

Clinical and economic importance of applying the guidelines for the diagnosis of viral encephalitis

Maddalena Perotti, Franco Belmondo Bianchi, Oliviero E. Varnier

UO Microbiologia Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino e Sez. di Microbiologia dell'Università, Genova

Key words: encephalitis, diagnosis, guidelines, neurotropic virus

Importanza clinica ed economica dell'applicazione delle linee guida per la diagnosi liquorale delle encefaliti virali

SUMMARY

Viral encephalitis are diseases with complex diagnostic problems, because symptoms are similar to those of flu syndrome and they will resolve in about a week. Brain involvement and prognosis depend on pathogen and patient immunity.

In 2008, the American Society of Infectious Diseases has approved guidelines to guide clinician to an appropriate diagnostic evaluation: clinician should ask specific tests, without resorting to a general request (eg. neurotropic viruses), reducing time and costs of etiologic diagnosis. The guidelines set out methods and the proper timing to execute tests for each virus, indicating when to integrate molecular research with antibody research to avoid false negative results, and how to interpret results.

During the period September 2007 - August 2009, microbiology laboratory of San Martino hospital in Genoa has analyzed 300 cerebrospinalis liquor from Liguria with a clinical diagnosis of suspected viral encephalitis. The search for viruses HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, Adenovirus, Enterovirus and JCV was performed by real time PCR.

Only 51 liquor were positive (16 HSV1, 5 HSV2, 4 VZV, 17 EBV, 2 CMV, 2 HHV6, 1 Adenovirus, 4 Enterovirus and 4 JCV with 4 coinfection). This study confirms that the percentage of encephalitis with a recognized etiologic agent remains very low, despite the increase in positivity in the last two years. This confirms the importance of applying the guidelines to improve the diagnosis of viral encephalitis.

L'encefalite virale è una malattia infiammatoria diffusa del cervello dovuta ad un'invasione virale diretta oppure ad un processo di ipersensibilità nei confronti di un virus (16). L'encefalite colpisce l'encefalo in maniera diffusa; quando coinvolge le meningi si ha il quadro di meningo-encefalite, quando coinvolge il midollo si parla di encefalo-mielite.

L'encefalite può essere primitiva o costituire la complicanza secondaria di un'infezione virale (14). Si suddividono, inoltre, le encefaliti in virali acute, se si manifestano entro breve tempo dall'infezione, e in encefaliti da virus lenti, se si manifestano dopo mesi o anni dall'infezione e hanno sviluppo progressivo. Nei soggetti immunocompetenti la presenza di una bassa carica virale nel sangue non è in genere sufficiente a indurre un'infezione cerebrale (7). Il controllo dell'infezione è dovuto sia alla risposta immunitaria, sia alla presenza della barriera emato-encefalica. Se il virus riesce a superare quest'ultima, il danno cerebrale è inevitabile.

Il quadro clinico è caratterizzato da un primo periodo con sintomi di tipo influenzale, seguito da un breve periodo di regressione dei sintomi e da una seconda fase con segni neurologici, dovuta alla localizzazione del virus nel sistema nervoso centrale: segni meningei (febbre, cefalea, vomito, spassatezza e rigidità del collo e del dorso), con compromissione cerebrale (alterazione della coscienza, alterazioni della personalità, crisi comiziali e paresi) e deficit dei nervi cranici. Nella fase acuta della malattia si verificano spesso disturbi della vista, compromissione dell'udito, paralisi facciali; conseguenze permanenti dell'encefalite possono essere cecità, sordità, epilessia e demenza (10).

Le famiglie di virus che possono causare encefaliti sono: Herpesviridae, Adenoviridae, Polyomaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Paramyxoviridae, Othomyxoviridae e Retroviridae (11).

I virus che ricerchiamo nel nostro laboratorio sono:

Herpesviridae: *Herpes simplex virus 1 e 2* (HSV1 e HSV2). *Herpes simplex virus* costituisce la più frequente causa di encefalite virale acuta; HSV1 provoca il 90% delle infezioni a localizzazione neurologica che colpiscono i bambini e gli adulti, mentre nei neonati il 75 % dei casi è dovuto a HSV2, che contamina il canale del parto (17). Le età più colpite da HSV1 sono dai 5 ai 30 anni e sopra i 50: nel primo caso prevalgono le encefaliti in corso di infezione erpetica primaria, mentre

