejido) o anidada (LCR)

Amplifica un agente distinto al que buscamos: secuenciación cuando hay duda

Presencia de genoma viral sin actividad lítica???

No se trabaja con controles positivos

Controles negativos varios

Contaminación por infección de los que manipulan la muestra

Falsos **Negativos**

Tipo de PCR directa (tejido) o anidada (LCR).

Descartar inhibidores de la Taq Polimerasa

Secuestro de cebadores u oligómeros por exceso de material genómico

Fijación agresiva y deterioro del material genómico

Utilización de control genómico humano para validación de la determinación

Ventana de la infección y toma de la muestra



Pruebas diagnosticas

Especificidad Verdaderos Negativos
 $\frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}}$

Sensibilidad Verdaderos Positivos
 $\frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$

La seguridad de la prueba diagnostica.

Valor Predictivo Positivo Verdadero Positivo
 $\frac{\text{Verdadero Positivo}}{\text{Verdadero Positivo} + \text{Falsos Positivos}}$

Valor Predictivo Negativo Verdadero Negativo
 $\frac{\text{Verdadero Negativo}}{\text{Verdadero Negativo} + \text{Falsos Negativos}}$

Infecciones virales del Sistema Nervioso Central

ADN doble cadena

Herpesviridae

HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6,

HHV7, HHV8, B-virus

Adenoviridae

ADENOVIRUS (*virus ayudador*)

Papovaviridae

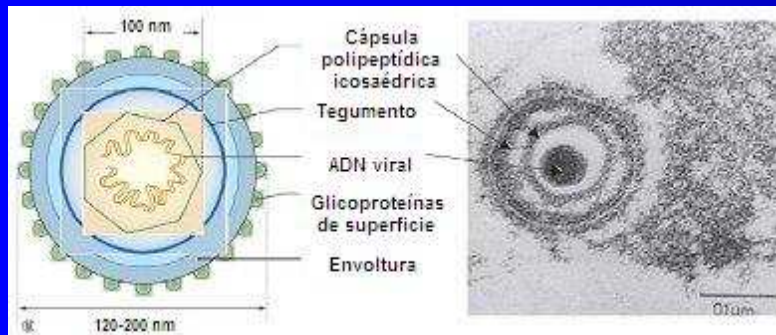
SIMIAN virus 40

JC/BK virus

ADN cadena simple

Parvoviridae

PARVOVIRUS B19



ARN doble cadena

Reoviridae

ARN cadena simple sense no segmentada

Retroviridae

ONCOVIRUS (HTLV-I, HTLV-II)

LENTIVIRUS (HIV-1, HIV-2)

Coronaviridae

CORONAVIRUS

Togaviridae RUBIVIRUS (RUBEOLA)

Flaviviridae WEST NILE

Picornavirus ENTEROVIRUS

ARN cadena simple antisense segmentada

Bunyaviridae HANTAVIRUS

Arenaviridae ARENAVIRUS (LCMV)

ARN cadena simple antisense no segmentada

Paramyxoviridae MORBILLIVIRUS (SARAMPION)

RUBULAVIRUS

(PAROTIDITIS)

Orthomyxovirina INFLUENZA VIRUSES

Rhabdoviridae RABIES BORNA

Filoviridae EBOLA

Infecciones bacterianas y parasitarias del Sistema Nervioso Central

Era Post- vacunas

Haemophilus influenzae tipo b (Hib), 2 meses a 3 años (Otoño)

Neisseria meningitidis (meningococo) niños, adolescentes y >50 años(Primavera)

Streptococcus pneumoniae (pneumococo), >40 años (Invierno)

Otras *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* ssp., *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, los *Streptococcus* del grupo B y la *Listeria monocytogenes* son causa cada vez más frecuente de meningitis.

Mycobacterium tuberculosis (individuos inmunocomprometidos)

Mycoplasma pneumoniae (disminuye citoquinas dispara reactivación de herpes)

Tropheryma whippelii (enfermedad del macrófago)

Parasitos

Toxoplasma gondii LCR : PCR, serología; biopsia cerebral: PCR biopsia

Strongyloides stercoralis Detección del parasito en materia fecal

Neurocisticercosis Detección ELISA

Frecuentes infecciones oportunistas

- *Pneumocystis jiroveci* pneumonia asociada a presencia de herpes
- cryptococcal meningitis



Experiencia del diagnóstico de agentes infecciosos por PCR en alteraciones del Sistema Nervioso Central en FLENI

Arias E¹, Martinetto H¹, Pérez S, Mora A², Del Castillo M², Arakaki N¹, Taratuto A¹, Sevlever G¹.

Departamento de Neuropatología¹ e Infectología², Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI).

