

# STRATEGIMØTE

## MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED VIRALE CNS- INFEKSJONER

31. OKTOBER 2002

Plenumssaken i vaksinebygget, Folkehelseinstituttet

ANBEFALINGER

OG

ABSTRAKT AV FORELESNINGER



Redaktører:

Gunnar Størvold,  
Ellen Holter.

Referansegruppen for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi

<b>INNHold:</b>	side
Program	2
Anbefalinger	3
Virale meningitter og encefalitter. Klinisk spektrum, indikasjoner for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk. <i>Per Bjark.</i>	7
Indikasjon for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk i utredning av nevrologiske problemstillinger. <i>Aud Nome Dueland.</i>	9
Laboratoriediagnostikk av HSV og VZV, samt kort om parotitt- og morbillivirus. <i>Anne-Lise Bruu.</i>	11
Enterovirus, laboratoriediagnostikk. <i>Mona Holberg-Petersen.</i>	15
Nytten av cellekultur i diagnosen av enterovirusmeningitt og for overvåkingen av poliovirus. <i>Ivar Ørstavik.</i>	18
Skogflåttbåren encefalitt (TBE), laboratoriediagnostikk. <i>Tone Skarpaas.</i>	23
Virale CNS-infeksjoner hos immunosupprimerte pasienter: Klinisk spektrum, og indikasjon for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk. <i>Arvid Bjørneklett.</i>	26
CMV, laboratoriediagnostikk. <i>Ellen Holter.</i>	31
Epstein-Barr virus og Humant herpesvirus 6 (HHV-6), laboratoriediagnostikk. <i>Svein Arne Nordbø.</i>	36
JC virus og BK virus, laboratoriediagnostikk. <i>Christine H. Rinaldo.</i>	41
CNS-infeksjon med HIV, laboratoriediagnostikk. <i>Birgitta Åsjö.</i>	44

**Programkomite:**

Gunnar Størvold, Ellen Holter, Svein Arne Nordbø og Sølvi Noraas.

**Redaktører:**

Gunnar Størvold og Ellen Holter.

## PROGRAM

- 10 00 Referansegruppens leder ønsker velkommen**  
Kort innledning med programoversikt v/møteleder Karl-Henning Kalland.
- 10 05 Per Bjark:** Virale meningitter og encefalitter.  
Klinisk spektrum, indikasjoner for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk.
- 10 35 Aud Nome Dueland:** Indikasjon for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk i utredning av nevrologiske problemstillinger.
- 11 05 Kaffepause**
- 11 20 Anne-Lise Bruu:** Laboratoriediagnostikk av HSV og VZV, samt kort om parotitt- og morbillivirus.
- 11 50 Mona Holberg-Petersen:** Enterovirus, laboratoriediagnostikk.
- 12 10 Ivar Ørstavik:** Nyttien av cellekultur i diagnosen av enterovirusmeningitt og for overvåkingen av poliovirus.
- 12 30 Lunsj**
- 13 25** Kort innledning v/møteleder Gunnar Størvold.
- 13 30 Tone Skarpaas:** Skogflåttbåren encefalitt (TBE), laboratoriediagnostikk.
- 13 50 Arvid Bjørneklett:** Virale CNS-infeksjoner hos immunsupprimerte pasienter: Klinisk spektrum, og indikasjon for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk.
- 14 20 Ellen Holter:** CMV, laboratoriediagnostikk.
- 14 40 Kaffepause**
- 15 00 Svein Arne Nordbø:** Epstein-Barr virus og Humant herpesvirus 6 (HHV-6), laboratoriediagnostikk.
- 15 25 Christine H. Rinaldo:** JC virus og BK virus, laboratoriediagnostikk.
- 15 40 Birgitta Åsjö:** CNS-infeksjon med HIV, laboratoriediagnostikk.
- 15 55 Diskusjon, og oppsummering/anbefaling ved møtelederne.**
- 16 45 Slutt**

# ANBEFALINGER

## INNLEDNING

I Norge brukes betegnelsen serøs meningitt vanligvis om den kliniske tilstanden med milde meningittsymptomer, fravær av nevrologiske utfall, og lavt celltall i spinalvæske (mindre enn 1000 celler pr ul). Betegnelsen meningoencefalitt og encefalitt brukes om sykdomsbilder med symptomer og tegn på cerebral affeksjon.

De vanligste virale meningitter og encefalitter i Norge er forårsaket av enterovirus og virus i herpesvirusgruppen.

Meningitter forårsaket av enterovirus er oftest milde og selvbegrensende, og antiviral behandling er verken tilgjengelig eller nødvendig. Viral diagnostikk ønskes i slike tilfeller for å bekrefte mistanken og for å utelukke andre årsaker som kan kreve behandling. Ved mistanke om meningoencefalitter/encefalitter forårsaket av virus i herpesgruppen må ofte behandling startes på mistanke. Virusdiagnostikken er likevel viktig for bekreftelse. Meningitter og meningoencefalitter hos immunkompromitterte personer krever bredere utredning.

Myelitter (inflammasjon/infeksjon av ryggmarg) kan være forårsaket av virus i herpesgruppen, evt. også av enterovirus. HTLV og HIV er sjeldne årsaker. Radikulitter (inflammasjon/infeksjon av nerverøtter), kraniale nevritter og andre nevritter kan ha virale årsaker, spesielt virus i herpesgruppen, eller være sekundære til virale infeksjoner.

Generelt gjelder nok at de virologiske laboratorier i dag utfører en god del arbeid som er lite produktivt, fordi det rekvireres mange undersøkelser ”for sikkerhets skyld” i en tidlig undersøkelsesfase, uten at god nok indikasjon alltid foreligger. Det må anses å være et betydelig forbedringspotensiale når det gjelder remissens opplysninger fra kliniker til laboratorium. Det anses også å være et potensiale for forbedring vedrørende den diagnostiske utredning som utføres ved de virologiske laboratorier. Det utføres trolig for bred utredning i mange tilfeller, og for smal utredning i andre. Vi håper årets strategikonferanse kan gi oss noen felles retningslinjer.

