

Estandarización de RT-PCR en LCR de pacientes pediátricos con infección del sistema nervioso central por enterovirus

Guadalupe García-Elorriaga,* Amalia Esparza-García,**
Claudia Méndez-Rojas,* Guillermo del Rey-Pineda,*** César González-Bonilla*

* Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología, ** Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital de Infectología Dr. Federico Méndez, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS.

*** Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

CSF RT-PCR standardization in pediatric patients with enteroviral central nervous system infection

ABSTRACT

Objective. We standardized the RT-PCR panviral CSF and determined its applicability in detecting acute enterovirus infection in the central nervous system in children under 15 years. **Material and methods.** RT-PCR was performed directly in CSF samples of 10 pediatric patients with suspected CNS infection and 9, with different conditions of the central nervous system. **Results.** 80% (8/10) of RT-PCR samples were positive for enterovirus in patients with suspected CNS infection and no sample was positive in patients with different ailments. **Conclusions.** Since enteroviruses are among the main etiologies of pediatric encephalitis, RT-PCR could be particularly useful for rapid detection in CSF.

Key words. Enterovirus. RT-PCR. Infection of the CNS.

RESUMEN

Objetivo. Estandarizar la RT-PCR panviral en LCR y determinar su aplicabilidad para detectar infección aguda por enterovirus en el sistema nervioso central en menores de 15 años. **Material y métodos.** Se realizó RT-PCR directamente en muestras de LCR de diez pacientes pediátricos con sospecha de infección del sistema nervioso central y en nueve con padecimientos diferentes del sistema nervioso central. **Resultados.** El 80% (8/10) de las muestras fueron RT-PCR positivas para enterovirus en los pacientes con sospecha de infección del sistema nervioso central; ninguna muestra resultó positiva en los pacientes con padecimientos diferentes. **Conclusiones.** Ya que los enterovirus se encuentran entre las principales etiologías de encefalitis pediátrica, la RT-PCR podría ser particularmente útil para su detección rápida en LCR.

Palabras clave. Enterovirus. RT-PCR. Infección del SNC.

INTRODUCCIÓN

Se han caracterizado más de 90 serotipos entre los enterovirus humanos (HEVs), pero solamente se reconocen 68 en la taxonomía actual.¹ Se dividen en cuatro especies (HEV-A a -D); los tres serotipos de poliovirus están cercanamente relacionados a los serotipos de NPEV (no polio EV) incluidos dentro de las especies de HEV-C.²

Los EV pueden causar un amplio espectro de enfermedades que van desde un catarro de verano has-

ta miocarditis y encefalitis, pero las infecciones generalmente permanecen asintomáticas; asimismo, ocasionan pérdidas económicas y sociales significativas.³⁻⁵ Cuando la inmunidad está intacta, las infecciones tienen un curso autolimitante y el virus se elimina. Los enterovirus son responsables de 80-90% de todos los casos de meningitis aséptica^{6,7} y de 5% de encefalitis.⁸

La relevancia de la infectividad de los enterovirus queda de manifiesto en el estudio de Lamarão, *et al.*,⁹ en el cual –por medio de cultivos virales– obtie-

nen una prevalencia de meningitis aséptica de 13.2%; al estratificar, 57.6% fueron pacientes menores de 11 años y los virus aislados fueron coxsackievirus B5 y Echovirus 30 y 4.

El diagnóstico se debe basar en la historia médica y el examen, seguido por el análisis del LCR para niveles de glucosa y proteínas, análisis celular e identificación del patógeno por PCR.¹⁰

El uso de medios celulares múltiples es el mejor método para la recuperación de EV. Para mejorar la efectividad de su aislamiento e impedir el uso innecesario de antibióticos es apropiado el uso de métodos diagnósticos de laboratorio sensibles y rápidos, tales como la PCR.¹¹⁻¹³