sono dovute a riattivazione la maggior parte di quelle dei soggetti anziani. In entrambe le forme, l'encefalo viene raggiunto per via nervosa centripeta, a partire dalle lesioni mucocutanee nelle forme primarie, e a partire dai gangli sensitivi nelle riattivazioni (18). In ospiti immunocompromessi, si può avere, nell'infezione primaria, una viremia sufficientemente consistente da portare il virus al SNC (4). L'encefalite è necrotizzante ed emorragica e la sua localizzazione più tipica è nei lobi temporali (9). La malattia risulta spesso mortale: la letalità, nei casi non trattati, si aggira intorno al 60-80%, mentre le sequele penalizzano il 90% dei sopravvissuti; con terapia appropriata, questi valori si abbassano, rispettivamente, al 16% e al 50% (15). Questo dimostra l'importanza di giungere tempestivamente alla diagnosi eziologica delle encefaliti da HSV, dato che rispondono bene a una chemioterapia antivirale (aciclovir) precocemente impostata (16).

Varicella Zoster virus (VZV). L'encefalite è una grave complicanza, che si verifica nello 0.1-0.2% dei casi di varicella; è più comune e più grave negli adulti e negli immunocompromessi, in cui la viremia è particolarmente prolungata da favorire la disseminazione del virus in vari distretti dell'organismo.

Sequele neurologiche si hanno nel 16% dei sopravvissuti; queste complicanze sono più frequenti nei pazienti immunocompromessi, nei quali sono state descritte varie sindromi tra cui zoster oftalmico e paralisi dei nervi cranici (13). L'encefalite, spesso associata a interessamento meningeo, si può avere anche nell'herpes zoster, come manifestazione di riattivazione del virus, che a partire dai gangli sensitivi risale lungo i nervi fino a raggiungere il SNC (4).

Epstein-Barr virus (EBV). Nel corso della mononucleosi infettiva si può verificare l'insorgenza (in meno dell'1% dei casi) di una meningite a liquor limpido o, più raramente, di un'encefalite che si manifesta talora con segni di coinvolgimento globale del sistema nervoso centrale. Frequenti le alterazioni psichiche fino al coma, le paralisi dei nervi cranici e le convulsioni (4). La prognosi è generalmente favorevole nel soggetto immunocompetente; negli immunodepressi, invece, ha quasi sempre esito letale (16).

Citomegalovirus (CMV). Il citomegalovirus può causare un'infezione del sistema nervoso centrale nel feto, per passaggio transplacentare, o in pazienti immunocompromessi. È una rara patologia che colpisce in particolare i trapiantati

Corresponding author: Maddalena Perotti

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi - DISCMIT, Università di Genova

16132 Genova- Italia - Largo Rosanna Benzi, 10 - Tel: 3471446707

E-mail: maddalena.perotti@unige.it

d'organo in trattamento immunodepressivo; generalmente l'infezione meningea è associata a encefalite (10). Nelle forme più gravi di infezione congenita si osservano importanti alterazioni neurologiche, sia anatomiche, sia funzionali e in coloro che sopravvivono sono frequenti le sequele (ritardo mentale, deficit motori, comizialità) (11). I pazienti adulti immunocompromessi presentano cefalea, fotofobia e deficit del tratto piramidale. L'evoluzione è infausta nella maggior parte dei casi; la prognosi dipende, più che dagli interventi terapeutici, dall'eventuale risoluzione dello stato di immunodeficienza. Non esiste tuttora una terapia sicuramente efficace: si può tentare l'impiego del ganciclovir o del foscarnet (10).

Human Herpes Virus 6 (HHV6). L'herpes virus umano 6 è un agente a elevato neuro-tropismo, pertanto il suo isolamento dal liquor in pazienti affetti da encefalite non è interpretabile come prova sicura di una responsabilità eziologica diretta (che, comunque, si realizza solo in soggetti immunocompromessi) (15). Può provocare un quadro clinico di meningite in concomitanza con la comune malattia esantematica (esantema critico o roseola infantum) (14).

Adenoviridae: Adenovirus. Gli adenovirus sono comuni agenti eziologici di infezioni delle alte vie respiratorie e di infezioni gastrointestinali ma, occasionalmente, producono infezioni del SNC in pazienti sia immunocompetenti che immunodepressi (9). Soltanto raramente danno meningite asettica, che, nella maggior parte dei casi, accompagna una localizzazione encefalica. Le condizioni in cui causano meningoencefalite sono i soggetti con polmonite da adenovirus e i soggetti immunocompromessi in cui la malattia assume un andamento cronico (7).