Especimen	LCR	Tejido cerebral	BAL
APTOS/NOAPTOS	520/43 (7.6%)	207/16 (7%)	35/5 (12.5%)
Positivos/Negativos	82/438 (16%)	53/154 (26%)	17/18 (49%)
HIV	12 (2%)	33 (15%)	7 (18%)
Virus/bacte/parasitos	+/-	+/-	+/-
HSV1	21+8co/354 (8%)	6/80 (7%)	3+1co/5 (44%)
HSV2	10+1co/368 (3%)	1/40 (2.4%)	0/8 (0%)
VZV	15+1co/310 (5%)	1+1co/17 (10.5%)	0/4 (0%)
EBV	9+6co/267 (5%)	4/43 (8.5%)	2+1co/2 (60%)
CMV	5+2co/276 (2.5%)	2/30 (6%)	7+5co/21 (36%)
HHV6	3+1co/200 (2%)	7+2co/87 (9%)	3co/8 (27%)
TOXO	1+1co/6 (25%)	6/18 (25%)	0/0
JC	6+1co/30 (19%)	18/44 (29%)	0/0
TBC	0/117 (0%)	6/44 (12%)	0/7 (0%)
Mycoplasma pneumon.	2/249 (1%)	0/5 (0%)	0/1 (0%)
Tropheryma whippelii	1/30 (3%)	0/7 (0%)	0/0
TOTAL	82(73+9co)/438 (16%)	53(51+2co)/154 (26%)	17(12+5co)/18 (49%)
<i>Origen:</i> Datos de las PCR en LCR, tejidos y BAL	Liquidos Cefaloraquideos FLENI-5años	Tejidos cerebrales	Lavados broncoalveolares

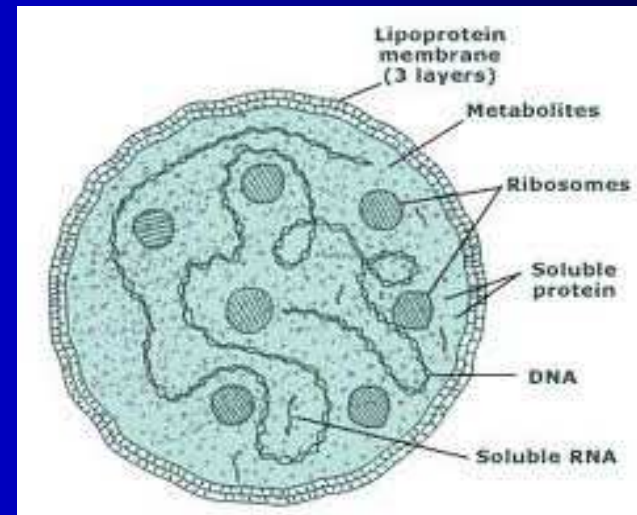
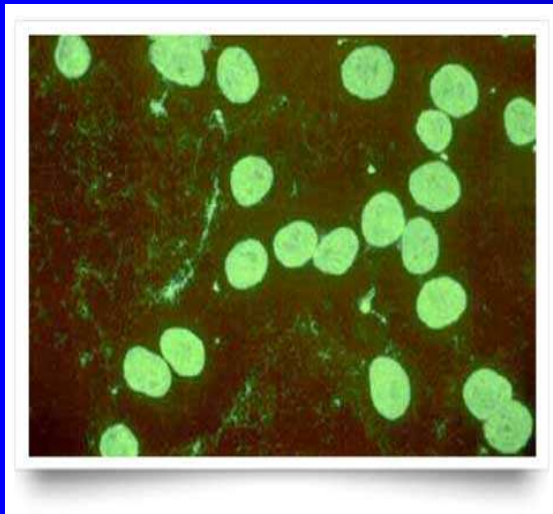
Resultados en LCR de acuerdo al grupo etario

Grupo	Etario	Edad	X±SD	LCR+	Virus	n	hsv1	hsv2	vzv	ebv	cmv	hsv6a	hsv6b	ic	toxh	tbc	myc	wp
0-8		2.5±1.7		10	10		3	2	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0
9-18		13.9±2.6		14	17		8	1	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0
19-28		24.4±2.		9	11		4	2	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
29-38		33.4±2.7		15	19		6	2	1	4	1	0	0	3	2	0	0	0
39-48		43.7±2.5		6	6		2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
49-58		54.4±3		10	12		2	1	3	3	1	0	0	1	0	0	1	0
59-68		64.7±3.5		14	15		3	1	4	3	0	1	0	2	0	0	0	1
>69		79.0±3.4		4	4		1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Total				82	94		29	11	16	15	7	3	1	7	2	0	2	1



Detección por PCR “anidada” de *Mycoplasma pneumoniae*

- La infección por *Mycoplasma pneumoniae* se observó en pacientes inmunocompetentes por evidencia serológica y/o PCR sin ser detectada en el tejido nervioso, clasificando estos casos como agentes posibles. En dos casos, parecía que el *Mycoplasma p.* actúa como reactivador de HSV1 y otro HHV6.
- Anti-NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) 2 teratomas, de los 8 restantes 4 tenían evidencia de infección aguda por *Mycoplasma pneumoniae*.