Debido a que todos los serotipos de enterovirus tienen una región conservada 5' no traducida, el uso de iniciadores provenientes de esta región ofrece un medio de identificación de la mayoría de los enterovirus que infectan a humanos.^{14,15} La detección de la región 5' no codificadora del genoma enteroviral en LCR es el estándar de oro para el diagnóstico de infección del SNC por EV y proporciona resultados oportunos en la clínica.¹⁶⁻¹⁹ En el presente trabajo los iniciadores seleccionados correspondieron a la mencionada región; además, el RNA enteroviral únicamente se había detectado en exudados faríngeos y en muestras de heces.²⁰

El diagnóstico molecular se convierte en el estándar de oro y su uso en el momento de la admisión del paciente (sobre la única base de la sospecha clínica de meningitis) ha brindado datos muy confiables. Los datos citológicos y bioquímicos del análisis del LCR son de bajo valor predictivo para influir en la decisión inicial de tratar con antibióticos.¹⁶ Las pruebas con ácidos nucleicos son más sensibles que los cultivos en el diagnóstico de infecciones enterovirales. En los centros en donde el tiempo de entrega para estas pruebas es < 24 h se pueden ahorrar costos e impedir el tratamiento antibiótico innecesario de meningitis aséptica.²¹

La prueba de EV-PCR debe hacerse de rutina en el laboratorio de los hospitales y considerarse como parte del manejo inicial de meningitis.²²

La meningitis inicia con manifestaciones que generalmente son inespecíficas para una etiología dada. El principal dilema para el clínico es decidir el inicio de un tratamiento probabilístico. En el Departamento de Infectología Pediátrica del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional (CMN) La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la infección viral aguda del SNC está dentro de los principales diagnósticos de internamiento, representa 80% de los ingresos. La

infección por enterovirus en el SNC causa diferentes presentaciones clínicas, las cuales se han relacionado con la edad del paciente: en escolares es común encefalitis y meningitis; sin embargo, la información sobre la frecuencia de las manifestaciones no neurológicas en otros grupos de edad es limitada. En México, el cultivo de células para el aislamiento viral no está al alcance de los laboratorios clínicos y hospitales.

OBJETIVO

Estandarizar la RT-PCR panviral en LCR y determinar su aplicabilidad en la detección de infección aguda por EV en el SNC en menores de 15 años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se evaluaron diez pacientes que ingresaron a los Servicios de Urgencias y Neurología Pediátrica del Hospital General, CMN La Raza, así como al Servicio de Infectología Pediátrica del Hospital de Infectología del CMN La Raza. Con los diagnósticos de meningitis aséptica o encefalitis aguda de probable origen viral, fiebre sin causa explicable en menores de un año y crisis convulsivas desencadenadas por fiebre en menores de seis años. El tamaño de muestra fue pequeño porque se trató de un estudio piloto para estandarizar la prueba.

También se incluyeron como controles nueve pacientes con meningitis bacteriana, encefalitis por otros virus (herpes, citomegalovirus o Epstein-Barr), encefalomielitis, encefalopatía o crisis convulsivas.

El periodo de estudio fue de abril a septiembre 2007.

Después de ser aceptado el protocolo por el Comité de Ética del hospital, se solicitó a los padres o representantes legales el consentimiento por escrito para ingresar al estudio.

Criterios de inclusión

- Diagnóstico probable o de sospecha de encefalitis viral o meningitis aséptica por:
 - Antecedente de enfermedad previa (diarrea, exantema o síndrome gripal).
 - Síndrome febril.
 - Síndrome de hipertensión intracraneana.
 - Síndrome meníngeo.

- Síndrome de daño neuronal y síndrome encefálico, de los que se contara con estudio citoquímico de LCR con patrón aséptico y biometría hemática con diferencial y predominio de linfocitos.
- Menores de 15 años de edad.
- Pacientes con autorización de los padres o tutores para ingresar al estudio.

Diagnóstico clínico

Basado en historia clínica, exploración física del paciente, análisis citoquímico del LCR, cultivo microbiológico, tinción de Gram, coaglutinación, tomografía computarizada de cráneo y electro-encefalograma.