## HSV og VZV

### Meningitt og encefalitt

#### Påvisning av virus:

- Hjernebiopsi har ikke lenger noen sentral plass i diagnostikken. Dyrkning og antigenpåvisning i spinalvæske har for dårlig sensitivitet og anbefales ikke.
- PCR i spinalvæske anbefales de to første uker etter sykdomsdebut.
  - Samtidig påvisning av HSV-1 og HSV-2 bør foretrekkes fremfor felles HSV PCR. VZV settes samtidig opp i egen PCR.
  - Dersom en helt tidlig prøve er negativ på PCR, bør en ny prøve vurderes.

### **Antistoffundersøkelser:**

- Ratiobestemmelse bør ikke utføres ved sykdomsvarighet under 10 dager.
- Ta vare på serum/spinalvæske for evt. senere undersøkelse av titerstigning.
- Påvisning av IgM i spinalvæske skyldes intrathekal produksjon. Dette må utføres med metodikk som er validert for spinalvæske som prøvemateriale.

### **Myelitt/nevritt/radikulitt:**

- PCR alene er ikke tilstrekkelig. Ratiobestemmelse bør i tillegg gjøres, i prøver tatt mer enn 2 uker etter sykdomsstart.
- Ved samtidig hud- eller slimhinnelesjon taes i tillegg prøve til dyrkning/PCR.

### **Herpes neonatorum:**

- PCR bør utføres både på spinalvæske og plasma.

### **Mesling- og kusmavirus:**

- Antistoffpåvisning med ratiobestemmelse utføres.
- PCR er ikke rutinemessig tilgjengelig i Norge.

### **Enterovirus**

#### **Påvisning av virus:**

- Nukleinsyre påvisning (RT-PCR eller NASBA) bør utføres hos alle pasienter med mistenkt enterovirusinfeksjon i CNS. Primært skal undersøkelsen utføres i spinalvæske, men fæces og halsprøve kan også undersøkes.
- Dyrkning fra spinalvæske har dårligere sensitivitet enn RT-PCR og er til mindre nytte.
- Dyrkning fra fæces har under optimale betingelser en diagnostisk følsomhet som nærmer seg PCR og er et naturlig supplement. Enterovirus i fæces behøver likevel ikke være relatert til evt. infeksjon i CNS.
- Påvisning av enterovirus med nukleinsyreamplifikasjon bør følges opp med typebestemmelse. Dyrkning er nødvendig for serotyping, og ofte også for genotyping.

#### **Antistoffundersøkelse:**

- KBR er lite sensitiv, og nytten er tvilsom.

#### **Poliovirusovervåking:**

- Fæcesprøver og uidentifiserte enterovirusisolater fra pasienter med akutt serøs meningitt eller meningoencefalitt og fra barn (under 15 år) med slappe pareser skal undersøkes for poliovirus ved WHO-akkreditert laboratorium (Nasjonalt Folkehelseinstitutt).

### **Flåttbåren encefalitt (TBE)**

Ved klinisk mistanke om meningoencefalitt hos person som siste 1 (– 2) måneder før sykdomsdebut har vært i områder hvor det er risiko for å få flåttbårne infeksjoner. I serum utføres TBEV-IgM og -IgG undersøkelse. Ved funn av kun IgM anbefales ny prøve for å følge IgG-utviklingen.

Ved funn av TBEV-IgM i serum: Spinalvæsken testes for TBEV-IgG og -IgM. Ved positiv IgG må evt. svikt i blod/hjernebarriere undersøkes.

Hvis pasienten er smittet i et lavprevalensområde, eller hvis det er usikkerhet om diagnosen, må funn av antistoff konfirmeres (nøytralisasjonstest eller Western Blot).

Opplysninger om utenlandsreise siste måned før sykdomsdebut (og om nærkontakt med sau) er viktig for å vurdere mulighet for infeksjon med andre flavivirus. Vaksinasjonsstatus for flavivirus (TBE, gulfeber og japansk encefalitt) må avklares.

## **Virale CNS-infeksjoner hos immunsupprimerte pasienter.**

Det anbefales å undersøke spinalvæske med PCR for alle aktuelle virus i herpesgruppen og JC-virus. Stereotaktisk biopsi må overveies i noen tilfeller.

## **CMV**

Undersøkelser i blod: Både kvantitativ CMV PCR i plasma, CMV pp65 antigen-undersøkelse i leukocytter, kvantitativ RNA-DNA-hybridisering i leukocytter og CMV pp67 mRNA-us. i leukocytter anses som likeverdige undersøkelser. Antistoffundersøkelse er av verdi bare ved primærinfeksjon, og er unødvendig å utføre hos tidligere seropositive personer. Hos immunkompromitterte som er tidligere seronegative, og hos immunkompromitterte med ukjent immunstatus, anbefales antistoffundersøkelse. Hvis både IgG og IgM kan påvises, og sykehistorien er lengre enn 8-10 dager, er det vanskelig eller umulig å skille mellom primærinfeksjon og reaktivering. Aviditetsundersøkelse kan i så fall være til hjelp. Hos immunkompetente utføres antistoffundersøkelse bare ved spesiell mistanke om CMV-infeksjon.

Undersøkelser i spinalvæske: Hos immunkompromitterte personer anbefales CMV DNA PCR. Kvalitativ PCR suppleres med eller erstattes med kvantitativ. Funn av CMV DNA er ikke alltid ensbetydende med CMV-sykdom i CNS. Undersøkelse av CMV pp67 mRNA i tillegg kan bedre spesifisiteten, men dette anbefales foreløpig ikke som noen nødvendig undersøkelse. Hos immunkompetente utføres CMV PCR bare ved spesiell mistanke om CMV-infeksjon. Antistoffundersøkelse i spinalvæske anbefales ikke pga. usikkerhet om betydningen av funn.

## **EBV**

Påvisning og helst kvantitering av EBV- DNA i spinalvæske (og samtidig EDTA-blodprøve) med PCR eller lignende er beste diagnostikk.

