



ORIGINAL

Evaluación de una técnica de diagnóstico molecular Xpert EV (Cepheid®) en la meningitis por enterovirus



Natalia Alonso Pérez^{a,*}, Belén Sagastizabal Cardelus^a, Luis Manuel Prieto Tato^a, Sara Guillén Martín^{a,b}, Ana González Torralba^c, Isabel García Bermejo^c y José Tomás Ramos Amador^a

^a Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, España

^b Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, España

Recibido el 25 de mayo de 2016; aceptado el 26 de septiembre de 2016

Disponble en Internet el 3 de diciembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Meningitis aséptica;
Enterovirus;
Reacción en cadena
de la polimerasa

Resumen

Introducción: Las técnicas de biología molecular han demostrado ser útiles en la detección del enterovirus en niños con meningitis aséptica. El objetivo de nuestro estudio fue analizar cambios en la práctica clínica tras la introducción de una técnica de RT-PCR a tiempo real, ensayo Xpert EV (Cepheid®), para la detección de enterovirus en muestras de líquido cefalorraquídeo de niños con sospecha de meningitis vírica.

Métodos: Estudio retrospectivo de los niños mayores de 1 año diagnosticados de meningitis por enterovirus en un hospital de tercer nivel desde noviembre de 2006 a febrero de 2013. Se comparó el periodo previo a la introducción del ensayo Xpert EV (Cepheid®) (grupo 1: noviembre 2006-agosto de 2010) con el periodo posterior (grupo 2: septiembre 2010-febrero 2013). Se compararon las características clínicas, los tiempos de estancia media y los costes por hospitalización.

Resultados: Se incluyeron 41 pacientes con una mediana de edad de 64 meses (rango intercuartílico, 28-96). En el grupo 2 se incluyeron 26 pacientes (63,4%). No hubo diferencias epidemiológicas, de gravedad, ni de laboratorio estadísticamente significativas entre los pacientes valorados en ambos grupos. Se observó una disminución significativa en la duración de estancia media hospitalaria en el grupo 2 (48 h vs 40,5 h, $p=0,039$) y una disminución significativa en el gasto por paciente hospitalizado (779,77 € vs. 656,05 €, $p<0,05$).

Conclusiones: La incorporación de la técnica Xpert EV (Cepheid®) permitió disminuir la estancia y el gasto asociado a hospitalización en niños con meningitis por enterovirus.

© 2016 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: natalia.alonso.perez@gmail.com (N. Alonso Pérez).

KEYWORDS

Aseptic meningitis;
Enterovirus;
Polymerase chain
reaction

Evaluation of an Xpert EV (Cepheid®) molecular diagnostic technique for enteroviral meningitis**Abstract**

Introduction: Polymerase chain reaction (PCR) assays have shown to be useful and quick for the diagnosis of enterovirus in aseptic meningitis. The aim of our study was to analyse the changes in clinical practice after the introduction of a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique using the Xpert EV (Cepheid®) assay for the qualitative detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens from children with suspected viral meningitis.

Methods: A retrospective study was performed in children older than 1 year, diagnosed with enterovirus meningitis in a third level hospital from November 2006 to February 2013. The first period, before the availability of Xpert EV (Cepheid®) (Group 1, November 2006-August 2010) was compared with the later period (Group 2, September 2010-February 2013). Clinical characteristics, the mean length of stay, and the cost per inpatient cases, were compared between the 2 periods.

Results: Forty-one patients (60.9% male) were included, with a median age of 64 months (interquartile range 28-96). Twenty-six patients (63.4%) were included in Group 2. There were non-statistically significant differences in the epidemiological, disease severity, and laboratory characteristics between both periods of study. A significant difference was observed in the mean length of stay, with it being shorter in Group 2 (48 hours vs 40.5 hours, $P = .039$), and a significant lower inpatient cost per case (€779.77 vs €656.05, $P < .05$).