Reporte de Caso

ENCEFALITIS RECURRENTE POR
VIRUS HERPES HUMANO TIPO 6 EN
UNA PACIENTE ADULTA E
INMUNOCOMPETENTE CONFIRMADA POR
BIOPSIA CEREBRAL

*Dr. Patricio Brand, Dra. Lucía Schottlaender,
Dra. María Inés Gaitán, Dra. Eugenia Arias, Dra. Marcela Fiol,
Dra. Andrea Mora, Dr. Marcelo del Castillo.*

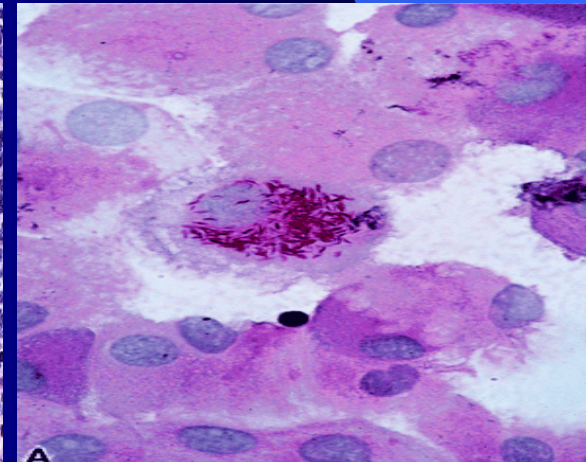
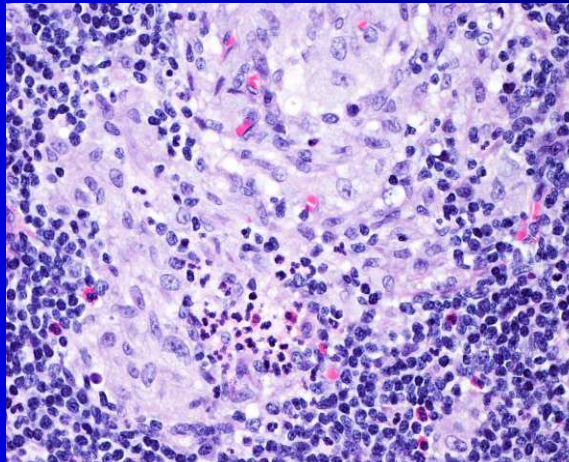
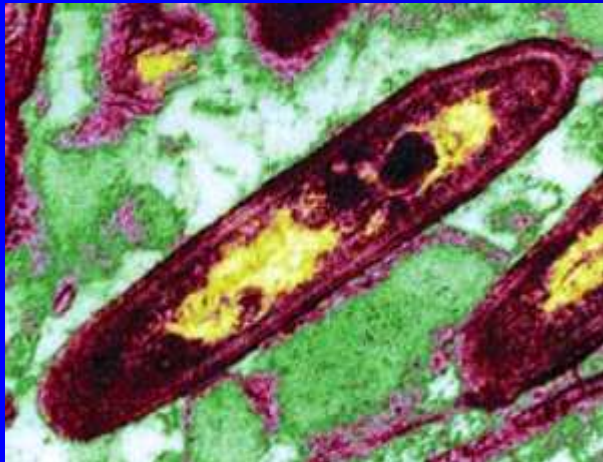
tible y la confirmación histopatológica de encefalitis, sugieren fuertemente el rol del virus como agente etiológico de la enfermedad de nuestra paciente. Hemos interpretado la PCR positiva inicial en líquido cefalorraquídeo para *Mycoplasma pneumoniae* como un falso positivo, dado que no se obtuvo la PCR positiva en el tejido cerebral ni evidencia serológica para dicho microorganismo. Además, a pesar de haber cumplido el esquema antibiótico adecuado con doxiciclina, continuó presentando nuevos episodios de su enfermedad.

For genomic analysis, DNA was extracted from whole CSF. Nested PCR was performed under stringent conditions with precautions to avoid **false positive** results. PCR analysis detected *Mycoplasma pneumoniae* DNA. CSF PCR was negative for HSV and VZV. Serologic tests for HIV and TBC, were negative. *Mycoplasma pneumoniae* serology IgG 1:256, IgM negative.

Detección por PCR *Tropheryma whippelii*

La sola presencia de ADN de *T. Whippelii* por PCR, sin demostrar la presencia de macrófagos, no equivale a enfermedad de Whipple. Así, que será dudoso donde síndromes clínicos (poliartritis) mas la demostración de ADN de *T. Whippelii* sola sin la demostración de macrófagos PAS positivos, califican para una forma frustrada de enfermedad de Whipple.*J.Clin Microb,p5414,2005

- El ADN de *Tropheryma whippelii* en saliva de individuos sin enfermedad de Whipple. Defecto inmunológico no caracterizado, se considera una enfermedad del macrófago.
- El ADN de *T. whippelii* en 40% de muestras gingivales de sujetos sanos. Así, como pacientes con enfermedad de Whipple (confirmados con biopsias intestinales PAS-positivas) fueron negativos para la PCR en sangre.
- Deactivation of Macrophages with **Interleukin-4** Is the Key to the Isolation of *Tropheryma whippelii*. Gabriele Schoedon, Daniel Goldenberger, Regula Forrer, Anja Gunz, Fabrizio Dutly, Mathias H"ochli, Martin Altwegg, and Andreas Schaffner.



Gracias