Det er en signifikant sammenheng mellom mengde EBV- DNA i spinalvæske og sykdommens alvorlighetsgrad. Små mengder EBV-DNA i spinalvæsken behøver ikke ha klinisk betydning (reaktivering i forbindelse med annen infeksjon?).

EBV-DNA kan vanligvis påvises fra 1. – 3. sykdomsdag og i 2 – 4 uker deretter. Realtids PCR synes å være den overlegne metoden i praktisk diagnostikk.

EBV-antistoffer i serum kan være til hjelp for påvisning av primærinfeksjon eller reaktivt/kronisk infeksjon. Intratekale antistoffer produseres sent i forløpet (etter at EBV-DNA

forsvinner) og kan være vanskelig å påvise. Serologiske undersøkelser i spinalvæske er derfor av liten diagnostisk verdi.

## **HHV-6**

Påvisning av HHV-6 DNA i spinalvæske og blod med PCR eller lignende er av størst betydning. Trolig er klinisk betydning større jo større virus-DNA mengden i spinalvæsken er. Ved de høyeste konsentrasjonene i spinalvæsken finnes som regel også systemisk viremi (i serum/plasma/fullblod) eller perifere mononukleære celler. Bruk av semikvantitative eller kvantitative metoder anbefales.

Serologisk diagnostikk kan påvise primærinfeksjon (serokonversjon/IgM i serum), men er av liten verdi ved reaktivert infeksjon. Intratekale antistoffer kan være vanskelig å påvise, og er av liten diagnostisk verdi.

## **JCV og BKV**

JCV og BKV gir i praksis bare CNS-sykdom hos immunsupprimerte (reakivering av latent virus).

**PML** (progressiv multifokal leukoencefalopati): Undersøkelse av JCV DNA i spinalvæske ved PCR. For JCV er det rapportert at høy virus load er assosiert med kortere pasient-overlevelse. Kvantitering er derfor ønskelig.

**BKV** er en mindre vanlig årsak til encefalitt. Diagnose: Påvisning av DNA i spinalvæske ved PCR.

## **HIV**

Siden HIV-infeksjonen etableres i CNS tidlig i infeksjonsforløpet, kan HIV RNA ofte påvises med nukleinsyreamplifikasjon også i fravær av CNS-symptomer.

Ved mistanke om HIV-encefalopati/encefalitt:

Påvisning og kvantitering av HIV-RNA i spinalvæske, og samtidig kvantitering av HIV-RNA i plasma anbefales. Høye verdier av HIV-RNA i spinalvæske i forhold til plasma gjør diagnosen sannsynlig, og er ofte korrelert til grad av CNS-sykdom. Man må forsøke å utelukke andre mulige årsaker, bl. a. opportunistiske mikrober, da HIV CNS-infeksjon ofte er en utelukkelsesdiagnose.

Antistoffundersøkelse (ratiobestemmelse serum/spinalvæske) er av mindre betydning.

## **VIRALE MENINGITTER OG ENCEFALITTER**

Klinisk spektrum, indikasjoner for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk.

*Per Bjark, Seksjon for infeksjonssykdommer, Sykehuset i Vestfold HF*

I Norge er det vanlig å betegne som serøs meningitt det kliniske bilde med milde meningittsymptomer, lavt celletall i spinalvæske (i alminnelighet under 1000 pr ul) og fravær av nevrologiske utfall. I noen land bruker man betegnelsen meningoencefalitt om tilsvarende tilstander, mens det i Norge er vanlig å reservere denne betegnelsen for sykdomsbilder med symptomer og tegn på cerebral affeksjon.

Spinalvæskefunn som kvalifiserer til betegnelsen serøs meningitt kan finnes ved noen tilstander som ikke nærmere skal kommenteres her (akutt HIV- syndrom, EBV, krypto-kokkose, Listeriainfeksjon, Lyme borreliose, tuberkulose, lues). Poenget for klinikerer er å finne, forstå og aksjonere på disse infeksjonene på adekvat måte. Størsteparten av serøse meningitter og encefalitter skyldes noen få typer virus hvor det er behov for laboratoriemessig støtte/bekreftelse.

Parotittmeningitt er praktisk sett forsvunnet i vårt land etter at sykdommen er henimot utryddet ved vaksinasjon. Går man et par tiår tilbake i tid var dette en meget vanlig viral meningitt. Behovet for virologisk diagnostikk rettet mot påvisning av parotittvirus er således nærmest ikke-eksisterende i vår nåværende epidemiologiske situasjon.

De to viktige hovedgrupper av virale meningitter og encefalitter er forårsaket av enterovirusgruppens representanter samt herpesvirus.

Det er noe tendens til sesongsvingninger i forekomsten av enterovirusmeningittene med en øket forekomst i høstmånedene. Man må imidlertid være forberedt på å møte disse infeksjonene hele året og det vanlige er at man ikke har spesielle holdepunkter i form av utbrudd. Enkeltilfellene er det de fleste sykehus får inn og man har i utgangspunktet beskjedne holdepunkter for spesifikk etiologi.

De fleste enterovirusmeningitter er klinisk milde serøse meningitter med lett til moderat nakkestivhet, upåvirket sensorium, ingen objektive, nevrologiske utfall og lite påvirket pasient. Gruppen domineres av barn og yngre voksne. Det har i senere år forekommet tilfeller av Coxsackie A-infeksjon hvor det har vært klare nevrologiske symptomer og funn med meget varierte bilder, åpenbart kvalifisert for betegnelsen meningoencefalitt. Forøvrig snakker vi om selvbegrensede, mild sykdom uten nevrologiske eller andre følgetilstander.