Conclusion: Xpert EV (Cepheid®) assay was useful for decreasing the length of hospital stay and the costs associated with hospitalisation in children with enterovirus meningitis.

© 2016 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Los enterovirus son la causa más frecuente de meningitis asépticas en la infancia¹. Las meningitis producidas por este virus suelen ser de curso benigno y requieren habitualmente solo tratamiento sintomático. Sin embargo, la dificultad de diferenciarlas de una meningitis bacteriana en la valoración inicial puede conllevar la administración innecesaria de antibióticos, el ingreso hospitalario y un aumento de la estancia en el hospital²⁻⁴. Actualmente las técnicas de biología molecular para la detección de enterovirus en el líquido cefalorraquídeo (LCR) han demostrado una alta sensibilidad y especificidad y, debido a la rapidez de los resultados, están desplazando al cultivo viral^{5,6}, más lento y condicionado a la viabilidad de los virus en la muestra clínica. En este sentido, existen métodos totalmente automatizados, como es el ensayo Xpert EV (Cepheid®), que emplea el sistema GeneXpert® Dx.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar los cambios en la práctica clínica tras la introducción de esta técnica para el estudio de enterovirus en LCR en niños con sospecha de meningitis vírica.

Métodos

Estudio descriptivo retrospectivo de los niños mayores de 1 año y menores de 15 años, previamente sanos, diagnosticados de meningitis por enterovirus en el Hospital Universitario de Getafe desde noviembre de 2006 a febrero 2013. Se

recogieron los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio de las historias clínicas de los pacientes con resultado positivo para enterovirus, así como del tiempo de hospitalización y de la administración de antibioterapia. Se aplicó el score de Boyer modificado basado en los parámetros clínicos y analíticos a cada paciente, tal y como previamente ha sido descrito⁸.

Desde septiembre de 2010 el diagnóstico de meningitis por enterovirus se basó en un resultado positivo de la técnica Xpert EV (Cepheid®). A partir de esa fecha esta técnica estuvo disponible en nuestro Servicio de Microbiología. Previamente el diagnóstico se realizaba por técnicas moleculares convencionales remitiendo la muestra a un laboratorio de referencia con un tiempo medio de respuesta entre 7 y 10 días.

La técnica Xpert EV (Cepheid®) se utilizó según las indicaciones del fabricante y estaba disponible en horario de 8:00 a 20:00 h todos los días, salvo los domingos, cuyo horario de petición era entre las 8:00 a.m. y las 13:00 p.m.

La muestra de LCR es guardada a 4 °C en nevera hasta su procesamiento y posteriormente es conservada a -20 °C. Los resultados eran comunicados inmediatamente a los pediatras.

Xpert EV (Cepheid®) emplea el sistema GeneXpert® Dx: en un mismo cartucho de reacción se integra la preparación de la muestra, la extracción del ARN viral, la transcripción reversa (RT) y la amplificación de ácidos nucleicos, así como la detección de la secuencia diana por PCR en tiempo real. Este método simplifica el diagnóstico microbiológico y permite obtener resultados de forma rápida y fiable en 2,5 h.

Tabla 1 Características clínicas y hallazgos de laboratorio de los niños diagnosticados de meningitis por enterovirus en los dos periodos