Procedimiento de toma de muestra

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó punción lumbar para extraer el líquido cefalorraquídeo, el cual se almacenó en condiciones estériles y en congelación hasta su procesamiento.

Descartada alguna contraindicación de punción lumbar en los pacientes, se procedió a la extracción de LCR para la toma de muestras de cultivos para aerobios en medios rutinarios, tinción de Gram (2 mL), coaglutinación (2 mL), citoquímico (2 mL); diez gotas de LCR para la prueba de RT-PCR y 2 mL para carga viral de CMV, VEB, HVS1 y HVS2. Del expediente clínico se recolectó la información acerca de la evolución del padecimiento, manifestaciones clínicas, complicaciones, días de estancia y tratamiento instituido.

Las muestras rutinarias para la identificación microbiológica en LCR se inocularon de inmediato en el laboratorio clínico del hospital. A las 24 h se verificó desarrollo en los medios de cultivo de LCR y el reporte final se capturó después de 72 h. El resultado de la tinción de Gram y coaglutinación de LCR se recabó en 24 h, pero si la muestra se tomó el fin de semana, el resultado se proporcionó en 48-72 h. El resultado oficial de carga viral se entregó en un periodo de 7-10 días hábiles. La muestra de LCR para RT-PCR enteroviral se entregó en la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología en días hábiles y el fin de semana; la muestra se almacenó a -20 °C.

Se recabaron estudios de tomografía computarizada de cráneo y el EEG fue interpretado por el neurólogo participante. La prueba de RT-PCR pan-viral para enterovirus es una prueba validada;²⁰ una vez estandarizada, se procesaron las muestras

en LCR. El resultado de la RT-PCR se entregó al médico tratante y se anotó la fecha en que se recibió. Se eliminaron los casos cuando el cultivo del LCR presentó un microorganismo bacteriano, en casos de alta voluntaria o traslado a otro hospital no perteneciente al IMSS, PCR cuantitativa positiva para otros virus (CMV, VEB, HVS1, HVS2) y cuando la muestra fue insuficiente o con un almacenamiento inadecuado.

Virus

Se utilizó una cepa de referencia como control positivo de Echovirus 30 proporcionada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) para estandarizar la RT-PCR. Se realizó la optimización de todos los parámetros de la PCR como iniciadores, cloruro de magnesio, dNTPS, taq polimerasa, *buffer* y ADN. Esta prueba se realizó con anterioridad en muestras fecales y en exudados faríngeos;²⁰ la aportación del presente estudio fue hacerla en LCR.

Extracción de RNA

El RNA se extrajo con isotiocianato de guanidina y fenol, de acuerdo con el procedimiento descrito por Chomczynski.²³ Las concentraciones de RNA de todos los extractos se determinaron por fotometría. Las muestras se almacenaron a -70 °C.

Iniciadores

Las secuencias de iniciadores (Cuadro 1) se seleccionaron de partes altamente conservadas de la región no codificadora 5' (5'-NCR, por sus siglas en inglés).^{20,24} Los iniciadores consistieron de 20 a 21 bases con 100% de homología con las secuencias conocidas de RNA enteroviral (Cuadro 1). Usando la combinación de iniciadores 2 y 3, el producto amplificado fue de 155 bp y usando la combinación de los iniciadores 1 y 3 el producto obtenido fue de 440 bp.

Cuadro 1. Especificaciones de la secuencia de iniciadores de enterovirus para la PCR.