Det finnes i dag ingen spesifikk virusterapi rettet mot eller effektiv på enterovirusinfeksjonene i sentralnervesystemet. Viral diagnostikk gjøres derfor ikke primært for å finne behandlingsalternativer, mer for å kartlegge, samt ekskludere andre tilstander med samme spinalvæskefunn og andre terapeutiske og kliniske konsekvenser. Man har et ønske om spesifikk diagnostikk for sikker klassifisering. Ettersom en rekke enterovirus er vanskelige å få frem i kultur er PCR-basert diagnostikk blitt viktig. Det er i alminnelighet ingen problemer med å få

spinalvæske. Med noe treghet er det som regel heller ikke så vanskelig å få fæces til undersøkelse. Raske svar basert på PCR er det klinikerer i dag mest etterspør.

Det gir støtte i klinisk praksis: Antiviral behandling kan unnlates eller seponeres, man vet stort sett at forløpet blir fredelig og at langvarig sykdom eller sekveler er store sjeldenheter.



Noen laboratorier tilbyr ennå på anmodning KBR-basert serologisk undersøkelse. Man har i noen tilfeller signifikant titerstigning som eneste diagnostiske funn. Dog er den diagnostiske sensitivitet av serologisk undersøkelse lav.

Fæcesundersøkelsen forsømmes ofte fra klinisk side. Det er også en kjensgjerning at prøver sendes til laboratoriet med helt inadekvate opplysninger, således at laboratoriet er usikkert på klinisk relevans av rekvirerte undersøkelser og ikke alltid finner å ta i bruk hele sitt repertoar.

Herpes-meningoencefalitt forårsaket av type 1 eller type 2 gjøres til gjenstand for spesifikk antiviral behandling, i alminnelighet med oppstart på klinisk mistanke, før laboratoriemessig diagnostisk støtte foreligger.

Neonatal herpesencefalitt representerer et spesielt sykdomsbilde som erfaringsmessig diagnostiseres adekvat ved de pediatrike avdelinger, behandles adekvat, men likevel kan gi alvorlige sekveler. Bekreftelse virologisk er viktig for sikker klassifisering av sykdommen, men i alminnelighet gjennomfører klinikerer sin behandling på mistanke og får det virologiske funn en god stund ute i forløpet.

I voksen medisin volder herpesencefalitt større diagnostiske problemer. Tilstanden skyldes overveiende type 1-infeksjoner, er ikke knyttet til primærinfeksjon og har varierte og innledningsvis ofte forvirrende sykdomsbilder. Hos eldre pasienter kan mistak skje i retning cerebrovaskulær sykdom og demenstilstander. Spinalvæskeundersøkelser, spesielt PCR, er viktig. Terapi skal normalt være innsatt på mistanke og der er generelt lav terskel for start av aciclovir på grunn av dette middels lave toksisitet. Radiologisk undersøkelse med ensidige strukturelle forandringer temporoparietalt støtter diagnosen og vil noen ganger foreligge før man har virologiske funn.

Herpes type 2 er en viktig årsak til serøs meningitt, undertiden med nevrologiske utfall men generelt beskjedne sådanne i forhold til type 1-infeksjonene. HSV 2 er den alminnelige årsak til «benign, residiverende lymfocytær meningitt (Mollaret)». Diagnostisk bekreftelse virologisk er ønskelig for å sette sikker etikett på tilstanden og av hensyn til herpesrettet antiviral behandling under aktuell episode og som tidlig innsatt suppressiv medikasjon i pasientens egen regi ved residiver. Kostnad, refusjonsrettighet, etc. taler for at man gjør bestrebelsler på sikker virologisk diagnose. Man har gjennom vel 10 år (etter erkjennelsen av årsaksforholdene ved de residiverende meningitter) hatt nytte av så vel dyrkning (mindre sensitiv) som PCR-diagnostikk.

Flåttbåren encefalitt (TBE) har ikke vært noe problem i Norge. Et fåtall tilfelle er registrert i senere år. Man må regne med at det blir mer aktuelt med diagnostikk av denne tilstand og vi bør ha et innenlands tilbud. Det er neppe behov for slik diagnostikk ved mer enn ett nasjonalt laboratorium.

For sjeldne, importerte infeksjoner (Japanese B, o.a.) må man ressursmessig diskutere om man skal ha innenlands diagnostikk eller avtale om samarbeid med for eksempel det nasjonale svenske laboratorium.

Trolig gjør de virologiske laboratorier i dag en god del arbeid som er lite produktivt fordi det rekvireres undersøkelser i en tidlig undersøkelsesfase som viser seg å mangle reell indikasjon. Videre ansees det å være et betydelig forbedringspotensiale i remissens opplysninger fra kliniker til laboratorium.

## **INDIKASJON FOR OG NYTTE AV MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK I UTREDNING AV NEVROLOGISKE PROBLEMSTILLINGER.**

*Aud Nome Dueland, dr.med., spesialist i nevrologi, Sandvika nevrologpraksis.*

Selv om tittelen på strategimøtet angår primært diagnostikk av virale infeksjoner i sentralnervesystemet, er det ofte at infeksjoner i nervesystemet gir symptomer og kliniske funn fra både det sentrale og det perifere nervesystemet.

Det er mange forskjellige nevrologiske tilstander som skyldes infeksjoner, både bakterielle og virale. Mange av disse infeksjonene kan være vanskelig å påvise dersom man kun bruker blodprøver i diagnostikken. I tillegg er det mange infeksjoner som kan gi nevrologiske symptomer som ledd i en systemisk infeksjon.

Indikasjon for mikrobiologisk utredning er primært todelt. Først og fremst er det ønsket om å kunne stille en så eksakt diagnose som mulig. Dernext vil en sikker mikrobiologisk diagnose kunne avgjøre behandlingsmuligheter. Ennå er det slik at mange virale infeksjoner ikke har kurativ behandling, men differensialdiagnostisk er det likevel viktig å kunne avgjøre sykdomsårsak også for å unngå unødvendig behandling med for eksempel bredspektrede antibiotika. En sikker diagnose er også nødvendig for å kunne uttale seg om prognose.

Generelt kan nevrologisk utredning ofte deles i utredning av akutte nevrologiske tilstander og utredning av tilstander hvor symptomene kommer gradvis og snikende. Det er både viktig og nødvendig å tenke bredt i slike utredninger. Samtidig er det også relevant å være bevisst på konsekvenser av utredningen og om hva det er realistisk å oppnå.