	Primer periodo (grupo control) (n = 15)	Segundo periodo (grupo RT-PCR enterovirus) (n = 26)	p
Características clínicas			
Edad (meses), mediana (RIQ)	63 (28-96)	65 (28-96)	ns
Sexo varón, n (%)	10 (66,6)	15 (57,7)	ns
Fiebre > 38°C, n (%)	11 (73,3)	18 (69,2)	ns
Cefalea, n (%)	13 (86,6)	24 (92,3)	ns
Vómitos, n (%)	14 (93,3)	22 (84,6)	ns
Dolor abdominal, n (%)	1 (6,6)	6 (23,1)	ns
Diarrea, n (%)	1 (6,6)	1 (3,8)	ns
Rigidez de nuca, n (%)	15 (100)	19 (73,1)	< 0,01
Signos meníngeos, n (%)	13 (86,6)	16 (61,5)	0,03
Síndromes pospunción, n (%)	7 (46,6%)	6 (23)	ns
Score de Boyer modificado ≥ 3 , n (0%)	0 (0%)	2 (7,6%)	ns
Hallazgos de laboratorio			
<i>Hemograma y bioquímica en sangre</i>			
Leucocitos (células/mm ³), mediana (RIQ)	12.700 (8.200-20.300)	11.500 (5.240-21.200)	ns
Hb (g/dl), mediana (RIQ)	12,9 (11,6-14,1)	12,8 (12-15)	ns
PCR (mg/l), mediana (RIQ)	14,5 (0,5-53,8)	17,5 (1-136,2)	ns
PCT (ng/ml), mediana (RIQ)	0,1 (0-0,5) (n = 6)	0,2 (0-6,1) (n = 14)	ns
<i>Bioquímica de LCR</i>			
Leucocitos en LCR/mm ³ , mediana (RIQ)	95 (10-415)	63,5 (7-672)	ns
Polimorfonucleares en LCR %, mediana (RIQ)	49 (10-97)	68,5 (7-95)	ns
Glucosa en LCR (mg/dl), mediana (RIQ)	63 (49-79)	58 (43-77)	ns
Proteínas en LCR (mg/dl), mediana (RIQ)	29 (17-74)	35 (14-87)	ns

LCR: líquido cefalorraquídeo; ns: no significativo; RIQ: rango intercuartílico.

RT-PCR enterovirus, reacción en cadena a la polimerasa a tiempo real (Xpert EV de Cepheid®).

Se comparó el periodo previo a la introducción de la técnica Xpert EV de Cepheid® grupo 1 (noviembre 2006 a agosto 2010) con el posterior, grupo 2 (septiembre 2010 a febrero 2013).

Se calculó el gasto generado por paciente en base a los costes de la estancia media de hospitalización en la planta del Servicio de Pediatría (337,55 €/día) en los 2 periodos, y en el segundo periodo se añadió el coste que suponía la determinación de enterovirus en LCR por la técnica Xpert EV (Cepheid®) (80 €/muestra).

Las variables cuantitativas fueron expresadas en medianas y rangos y comparadas mediante el test de U de Mann Whitney. Las variables cualitativas fueron expresadas en porcentajes y comparadas mediante el test de Fisher. Los resultados con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS 20.0.

Resultados

Durante el periodo de estudio se incluyeron 41 pacientes (60,9% varones) con una mediana de edad de 64 meses (rango intercuartílico, 28-96 meses). Veintiséis pacientes (63,4%) fueron incluidos en el segundo periodo. Veinticinco pacientes (60,9%) fueron diagnosticados entre los meses de abril a

julio. La clínica de presentación más frecuente fue: cefalea (89,45%), vómitos (88,95%) y fiebre (71,25%).

No se encontraron diferencias epidemiológicas, clínicas ni de laboratorio estadísticamente significativas entre los pacientes valorados en el primer periodo respecto a los del segundo, salvo que los pacientes diagnosticados en el segundo periodo presentaban con menos frecuencia rigidez de nuca y/o signos meníngeos en la valoración inicial (tabla 1). Además, cuando los pacientes eran analizados según el score de Boyer modificado no observamos diferencias entre los grupos (score ≥ 3 : 0% en el periodo 1 vs 7.6% en el periodo 2, $p > 0,05$). No se obtuvo ningún crecimiento bacteriano en los cultivos de LCR.

En el análisis comparativo de ambos grupos se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en la mediana de horas de estancia hospitalaria de los pacientes (48 h en el grupo 1 vs 40,5 h en el grupo 2, $p = 0,039$).