Iniciador	Secuencia	Localización*
1	5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'	160-180
2	5'-TCCTCCGGCCCTGAATGCG-3'	445-464
3	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	580-599

*Las posiciones se refieren a la secuencia de coxsackievirus B1 de Iizuka, *et al.*²⁴

Trascrición reversa y PCR

Se preparó una mezcla de reacción de 50 μ L. La mezcla de reacción contuvo 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.9), 3.6 mM de $MgCl_2$, 10 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (*Access Quick™ RT-PCR system*), 5 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega™), 5 U de Tfl DNA polimerasa, 20 pmol de cada uno de los iniciadores 1 y 3 (Cuadro 1) y RNA aislado de los sedimentos de las muestras clínicas. Después de la incubación a 37 °C por 60 min, desnaturalización a 94 °C durante 5 min. La amplificación se realizó en 40 ciclos consistiendo de desnaturalización por 1 min a 94 °C, alineamiento de iniciadores por 1 min a 42 °C y extensión por 2 min a 72 °C. En todas las corridas se utilizó un control positivo y uno negativo. Las reacciones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a 2%.

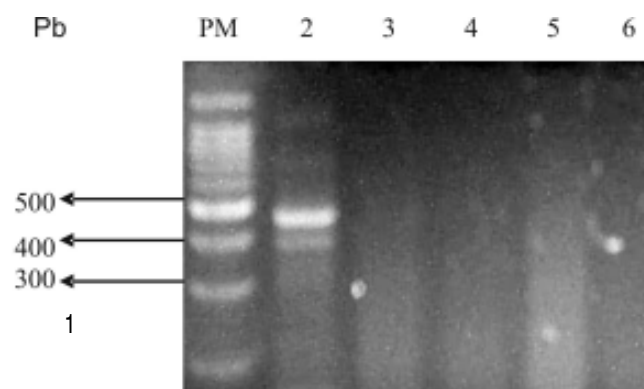


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa a 2%, teñido con bromuro de etidio; 10 μ L en cada carril del producto de PCR obtenido de los DNA's (440pb). (1) Marcador de 100pb, los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda; (2) control positivo, Echovirus 30; (3) control del sistema, se usó agua destilada como templado; (4-6) muestras de LCR de pacientes 1, 2 y 8 con posible infección enteroviral.

PCR semi-anidada

Un segundo set de iniciadores 2 y 3 (Cuadro 1) se utilizó para llevar a cabo la PCR a partir del producto obtenido previamente. Se generó un producto de PCR de 155 bp.

Validación de la RT-PCR

La validación de la prueba ya se había realizado.²⁰ La sensibilidad analítica fue de 0.1 fg de la clona que se utilizó de coxsackievirus tipo B3; que correspondió aproximadamente a diez equivalentes del genoma. La especificidad analítica de la PCR se probó con virus no relacionados como adenovirus tipo 1, virus de paperas, CMV humano; herpes simple tipo 1, 2 y 3; reovirus tipo 3 y virus sincicial respiratorio. Ninguno de estos virus reaccionó en la PCR. Durante la validación se utilizaron para su detección, poliovirus tipos 1 a 3, coxsackievirus tipos A1 a A24, coxsackievirus tipos B1 a B6, Echovirus tipos 1 a 33 (descartando 22 y 23 que actualmente pertenecen al género parechovirus tipos 1 y 2) y enterovirus numerados del 1 al 71. Se obtuvo un producto de amplificación de 155 pb de todos los serotipos probados, excepto cuatro que no se detectaron con esta combinación de iniciadores: Echovirus tipo 16, coxsackievirus tipos A11, A17 y A24. Las reacciones se analizaron por hibridación en dot spot o Southern blot.

RESULTADOS

Se identificaron diez pacientes que cumplieron con los diagnósticos de inclusión.