Meningitter og encefalitter er allerede drøftet av andre, og vil derfor ikke bli omtalt her. Andre akutte tilstander er myelitter (inflammasjon/infeksjon av ryggmarg). Både infeksjoner av forskjellige virus i herpesvirusgruppen og HTLV og HIV infeksjoner kan gi myelittbilder.

Radikulitter, både polyradikulitter og kraniale nevrer, kan ha direkte virale årsaker, eller være sekundære til virale infeksjoner. Også i disse tilfellene er herpesvirusgruppen en hyppig årsaksfaktor. Særlig i residiverende tilfeller bør herpesvirusinfeksjoner være vurdert. Facialispareser blir ofte beskrevet som idiopatiske, men kan nok ofte være forårsaket av herpesvirus reaktivering, og dersom det forekommer andre symptomer og utfall i tillegg til facialisaffeksjonen, bør videre utredning være naturlig. Differensialdiagnostisk er borreliainfeksjon viktig.

Akutte smertetilstander bør også utredes mikrobiologisk, særlig bør varicella zoster virus infeksjoner vurderes. Zoster sine herpete er sannsynligvis en mer vanlig tilstand enn det man tidligere har antatt. Preherpetisk nevralgi er også en tilstand som bør tas i mente.

Det er også tradisjon for rutineundersøkelser på diverse virusantistoffer i utredningen av demyeliniserende tilstander og ved vaskulitter. Dette brukes primært for å utelukke andre mulige årsaker til den aktuelle tilstanden. Slik sett kan man si at mikrobiologisk utredning av disse pasientene er et ledd i en eksklusjonsdiagnostikk.

Det er likevel aller viktigst å diagnostisere de infeksjonene hvor det foreligger effektiv behandling. Her er igjen herpesvirusgruppen den viktigste, og det er min kliniske erfaring at mange forskjellige nevrologiske tilstander kan være herpesvirusutløst. Ofte er det også slik at man lettere finner det man leter etter, og dersom man ikke tenker muligheten av en slik infeksjon, vil en heller ikke utrede.

Gjennom de siste 10-20 årene har våre diagnostiske muligheter øket, særlig etter utviklingen av PCR teknikk. I nevrologiske så vel som i mikrobiologiske kretser hadde man store forventninger til mulighetene for raskere og mer korrekt diagnose. I mange tilfeller har dette vært en revolusjon, særlig i encefalitt diagnostikk. Imidlertid viser erfaring at når det gjelder virale infeksjoner hvor nerverøtter (radikulitter) og nerver (nevritter) er affisert, kan det være vanskelig å påvise infeksjonsagens, selv med PCR av spinalvæske. Derfor er det viktig å kombinere flere diagnostiske metoder for best mulig å kunne påvise den aktuelle infeksjonen. Der hvor det foreligger hudutslett eller hud/slimhinnelesjoner bør det tas prøve til dyrkning eller PCR påvisning av virus, selv der hvor exantheme tilsynelatende er karakteristisk. Dette for med sikkerhet å ha dokumentasjon på virustype. Serologisk utredning blir ofte i praksis det mest brukte, og det er da viktig å ta gjentatte prøver for eventuelt å kunne påvise titerstigning. Selv der hvor en kommer sent til i forløpet av en mulig infeksjon kan påvisning av høyt antistoff titer være verdifullt i vurderingen. Spinalvæske undersøkelser sammen med parallelle serum prøver er det ideelle ved serologisk diagnostikk. Da vil en kunne påvise eventuell intrathecal produksjon av antistoffer.

I mikrobiologisk utredning av nevrologiske tilstander er det nyttig og viktig med en god kommunikasjon mellom kliniker og mikrobiologisk laboratorium. Vi klinikere bør være bevisste på de kliniske opplysninger og problemstillinger vi gir når vi sender inn prøver. Det bør være lav terskel for å stille spørsmål om tolkningsmuligheter av prøvesvar og spesifisitet av resultatene.

# LABORATORIEDIAGNOSTIKK AV HSV OG VZV, SAMT KORT OM PAROTITT- OG MORBILLIVIRUS

*Anne-Lise Bruu, Mikrobiologisk laboratorium, Sykehuset i Vestfold HF*

## **Herpes simplex virus (HSV) og varicella-zoster virus (VZV) encefalitt/meningoencefalitt.**

Ca. 70 % av alle tilfellene av HSV-encefalitt (HSE) skyldes reaktivering av latent infeksjon, 30 % opptrer som følge av en primærinfeksjon. Ved en reaktivering skjer spredningen til hjernen som regel nevrogen, mens ved en primærinfeksjon er hematogen spredning det vanlige, f.eks. ved herpes neonatorum og meningoencefalitt ved primær herpes genitalis, samt ved residerende meningitt (Mollarets meningitt). Ved herpes neonatorum kan HSV-DNA også påvises i serum eller plasma, som bør tas som supplerende prøve til spinalvæske. Man kan ikke alltid forvente IgM-respons ved reaktivering, verken i serum eller i spinalvæske. Mens meningitt og encefalitt er uhyre sjelden ved VZV-primærinfeksjon (hos 1-2/10.000 som har vannkopper), er det en ikke uvanlig komplikasjon ved herpes zoster. For diagnostikk av VZV-encefalitt gjelder de samme prosedyrer som for HSE.

**Påvisning av virus eller virusantigen i hjernebiopsimateriale** ble tidligere regnet som gullstandard på grunn av høy sensitivitet og spesifisitet (henholdsvis 96 % og 99 %). I dag brukes så å si bare non-invasive metoder for prøvetaking, for hjernebiopsimetoden var forbundet med en viss risiko for komplikasjoner (ca. 3 %). Dessuten kan store deler av hjernen være fri for virus. Dyrking av spinalvæske gir positivt resultat bare i 4 % av alle tilfeller av HSE. Det har også blitt etablert ulike metoder for påvisning av **HSV-antigen i spinalvæske**, men de har for lav sensitivitet, med unntak av en immunoblot metode.