Solo 2 pacientes (13,3%) en el primer periodo y 2 pacientes (7,6%) en el segundo periodo recibieron antibioterapia de amplio espectro. Se observa una tendencia a menor uso de antibióticos en el segundo periodo sin alcanzar la significación estadística (4,7 días vs 1 día).

Asociado al tiempo de estancia hospitalaria, se observa una disminución significativa en el gasto por paciente hospitalizado: 779,77 € (98,35-1.362,85) vs 656,05 € (0-1.489,93) ($p < 0,05$).

Discusión

En nuestro estudio, la implementación del ensayo Xpert EV de Cepheid® se asoció significativamente a una disminución del tiempo de estancia hospitalaria y de los costes sanitarios asociados.

En los últimos años son numerosos los estudios que reconocen el valor de la aplicación de las técnicas de PCR para el diagnóstico de meningitis por enterovirus. Aunque ya en los años noventa aparecen las primeras publicaciones, es en el año 2000 cuando 2 estudios americanos evalúan directamente su utilización y observan una reducción en el tiempo de estancia hospitalaria, en el uso de antibióticos y en el coste sanitario tras la introducción de estas técnicas^{3,9}.

En los últimos años la disponibilidad y el mayor acceso a técnicas rápidas —en algunos casos automatizadas— de RT-PCR han permitido un uso más generalizado. Los datos publicados en Europa y en Estados Unidos muestran este beneficio en disminución de tiempo de estancia hospitalaria y costes^{7,10-13}.

En España, 2 publicaciones recientes han evaluado estas técnicas de RT-PCR (Cepheid® Xpert EV), con muy buenos resultados^{14,15}. En el estudio de Menasalvas et al.¹⁴ hasta el 25% de los pacientes fueron dados de alta desde urgencias, tras un resultado positivo, y la mediana de estancia hospitalaria fue de 3,5 días (4,5 días en neonatos versus 2,3 días en niños mayores de 2 años). Sin embargo, este estudio no se evaluó el impacto de la introducción de la técnica con un grupo control. En el estudio de Carrasco et al.¹⁵, donde se comparan 37 niños con meningitis aséptica seleccionados prospectivamente tras la introducción de Cepheid® Xpert EV con datos históricos de 29 niños diagnosticados de meningitis aséptica, se observó que la introducción de esta técnica se asoció con una disminución significativa en el uso de antibióticos y tiempo de administración, pero esta diferencia no fue significativa para el tiempo de ingreso.

El estudio del gasto sanitario que presentamos es un estudio de gasto directo, asociado al tiempo de ingreso. Una limitación del estudio es que no se ha realizado un análisis económico detallado, y los resultados obtenidos se basan en la consideración de unos costes medios por hospitalización mantenidos a lo largo del tiempo. Este tipo de análisis, aunque muy sencillos, habían sido empleados previamente por otros autores^{10,16}. Este análisis puede no representar de forma adecuada el ahorro real asociado al uso de estas técnicas, aunque sí refleja la reducción de coste asociada a la hospitalización, que probablemente sea de mayor importancia en el caso de las meningitis asépticas. Previamente, en otros países ya se había señalado el posible ahorro en tiempo de ingreso y también económico asociado al uso de estas técnicas, con estudios de gastos similares^{10,15,17}.

El tiempo de estancia hospitalaria de estos pacientes se ha relacionado con el tiempo que se tarda en emitir un resultado positivo de la técnica¹⁸. Una limitación de nuestro estudio es que la técnica no está disponible de forma continuada, por lo que durante las noches, y los fines de semana, la estancia hospitalaria de los pacientes puede alargarse hasta que se obtenga el resultado. Otra posible limitación de nuestro estudio es que, aunque a priori no existe un procedimiento de actuación diferente a la hora de dar el alta hospitalaria entre el personal sanitario del servicio de pediatría, podría existir en algunos casos una disparidad de

criterios que haga que este factor sí haya podido influir parcialmente en los resultados obtenidos. Aun así hemos podido observar un beneficio de la técnica, incluso en estas circunstancias.