Picornaviridae: Enterovirus. Gli enterovirus, ubiquitari ed estremamente diffusi, sono gli agenti più comuni di meningite asettica; le encefaliti, oltreché esordire come tali, possono presentarsi anche come complicanze di meningiti asettiche (6,12). Bambini e giovani adulti sono i soggetti più colpiti (16).

Polyomaviridae: Virus JC (JCV). Il poliomavirus JC è presente in forma latente a livello renale nella maggior parte della popolazione. In vari stadi di immunocompromissione (es., gravidanza, trapianti, infezione da HIV) si può verificare la riattivazione del virus che si localizza al SNC determinando la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), che è una cerebropatia a evoluzione subacuta (2).

La sua incidenza è particolarmente elevata in corso di AIDS, di cui può essere, talvolta, la prima manifestazione (5). Il quadro clinico comprende disturbi del linguaggio, della visione e dell'apprendimento. La malattia progredisce entro 3-6 mesi con deficit motori e sensitivi. L'esito abituale è la morte entro alcuni mesi dall'esordio dei sintomi. Il cidofovir si è rivelato discretamente attivo nei confronti del virus JC (8).

Nelle forme a sospetta eziologia virale, la diagnosi di laboratorio viene subito impostata sia in maniera diretta, con il prelievo di campioni adeguati alla ricerca del virus, sia in maniera indiretta, con il prelievo di un campione di siero che verrà analizzato per la presenza di anticorpi (1). Nella diagnosi diretta, per quanto riguarda la scelta dei campioni, il liquor è il campione clinico irrinunciabile perché la dimostrazione del virus

in esso avrà un valore diagnostico assoluto.

Non sempre, però, i virus sono rintracciabili nel liquor, mentre possono essere più facilmente isolati da altri campioni clinici (12). L'introduzione della Polimerase Chain Reaction (PCR) nella diagnostica delle patologie infettive è stata una grande innovazione perché ha permesso una diagnosi rapida, con un'alta sensibilità e specificità, di patologie che presentano un'elevata morbilità se non riconosciute precocemente.

Le tecniche molecolari sono di inestimabile aiuto nel caso di virus per i quali non si dispone di sistemi di coltivazione, o di virus presenti nel liquor a basse concentrazioni (situazione molto comune) (3). Per quanto riguarda l'esame virale del liquor, però, la PCR non rappresenta il "gold standard" diagnostico per tutti i virus quindi, se non associata ad altri esami, c'è il rischio di risultati falsamente negativi (19).

Sono stati analizzati 300 campioni di liquor di pazienti con sospetta encefalite virale pervenuti presso l'Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi di Genova nel biennio dal 01 settembre 2007 al 31 agosto 2009 dagli ospedali della regione Liguria.

L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita mediante il sistema automatizzato QIAcube che svolge un processo completamente automatizzato per un massimo di 12 campioni. Lo strumento controlla i vari componenti integrati inclusa una centrifuga, un agitatore riscaldato, un sistema pipettante e un braccio meccanico. I reagenti usati sono contenuti nel QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Gli estratti dei liquor sono stati saggiati mediante Realtime PCR. Questa tecnica permette l'amplificazione del DNA o RNA virale presente nel campione in tempi molto ridotti. La Real-time PCR è stata eseguita con Rotor-Gene 3000 (Corbett Robotics, Australia). Rotor-Gene permette il rilevamento di quattro target in una singola reazione di amplificazione. Sono stati usati diversi kit commerciali per cui la PCR è stata eseguita secondo le indicazioni delle diverse case produttrici; i kit utilizzati per testare i diversi virus neurotropi lavorano tutti mediante sonde Taqman.

Dei 300 liquor analizzati, 51 (17%) sono risultati positivi per presenza di acidi nucleici virali; in quattro casi si è rilevata una co-infezione da due virus.

Non per tutti i liquor è stato eseguito tutto il pannello di virus neurotropi ma ci si è attenuti alle richieste del clinico. I virus maggiormente richiesti sono stati HSV1 e HSV2 seguiti dai restanti virus erpetici, enterovirus, adenovirus e JCV. Nella Tabella 1 sono riportate le percentuali di positività per singolo virus, in relazione alla loro richiesta, da cui è risultato che EBV è stato il virus maggiormente rilevato (11.6%), seguito da JCV (6.8%), HSV1 (6.5%), enterovirus (4.3%), VZV (2.2%), HSV2 e HHV6 (2%), adenovirus (1.4%) e, infine, CMV (1.2%).