Etter 1990 har det skjedd en diagnostisk revolusjon fordi genteknologiske metoder, først og fremst **polymerasekjedereaksjonen (PCR) for påvisning av nukleinsyre i spinalvæsken** har blitt etablert. Det finnes forskjellige varianter av PCR, men nested PCR med to primerpar har blitt ansett som mest sensitiv. Ønsker man å bruke bare et primerpar, må metoden kombineres med hybridisering. For samtidig påvisning av HSV-1 og 2, velger man primere fra henholdsvis glykoprotein B- og glykoprotein D-regionen, mens ved en type-felles HSV-DNA påvisning er det vanlig å velge primere fra thymidinkinaseregionen. Påvisning av PCR-produktet kan gjøres med gel-elektroforese, hybridiseringsteknikk, kolorimetrisk eller ved smeltepunkts-analyse som i LightCycler-systemet.

HSV-DNA kan påvises allerede fra og med 1. sykdomsdag og hos de fleste pasientene i 8-14 dager. Metoden har høy sensitivitet hvis prøven er tatt i 1. sykdomsuke. Fra og med 3. uke er det betydelig mindre sjanse for å påvise DNA, selv om enkelte pasienter kan ha det helt til 28. sykdomsdag. Hvis en spinalvæske tatt helt i akuttfasen gir negativt resultat og det fortsatt er klinisk mistanke om encefalitt, bør ny prøve undersøkes.

Det er mulig ved bruk av automatisert utstyr å gjøre en kvantitativ DNA-bestemmelse og på den måten overvåke behandlingen. Komplette kommersielle kits for kvalitativ og kvantitativ påvisning kommer sannsynligvis til å bli tilgjengelige om noen år. Real-time PCR har høyere sensitivitet enn vanlig PCR og kan påvise <10 kopier.

Ved hjelp av LightCycler-systemet kan 50 cykler kjøres på 20–30 minutter, mot 4-6 timer som ellers er vanlig for en PCR. Resultatet kan også foreligge innen ca. 4 timer etter at prøven er tatt, mens man må regne minst 1-1 ½ dag for et manuelt PCR-oppsett. Dessuten er det et lukket system med redusert risiko for kontaminering.

En etablert PCR-metode må løpende kvalitetssikres, bl.a. ved at man regelmessig deltar i et opplegg for ekstern kvalitetskontroll. Metoden bør ha en sensitivitet på minst 90 %. Vanligvis kan spesifisiteten anslåes til 100 %, dvs. hvis man har et positivt resultat og med sikkerhet kan utelukke kontaminasjon av prøven, så er det spesifikt.

Følgende tekniske faktorer kan bidra til falsk negativt resultat:

- for lite analysevolum (minimum 10 µl anbefales)
- ikke optimal metode for ekstraksjon
- ikke optimalt valg av primere
- lite gunstig sammensetning av buffere
- antall cykler ikke optimalisert
- om det er enkel eller nested PCR

Dette er forhold som lett kan standardiseres, men falskt negativt resultat kan også skyldes at

- prøven er tatt for sent i sykdomsforløpet
- ”fortynningseffekt” ved økt produksjon av spinalvæske (kan forekomme hos enkelte pasienter i akuttfasen ved encefalitt)
- oppbevaring og/eller transport har ikke vært optimal. Det anbefales at transporten bør være nedkjølt, og at prøven bør tas hånd om innen 24 timer etter den er tatt. Hvis ikke det er mulig, bør den fryses ved -70°C.
- Prøven kan inneholde inhiberende faktorer, f.eks. blod. Dette kan påvises ved å sette opp hver prøve i duplikat og tilsette inhibisjonskontroll, f.eks. spesifikt DNA, til den ene prøven.

Flere gjennomførte studier viser ingen sikre holdepunkter for at tidlig innsettende acyklovirbehandling har innvirkning på analyseresultatet.

Ved **rationundersøkelse** bestemmes forholdet mellom IgM- eller IgG-antistoffer (mest vanlig) i serum og spinalvæske. Normalt skal det være >100 ganger mer antistoff i serum, men dette forholdet reduseres ved akutt encefalitt på grunn av intrathekal antistoffproduksjon. Fordi påvisning av antistoffer i spinalvæsken også kan skyldes en barrieresvikt, må undersøkelsen inkludere en markør for dette, f.eks. RS-virus- eller albuminratio. Ved sensitive teknikker kan spinalvæskeantistoffer påvises i signifikant og høyt nivå i prøver tatt  $\geq 10$  dager etter sykdomsdebut. For slik påvisning har RIA-tester høy sensitivitet, det samme gjelder  $\mu$ -capture ELISA og immunoblot-teknikker, mens indirekte ELISA er noe mindre sensitiv. Det er beskrevet at pasienter med gjennomgått encefalitt kan ha patologisk ratio i opptil flere måneder eller år. demyeliniserende lidelser i CNS, f.eks. MS, initierer også intrathekal antistoffproduksjon mot en rekke virusantigener som følge av en polyklonal stimulering av intratekale B-lymfocytter.

Signifikant stigning av IgG-antistoffer i spinalvæsken blir også betraktet som et pålitelig diagnostisk kriterium. Det samme gjelder påvisning av spesifikt IgM i spinalvæsken, fordi IgM-molekylene er for store til å passere blod/hjernebarrieren. For IgM-påvisning anbefales  $\mu$ -capture ELISA eller RIA, fordi indirekte ELISA ofte er for lite sensitiv.

**Som en sammenfatning kan følgende diagnostiske kriterier betraktes som pålitelige ved CNS-infeksjoner:**

- påvisning av virus/virusantigen/virusnukleinsyre
- patologisk ratioverdi for spesifikke antistoffer
- signifikant stigning av spesifikke IgG antistoffer i spinalvæske
- påvisning av spesifikt IgM i spinalvæske

Ved akutt encefalitt vil påvisning av nukleinsyre ved PCR være første valg innen 4 uker etter sykdomsdebut, mens antistoffundersøkelser kan utgjøre et supplement. Imidlertid kan jeg vise til enkelte kasus hvor diagnosen gjennomgått herpesencefalitt ble stilt på grunnlag av en patologisk ratio først etter flere måneder eller år, fordi påvisning av nukleinsyre ikke lenger var mulig.