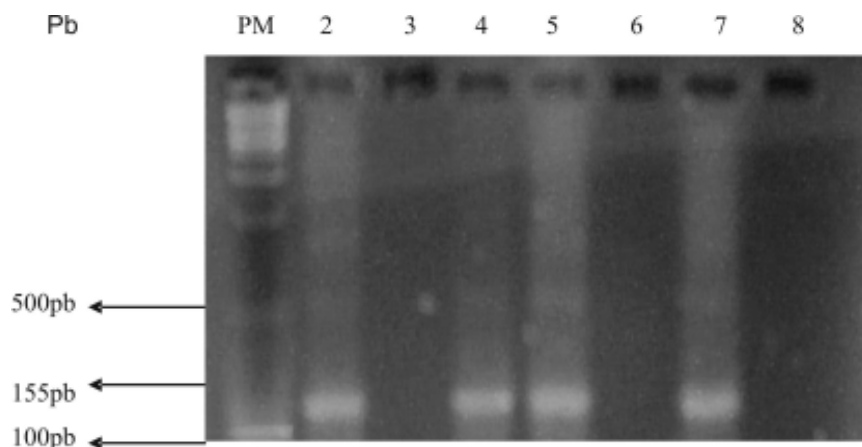


Figura 2. Electroforesis de la PCR semianidada. (1) Marcador de 100pb; (2) Echovirus 30 (155pb); (3) control negativo; (4, 5 y 7) LCR de pacientes 1, 2 y 8 (positivos); (6 y 8) LCR de pacientes control (negativos).

Ensayos de PCR

Luego de estandarizar las condiciones de la reacción se encontró que en el control positivo se amplificó la banda inicial esperada de 440 pb, mientras que en el control negativo y en las muestras de LCR de los pacientes 1, 2 y 8 con sospecha de infección enteroviral, no se observó banda de amplificación (Figura 1). Con la finalidad de aumentar la sensibilidad, se realizó una segunda PCR semianidada a partir del amplificado inicial, obteniéndose un producto de 155 pb demostrado en los LCR's de los pacientes 1, 2 y 8, confirmando así la positividad (Figura 2).

El 80% de las muestras fueron RT-PCR positivas para enterovirus. Entre los pacientes con prueba positiva, 6/10 fueron del género masculino, la media de edad se ubicó en 7 ± 3 , con un rango de 3 a 13 años.

Entre las principales manifestaciones clínicas nueve presentaron crisis epilépticas, seguidas de fiebre $\geq 38^\circ\text{C}$ y manifestaciones neurológicas en siete. El síndrome encefálico se caracterizó por alteraciones en el comportamiento, alucinaciones y alteraciones en el estado de conciencia. En la totalidad de los pacientes se realizó tomografía computada de cráneo, tres presentaron hallazgos anormales. El 90% de pacientes manifestó crisis convulsivas, en 50% el patrón fue de crisis focales. Sólo en un paciente se detectó correlación entre los hallazgos de la tomografía de cráneo y el electroencefalograma (Cuadro 2). Presentaciones menos comunes fueron crisis epiléptica aislada y síndrome cerebeloso en 10%. Antecedente de infección previa se encontró en cinco casos, cuatro habían padecido infección de vías respiratorias superiores y 10% de gastroenteritis aguda.

Cuadro 2. Manifestaciones clínicas y hallazgos de los estudios de gabinete.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fiebre $> 38^\circ\text{C}$	No	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Alteración del estado de conciencia	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
Cambios en el comportamiento	Sí	No	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	No
Alucinaciones	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No	No	No
Crisis convulsivas										
Focales					Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Generalizadas	Sí	Sí	Sí	Sí			No			
Déficit neurológico	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Tomografía computada	Normal	Trombosis seno-venoso	Normal	Infartos múltiples bilaterales	Normal	Normal	Imagen hipodensa [†]	Normal	Normal	Normal
Electroencefalograma	NR*	NR*	NR*	NR*	NR*	Paroxismos polipuntas [‡]	Paroxismos polipuntas [§]	NR*	NR*	NR*

* NR: No reportado. [†] En pedúnculo cerebeloso. [‡] Complejas p-0 1.5 Hz. [§] En hemisferio izquierdo, en región frontotemporal y occipital.

Cuadro 3. Características del líquido cefalorraquídeo inicial de los pacientes.