I liquor sono pervenuti da tutto il territorio regionale quindi, nella Tabella 2, sono state quantificate le richieste di ogni distretto regionale e calcolata la positività rilevata. La provincia genovese è la provincia con la maggiore richiesta (255) e in particolare l'ospedale San Martino con 193 richieste, seguita dal Galliera (26). Dal ponente ligure sono pervenuti 38 campioni mentre dal levante ligure 7.

Tabella 1. Campioni positivi per singolo virus in relazione al totale delle richieste

	HSV1	HSV2	VZV	EBV	CMV	HHV6	ADV	ENT	JCV
TOT	245	242	181	147	169	101	71	93	59
POS	16	5	4	17	2	2	1	4	4
%	6,5	2	2,2	11,6	1,2	2	1,4	4,3	6,8

Tabella 2. Numero totale di richieste e numero di positivi per ospedale

	Genova			TOT	Ponente ligure	Levante ligure
	S.Martino	Galliera	altro			
TOT	193	26	36	255	38	7
POS	29	2	8	36	11	1
%	15	8	22	14	29	14

Dall'analisi dei risultati si evince che, nella realtà ligure, sono molti i casi in cui viene sospettata un'encefalite virale ma questa viene confermata solo in una bassa percentuale di casi. Questo può indicare la necessità di applicare delle linee guida diagnostiche che permettano di evitare esami inutili e costosi e che guidino il clinico verso l'esecuzione di esami complementari che potrebbero già escludere la possibilità di una causa virale della patologia. Il problema è confermato, nella nostra casistica, dal fatto che la maggioranza degli esami richiesti proviene dall'Ospedale San Martino, in cui si trova il nostro laboratorio, e quindi la facilità con cui si può richiedere un esame molecolare senza dover passare attraverso diversi iter burocratici spinge il clinico a richiederli in prima battuta, senza prima aver valutato gli esami laboratoristici e radiologici complementari.

Questo è ulteriormente confermato dalla notevole disparità di richieste tra l'ospedale San Martino (193) e l'ospedale Galliera (26) che sono i due maggiori ospedali della regione con equiparabile numero di accessi al Pronto Soccorso. Inoltre si vede una più alta positività nei campioni degli ospedali esterni che probabilmente avanzano delle richieste più ragionate e mirate, dovendo rendere conto alla propria direzione sanitaria prima di richiedere qualunque esame esterno. Altri fattori che dovrebbero comunque essere valutati per migliorare le capacità diagnostiche verso queste patologie sono la modalità di raccolta del campione, le tempistiche di raccolta rispetto all'esordio di sintomi, l'eventuale ripetizione dell'esame e, non ultima, la diffusione di nuovi microrganismi patogeni del SNC.

A livello internazionale, nel 2008, la Società Americana di Malattie Infettive ha pubblicato "The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines" in cui vengono poste 6 domande:

1. Quali sono gli indizi epidemiologici e clinici che suggeriscono una specifica eziologia di encefalite?
2. Quali esami diagnostici generali non riguardanti il sistema nervoso centrale andrebbero eseguiti in pazienti con sospetta encefalite?
3. Quali esami neurodiagnostici dovrebbero essere eseguiti nei pazienti con encefalite?
4. Quali esami sul liquor e su tessuti cerebrali possono aiutare nello stabilire l'eziologia di encefalite?
5. Quale terapia empirica si dovrebbe usare in pazienti con sospetta encefalite?
6. Una volta determinata l'eziologia, quale specifico trattamento va somministrato? A queste hanno risposto in modo molto esaustivo andando a rivisitare la letteratura di oltre un decennio e riuscendo così a delineare le tappe diagnostiche e terapeutiche per questa patologia.

Sempre nel 2008, in Inghilterra, è iniziato uno studio prospettico della Health Protection Agency (Aetiology of encephalitis in England: a multi-centre prospective study) che si pone 4 obiettivi principali:

1. ridurre la proporzione di encefaliti con eziologia non diagnosticata,
2. sviluppare un algoritmo diagnostico standardizzato,
3. descrivere l'epidemiologia e la clinica delle encefaliti,
4. valutare le implicazioni economiche delle sequele a lungo termine.