Konsentrasjonen av cytokiner og andre markører på immunologisk aktivitet i spinalvæske har også blitt evaluert hos pasienter med HSE, f.eks. interleukin-6, interferon- $\gamma$ , tumor nekrose faktor- $\alpha$ , neopterin,  $\beta$ -2-mikroglobulin, samt flere andre molekyler.  $\alpha$ -interferon er grundig evaluert som markør for en virusinfeksjon og er til stede i spinalvæsken i ca. 95 % av alle HSE-tilfeller. Høyt nivå av spinalvæske-neopterin kan persistere i 15 år etter gjennomgått HSE.

## Morbili og parotitt

Selv om disse infeksjonene for tiden er meget sjeldne i vårt land, må vi være klar over at innvandrere kan være i inkubasjonsfasen når de kommer til Norge. De siste 2-3 årene har vi praktisk talt bare hatt importerte tilfeller av meslinger, mens parotitt fortsatt kan forekomme sporadisk. Laboratoriediagnostikk ved disse to MMR-infeksjonene er først og fremst antistoffpåvisning, mens påvisning av nukleinsyre gjøres ved enkelte laboratorier i utlandet. Ved akutt infeksjon kan IgM- og IgG- antistoffer påvises både i serum og spinalvæske. Ved **parotitt** er spredning til spinalvæsken beskrevet hos >50 %. Virus kan påvises ved dyrking av prøve tatt fra parotis-utførselsgangen, ev. også i vanlig halspenseprøve. Postinfeksiøs encefalitt ved **meslinger** er immunologisk betinget slik at virus ikke kan påvises i spinalvæske eller hjernevev. Ved senkomplikasjonen SSPE persisterer virus i hjernevev og kan ved spesielle metoder dyrkes derfra. SSPE-pasienter har høyt IgM - og IgG-antistofftiter mot meslingevirus både i serum og spinalvæske slik at ratio er anbefalte diagnostiske metode.

## REFERANSER

1. Aurelius E, Forsgren M, Skoog E, Sköldenberg B. Serodiagnosis of herpes simplex encephalitis by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1989; 3: 249-58.
2. Aurelius E. Herpes simplex encephalitis. Early diagnosis and immune activation in the acute stage and during long-term follow-up. *Scand J Infect Dis* 1993; 44 (suppl 89): 8-62.
3. Bruu A-L. Virologisk diagnostikk ved akutt encefalitt. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1996; 116: 721-5.
4. Cinque P et al. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. *J Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 339-45.
5. Conrad AJ. Quantitation of intrathecal measles virus IgG antibody synthesis rate: Subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1994; 54: 99-108.
6. Nicoll S, Brass A, Cubie HA. Detection of herpes viruses in clinical samples using real-time PCR. *J Virol Meth* 2001; 96: 25-31.
7. Sköldenberg B, Kalmo K, Carlström A, Forsgren M, Halonen P. Herpes simplex encephalitis: A serological follow-up study. *Acta Neurol Scandinav* 1981; 63: 273-85.

## Prøvetaking ved mistanke om encefalitt/meningoencefalitt

Det er aktuelt å undersøke

- spinalvæske. Prøven bør tas tidligst mulig i sykdomsforløpet, sendes nedkjølt og uten tilsetning av transportmedium. Minst 200 µl bør sendes, slik at man har mulighet for å gjøre analyser med henblikk på flere virus.
- serumprøve, tatt samtidig med spinalvæsken
- feces, ev. halsprøve ved mistanke om enterovirusinfeksjon.
- prøve fra parotis-utførselsgangen, ev. halsprøve i tillegg til spinalvæske ved parotitt.

**TABELL 1. AKTUELLE ANALYSER**

Virus	PCR	dyrking	ratio	IgM serum	IgM sp. væske	IgG sp. væske
HSV	++		++	+	++	++
VZV	++		++	+	+	++
parotittvirus	-	+ (fra parotis-utførselsgangen, ev. halsprøve)	-	++	+	+
morbillivirus	-		++*	++	+*	++*