Paciente	Edad (años)	Aspecto	Células (mm ³)	Proteínas (mg/dL)	Glucosa (mg/dL)	Eritrocitos (mm ³)	DHL (mg/dL)
1	7	Turbio	5	NR*	50	3+	47
2	5	Agua roca	2	15	75	0	NR*
3	6	Transparente	3	38	60	0	NR*
4	3	Transparente	4	30	90	0	NR*
5	8	Transparente	3	46	70	0	NR*
6	4	Agua roca	10	46	104	0	47
7	13	Transparente	4	35.1	73	0	25
8	9	Transparente	13	0.1	46	0	18
9	11	Transparente	7	34	75	0	35
10	7	Transparente	7	40	65	0	25

* NR: No reportado.

Cuadro 4. Resultados de la RT-PCR comparados con el panel viral de otros virus causantes de infección en el SNC.

Pacientes	Diagnóstico	Herpes 1 y 2	CMV	Epstein-Barr	RT- PCR/EV
1	Encefalitis	Negativo	ND**	Negativo	Positiva
2	Encefalitis	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
3	Encefalitis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativa
4	Encefalitis	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
5	Encefalitis	Negativo	NR*	NR*	Positiva
6	Neuroinfección	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
7	Encefalitis	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
8	Encefalitis	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
9	Meningitis subaguda	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva
10	Meningoencefalitis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativa

* NR: No reportado. ** ND: No detectable.

El citoquímico de LCR fue anormal en 60% (Cuadro 3). Todos los casos con RT-PCR positiva para enterovirus tuvieron cultivos bacterianos sin desarrollo, coagulación y tinción de Gram negativos; el número de copias de PCR cuantitativa de citomegalovirus (< 600 copias/ μ L) y Epstein Barr (< 125 copias/ μ L) fueron negativas para enfermedad al igual que los resultados de herpes simple 1 y 2 por PCR cualitativo. Los nueve pacientes con enfermedades diferentes del SNC presentaron la RT-PCR panviral negativa. Ante la imposibilidad de contar con el aislamiento viral, el diagnóstico clínico se consideró como el estándar de oro, el cual fue analizado por médicos especialistas en Neurología e Infectología, basándose principalmente en el que ellos consideran un patrón aséptico, como la presencia de mononucleares, proteínas de 50 a 200 mg/dL, glucosa mayor a un tercio de la sérica y LCR con aspecto de agua de roca (Cuadro 4). Los valores predictivos positivo y negativo para la RT-PCR fueron de 100 y 81%, respectivamente.

La estancia hospitalaria se colocó entre cuatro a 49 días, promedio 19 ± 12 , la estancia se prolongó en 3/10 pacientes por complicaciones agudas. Las complicaciones en el primer paciente fueron hipertensión endocraneana, infartos cerebrales y paro cardiorrespiratorio. El segundo caso ingresó con deterioro neurológico, hemiparesia fasciocorporal derecha, se sumó neumonía nosocomial y egresó con afasia. El último paciente cursó con sepsis e hipertensión endocraneana. Ninguno de los pacientes con RT-PCR positivos para enterovirus falleció.

DISCUSIÓN

El beneficio del estudio podría ser una posible limitación del uso innecesario de antibióticos; además, el

RNA enteroviral (con los iniciadores seleccionados en este estudio) nunca se había detectado en LCR.

Aunque la muestra estudiada fue pequeña, la etiología por enterovirus coincide con la reportada en la literatura mundial que se ubica de 26 a 80%.²⁵⁻²⁷

En la mitad de los pacientes estudiados el antecedente de infección aguda reciente de vías respiratorias altas o de gastroenteritis aguda estuvo presente, lo que sugiere que los enterovirus pueden tener un papel importante en la infección respiratoria aguda de la infancia.²⁸ Los preescolares y escolares del género masculino fueron los más afectados; llama la atención que ningún caso de meningitis o encefalitis fue identificado en el grupo de lactantes, comportamiento que coincide con las publicaciones de meningoencefalitis por enterovirus.²⁹⁻³¹