Nuestro estudio tiene otras limitaciones observadas en los estudios retrospectivos. Los datos que hacen referencia a la estancia hospitalaria son codificados electrónicamente a la entrada y salida del paciente, por lo que el tiempo de estancia hospitalaria del paciente, aun siendo recogido de forma retrospectiva, creemos que representa un dato fiable.

Como conclusión, la incorporación del ensayo Xpert EV de Cepheid® ha permitido disminuir la estancia hospitalaria y el gasto asociado a esta estancia de forma significativa en niños con meningitis por enterovirus en nuestro medio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Lee BE, Davies HD. Aseptic meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20:272-7.
2. Kulik DM, Uleryk EM, Maguire JL. Does this child have bacterial meningitis? A systematic review of clinical prediction rules for children with suspected bacterial meningitis. *J Emerg Med.* 2013;45:508-19.
3. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA.* 2000;283:2680-5.
4. Robinson CC, Willis M, Meagher A, Giesecker KE, Rotbart H, Glodé MP. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21:283-6.
5. Schlesinger Y, Sawyer MH, Storch GA. Enteroviral meningitis in infancy: Potential role for polymerase chain reaction in patient management. *Pediatrics.* 1994;94:157-62.
6. Romero JR, Kimberlin DW. Molecular diagnosis of viral infections of the central nervous system. *Clin Lab Med.* 2003;23:843-65.
7. Ninove L, Nougairède A, Gazin C, Zandotti C, Drancourt M, de Lamballerie X, et al. Comparative detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: GeneXpert system vs. real-time RT-PCR assay. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1890-4.
8. Ramos Lizana J, Vázquez López M, de Cea Crespo JM, Zanotta Alfieri R, González Vergaz A, Carrasco Marina LL, et al. Score para el diagnóstico diferencial entre meningitis bacteriana y viral. *An Esp Pediatr.* 1996;44:35-9.
9. Nigrovic LE, Chiang VW. Cost analysis of enteroviral polymerase chain reaction in infants with fever and cerebrospinal fluid pleocytosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000;154:817-21.
10. Huizing KM, Swanink CM, Landstra AM, van Zweet AA, van Setten PA. Rapid enterovirus molecular testing in cerebrospinal fluid reduces length of hospitalization and duration of antibiotic therapy in children with aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:1107-9.
11. Michos AG, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, Daikos GL, Lagona E, Douridas P, et al. Aseptic meningitis in children: Analysis of 506 cases. *PLoS One.* 2007;2:e674.
12. 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;81:42-8.
13. Nolte FS, Rogers BB, Tang YW, Berste MS, Robinson CC, Kehl KS, et al. Evaluation of a rapid and completely automated

- real-time reverse transcriptase PCR assay for diagnosis of enteroviral meningitis. *J Clin Microbiol*. 2011;49:528–33.
14. Menasalvas Ruiz AI, Salvador García C, Moreno Docón A, Alfayete Miguélez S, Pérez Cánovas C, Sánchez Solís ML. Enterovirus reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in cerebrospinal fluid: An essential tool in meningitis management in childhood. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:71–7.
 15. Carrasco Fernández JR, Gómez-Pastrana D, Alados Arboledas JC, Aragón Fernández C, Ortiz Tardío J. Impact of introducing an enterovirus polymerase chain reaction in the management of aseptic meningitis. *An Pediatr (Barc)*. 2015;82:e26–9.
 16. Florén-Zabala L, Chamizo-López FJ, Eisman-Maraver A, Pérez-González C, de Ory-Marchón F, Trallero-Maso G, et al. Aseptic meningitis in an adult population. Etiology and utility of molecular techniques in the clinical management of patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:361–6.
 17. Robinson C, Willis M, Meagher A, Gieseker K, Rotbart H, Glodé MP. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:283–6.
 18. Stellrecht KA, Harding I, Woron AM, Lepw ML, Venezia RA. The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. *J Clin Virol*. 2002;25:19–26.