Si è stabilito di reclutare solo i pazienti con queste caratteristiche: qualunque persona, di qualunque età, ammessa in ospedale con encefalopatia (alterato livello di coscienza persistente da più di 24 ore, incluse letargia, irritabilità o un'alterazione della personalità e del comportamento) e due o più tra: febbre o storia di febbre ($>38^{\circ}\text{C}$), segni neurologici (con

evidenza di coinvolgimento del parenchima cerebrale), pleocitosi liquorale (>4 leucociti/ μl), elettroencefalogramma compatibile con encefalite, anomalie alle neuroimmagini compatibili con encefalite. Su questi pazienti si è stabilito quali esami eseguire distinguendo i pazienti immunocompetenti dagli immunocompromessi e dai viaggiatori, avendo ognuno diversi fattori di rischio. È inoltre stata stabilita una scaletta con esami di prima battuta ed esami da eseguire solo in caso di negatività dei precedenti.

In Italia, nel 2008, è stato presentato al Congresso Nazionale AMCLI il percorso diagnostico per le infezioni a carico del sistema nervoso centrale. Questo documento regolamenta, nel minimo dettaglio, la diagnostica microbiologica ma si dovrebbe migliorare ulteriormente. Per ottimizzare al meglio i tempi e i costi sarebbe necessario allargare il campo d'azione e coinvolgere anche altri specialisti quali neurologi, infettivologi e radiologi al fine di stabilire una flow chart che parta dal momento dell'accesso del paziente al Pronto Soccorso e che guidi gli operatori passo per passo per individuare i pazienti con una clinica compatibile con encefalite virale, che presentino immagini radiodiagnostiche ed esami chimico fisici compatibili e, solo in questi casi, procedere con la biologia molecolare che, visto anche il notevole costo, deve diventare un esame altamente mirato.

BIBLIOGRAFIA

1. Akçali A, Ozkaya E, Yilmaz D, Uyar Y, Oncül O. Investigation of herpes simplex virus in viral meningoencephalitis suspected cases using molecular and serological methods. *Mikrobiyol Bul.* 2008 Jul;42(3):421-8. Turkish.
2. Bossolasco S, Calori G, Moretti F, Boschini A, Bertelli D, Mena M, Gerevini S, Bestetti A, Pedale R, Sala S, Sala S, Lazzarin A, Cinque P. Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis.* 2005 Mar 1;40(5):738-44.
3. De Biasi RL, Kenneth LT. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct; 17(4):903-925.
4. Denes E, Ranger-Rogez S. Main adult herpes virus infections of the CNS. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005 Aug;3(4):663-78. Review.
5. Hirsch, H. H., P. R. Meylan, A. Iten, M. Battegay, and P. Erb. HIV-1-infected patients with focal neurologic signs: diagnostic role of PCR for *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus. *Clin. Microbiol. Infect.* 1998 4:577-584
6. Huppertz C, Durrheim DN, Levi C, Dalton C, Williams D, Clements MS, Kelly PM. Etiology of encephalitis in Australia, 1990-2007. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1359-65.
7. Kennedy PG. Viral encephalitis. *J Neurol.* 2005 Mar;252(3):268-72. Epub 2005 Mar 11. Review.
8. Marchioni E, Tavazzi E, Minoli R, Ferrante P et al. Lo spettro sindromico della leucoencefalopatia multifocale in epoca HAART. *Neurol Sci* 2005; 26:S103-S104
9. Molina Romanzi AM. *Microbiologia Clinica*. Ed. UTET.
10. Moroni, Esposito, De Lalla. 2003. *Malattie Infettive*. Ed. Masson.
11. Murray P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.M. Tenover. 2007. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. ASM PRESS.
12. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A et al. Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2005; 12:331-343.
13. Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol.* 2007 Nov;6(11):1015-28. Review.
14. Stone MJ, Hawkins CP. A medical overview of encephalitis. *Neuropsychol Rehabil.* 2007 Aug-Oct;17(4-5):429-49. Review
15. Studahl, M., T. Bergstrom, and L. Hagberg. Acute viral encephalitis in adults—a prospective study. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998; 30:215-220
16. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, Sejvar JJ et al. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the infectious disease society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 47:303-27.
17. Tyler KL. Update on herpes simplex encephalitis. *Rev Neurol Dis.* 2004 Fall;1(4):169-78. Review.
18. Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res.* 2006 Sep;71(2-3):141-8. Epub 2006 Apr 25. Review.
19. Zajkowska JM, Ustymowicz A, Hermanowska-Szpakowicz T. Difficulties in early diagnosis of Herpes simplex encephalitis. *Pol Merkurius Lekarski.* 2005 Nov;19(113):719-22. Review.