Las manifestaciones clínicas dominantes fueron crisis convulsivas, déficit neurológico y fiebre. En la mayoría de los casos se sustentó el síndrome encefálico. Crisis convulsivas y fiebre fueron características constantes. No se detectó un patrón predominante de crisis convulsivas. La afasia fue el principal signo de déficit neurológico al ingreso. En contraste con la literatura, la fiebre fue un signo común.^{30,32}

Las infecciones por enterovirus se diagnostican por aislamiento viral seguido por serotipificación con un panel de antisueros neutralizantes. Sin embargo, este procedimiento es laborioso y desafortunadamente no se realiza de rutina en México. En cuanto a diagnóstico molecular, se han desarrollado los ensayos de hibridación dot spot e hibridación *in situ* para detectar el genoma enteroviral.³³ No obstante, estos métodos carecen de sensibilidad.

A diferencia de otros, el ensayo de PCR utilizado en este estudio puede detectar un rango amplio de enterovirus. Se detectaron 8/10 de los casos con

diagnóstico clínico de infección del SNC viral, mediante RT-PCR panviral. Los valores predictivos positivo y negativo para la RT-PCR fueron de 100 y 81%, respectivamente.

En el presente estudio, a pesar de contar con una muestra pequeña, se sugiere que los enterovirus se encuentran entre las principales etiologías de encefalitis pediátrica y la RT-PCR podría ser particularmente útil para su detección rápida. Ya que las técnicas virológicas convencionales para la detección de virus en SNC no están disponibles en todas las Unidades de Atención Médica, la PCR será una poderosa herramienta diagnóstica. Desafortunadamente, la prueba utilizada en el presente estudio tiene la limitante de que es panviral y no permite identificar cuál es el enterovirus implicado.

El diagnóstico viral molecular rápido de una enfermedad benigna que no requiere de tratamiento, pero que de inicio es preocupante, representa una ventaja indiscutible. Es benéfico tanto para el paciente como para la comunidad por su impacto en la economía de la salud, el consumo innecesario de fármacos, dando como resultado, la resistencia a los antibióticos.

Los resultados de la presente investigación sirvieron para ampliar el número de casos y determinar la prevalencia de enterovirus en el sistema nervioso central a través del diagnóstico molecular.

REFERENCIAS

1. Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, King AMQ, et al. Family Picornaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, U Desselberger, Ball LA (ed.). *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, England: Elsevier/Academic Press; 2005, p. 757-78.
2. Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid region. *J Virol* 2003; 77: 8973-84.
3. Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, ECHO viruses and newer enteroviruses. In: Fields BN (ed.). *Virology*. New York: Raven Press; 1990, p. 549-605.
4. Lukashev AN, Ivanova OE, Khudiakova LV. Social and economic significance of enterovirus infection and its role in etiologic structure of infectious diseases in the world. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2010; 5: 113-20.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance-United States, 2006-2008. *MMWR* 2010; 59(48): 1577-80.
6. Modlin JF. Enterovirus infection in infants and children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1999; 12: 155-8.
7. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-81.
8. Coria-Lorenzo JJ, Juárez-Escobar M, Velasco-Alvarez VH. Meningoencefalitis viral. Enfoque clínico. *Rev Mex Ped* 2001; 68: 252.
9. Lamarão LM, Gomes M de L, Ferreira LL, Fonseca CM, Araújo LC, Santan MB, et al. Investigation of enterovirus in case of aseptic meningitis syndrome of Belem. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 391-5.
10. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, et al. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 999-e57.
11. Lin M, Chan Y, Chen C, Tang R, Wu K. Epidemiology and diagnostic methodology for enterovirus infection, including cerebrospinal fluid analysis: a 5-year review. *J Microbiol Infect* 2009; 41(6): 450-5.
12. Leitch E, Harvala H, Robertson I, Ubbilos I, Templeton K, Simmonds P. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *J Clin Virol* 2009; 44(2): 119-24.
13. Hong J, Kang B, Kim A, Hwang S, Lee S, Kim J, et al. Enhanced detection of enteroviruses in clinical samples by reverse transcription-PCR using complementary locked primer technology. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 615-6 [Doi:10.1128/JCM.01790-09].
14. Pozzetto B, Andreoletti L, Beguier E, Bourlet T, Dussaix E, Grangeot-Keros L, et al. Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3002-6.
15. Young PP, Buller RS, Storch GA. Evaluation of a commercial DNA enzyme immunoassay for detection of enterovirus reverse transcription-PCR products amplified from cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 39: 4260-1.
16. Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C, Mirand A, Chambon M, Regagnon C, Laurichesse H, et al. From prospective molecular diagnosis of enterovirus meningitis to prevention of antibiotic resistance. *Med Mal Infect* 2006; 36: 124-31.
17. Read SJ, Jeffery KJM, Bangham CRM. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 691-6.
18. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis using PCR with a microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2590-2.
19. Vuorinen T, Vanionpää R, Hyypia T. Five years' experience of reverse-transcriptase polymerase chain reaction in daily diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 452-5.
20. Zoll GJ, Melchers WJF, Kopecka H, Jambroes G, Van der Piel HJA, Galama JMD. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enterovirus: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 160-5.
21. Lee BE, Davies HD. Aseptic meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20(3): 272-7.
22. Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, Petit I, Henquell C, Mirand A, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009; 81(1): 42-8.
23. Chomczynski P, Hulley SB, Cummings SR. *Designing Clinical Research: an epidemiological approach*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins; 1998, p. 325-32.
24. Iizuka N, Kuge S, Nomoto A. Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackie B1. *Virology* 1987; 156: 64-73.
25. Narkeviciute I, Vaiciuniene D. Outbreak of echovirus 13 infection among Lithuanian children. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(11): 1023-5.
26. Silverman R. The Pleconaril Pediatric Meningitis Study Group: frequency of enteroviral meningitis among children presenting to the emergency department with viral/aseptic meningitis by using a PCR assay. *Pediatrics* 1999; 34(4, Part 2) Suppl.: S9-S10.

27. Davis L, Tyler K. Molecular diagnosis of CNS viral infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76(1): 10.
28. Fu J, Yuan Y, Sun L, Cui X. Relation between acute respiratory infection and enterovirus in children in Beijing area. *Zhong-hua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2007; 21(4): 316-8.
29. Chokephaibulkit K, Kankirawatana P, Apintanapong S, Pongthapisit V, Yoksan S, Kositanont U, et al. Viral etiologies of encephalitis in Thai children. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(2): 216-8.
30. Brown D, Irish G, Robinson R, Swan A, Banatvala J, Howard R, et al. Diagnosis and outcomes of enterovirus infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 546-50.
31. Fowler A, Stödborg T, Eriksson M, Wickström R. Childhood encephalitis in Sweden: etiology, clinical presentation and outcome. *Eur J Paediatr Neurol* 2008; 12(6): 484-90.
32. Sarmiento L, Mas P, Goyenechea A, Palomera R, Morier L, Capó V, et al. First epidemic of echovirus 16 meningitis in Cuba. *Emerging Infectious Dis* 2001; 7: 887-9.
33. Petitjean J, Quibriac F, Freymuth F, Fuchs N, Laconche N, Ay-mard M, et al. Specific detection of enteroviruses in clinical

samples by molecular hybridization using poliovirus subgeno-mic riboprobes. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 307-11.

Reimpresos:

Dr. en C. Guadalupe García-Elorriaga

Unidad de Investigación en
Inmunología e Infectología
Centro Médico Nacional La Raza, IMSS.
Av. Jacarandas y Seris, s/n
Col. La Raza
02990, México, D.F.
Tel.: (+52) (55) 5724-5900, Ext. 24321
Fax: (+52) (55) 5353-0989
Correo electrónico: gelorriaga@webtelmex.net.mx

Recibido el 18 de febrero 2011.

Aceptado el 17 de junio 2011.