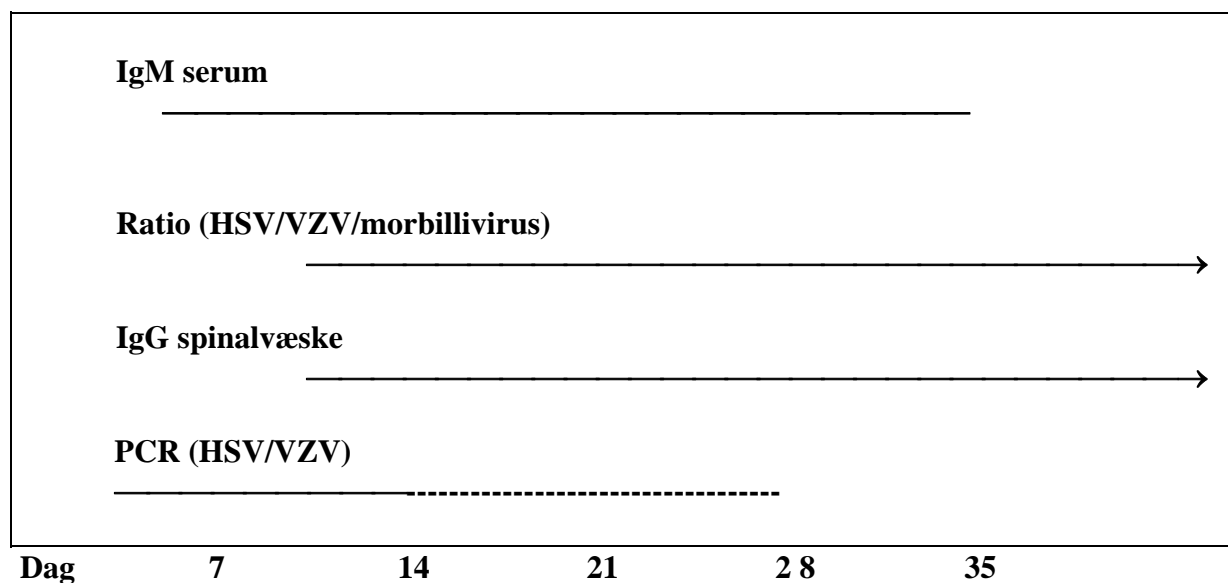
++ = anbefalt analyse

+ = aktuell analyse i noen tilfeller

- = analyse ikke anbefalt eller metode ikke etablert i Norge

\* = mest aktuelt ved SSPE

**TABELL 2. AKTUELLE UNDERSØKELSER RELATERT TIL SYKDOMSFORLØPET**



# ENTEROVIRUS; MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED CNS-INFEKSJONER

*Mona Holberg-Petersen, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål universitetssykehus*

Enterovirus hører til Picornavirusfamilien som er små virus med RNA-genom. De viktigste humane enterovirus er: Poliovirus type 1, 2, og 3, coxsackievirus gruppe A, type 1-24 (unntatt 23), coxsackievirus gruppe B, type 1-6 og echovirus type 1-33 (unntatt 8, 10 og 28 i tillegg til 22 og 23 som nå er klassifisert i en ny genus, Parechovirus). Nylig identifiserte serotyper er klassifisert som enterovirus type 68–71.

Enterovirus vokser primært i lymfoid vev i mucosa i gastrointestinaltraktus. Infeksjonen kan være asymptomatisk eller være ledsaget av ubetydelige gastrointestinale symptomer. Symptomene kommer etter at virus har spredt seg til andre organer der de kan forårsake til dels alvorlige sykdommer, f. eks. paralytisk poliomyelitt, aseptisk meningitt og myokarditt. Enterovirus er de viktigste etiologiske agens for virusmeningitt hos oss. Asymptomatiske infeksjoner og mildere sykdommer med fokus i de respektive organer er imidlertid hyppigst. I Norge opptrer enterovirusinfeksjoner oftest om sensommeren og høsten. Gjennomgått infeksjon gir varig typespesifikk immunitet.

## **Påvisning av enterovirus.**

### ***Cellekultur:***

Dyrking i cellekultur har vært gullstandard for påvisning av enterovirus. Det finnes ingen enkelt cellelinje som er permissiv for alle humane enterovirus. I cellekultur kan enterovirus vokse med rundcelledegenerasjon. Cytopatogen effekt forårsaket av de ulike enterovirus er morfologisk lik. Dette kan ses i løpet av 2-3 dager, men kan ta lenger tid. Alle coxsackie gruppe B typene multipliserer i cellekulturer, f. eks. apenyreceller, med uttalt cytopatogen effekt. Flertallet av coxsackie gruppe A typene vokser dårlig, eller ikke i det hele tatt, i cellekultur. De kan dyrkes og isoleres i mus. Echovirus vokser stort sett bare i apenyreceller *in vitro*. Enterovirus type 68–71 kan også dyrkes i apenyreceller. Endelig identifikasjon som krever nøytralisasjonstester er arbeidskrevende og kan ta flere uker. Enkelte enterovirus lar seg ikke type, men for klinisk oppfølging av rutinetilfeller er det sjelden viktig å identifisere non-polio enterovirustyper. Jo tidligere spinalvæskeprøven tas i sykdomsforløpet, jo større er sannsynligheten for å isolere virus. Dyrking av enterovirus er dog oftere positiv fra fæces. Positivt funn i fæces fra en pasient med meningitt/encefalittsymptomer kan ha diagnostisk betydning, men kan også bare være et tilfeldig funn.

### ***Serologi:***

Nøytraliserende antistoffer i serum produseres tidlig under infeksjonsforløpet. De er imidlertid typespesifikke og ofte vanskelige å påvise. Det produseres også komplementbindende antistoffer som i en viss grad kryssreagerer mellom de forskjellige typer. Det er nødvendig å påvise titerstigning i to serumprøver tatt med 10–14 dagers mellomrom. Serologisk diagnose er ikke mye brukt og nytten er omdiskutert.

### ***Genteknologiske metoder:***

I løpet av de siste 10 år har genteknologiske metoder, i første rekke revers transkripsjon polymerase chain reaction (RT-PCR) fått økende anvendelse. Flere studier har vist at RT-PCR er mer sensitiv enn virusdyrking ved undersøkelse av spinalvæske (1,2,3,4). RT-PCR kan påvise viralt RNA fra lite prøvemateriale (minst 50µl spinalvæske), det er mulig å påvise enterovirus som ikke vokser i cellekultur, og sammenlignet med dyrking er det en



rask metode (svar i løpet av 1 – 1,5 dager). Ved mistanke om infeksjon i CNS er i første rekke spinalvæske aktuelt prøvemateriale. Positivt funn i fæces og evt. halsprøve kan imidlertid ha diagnostisk betydning, selv om funn her ikke sikkert påviser årsakssammenheng.

RNA er lite stabilt og brytes lett ned av RNaser som finnes overalt. Det er derfor viktig at prøven bringes raskt til laboratoriet, der den oppbevares ved  $-70^{\circ}\text{C}$ , at gjentatt fryse/tining av prøven unngås og at alt arbeid med prøven utføres med RNase-frie reagenser og engangsutstyr. Flere stoffer er kjent å hemme PCR, bl a hemoglobin og høy salt- og/eller proteinkonsentrasjon. For å kunne påvise eventuelle falske negative resultat bør en internkontroll tilsettes hver prøve (5). En optimal isolerings/rensem metode for RNA er viktig for å unngå hemning. På grunn av metodens høye sensitivitet er det også fare for falske positive resultater som følge av kontaminasjon. Derfor bør strenge forholdsregler følges ved arbeid med PCR, og det er viktig å ha med negative prøvekontroller innimellom pasientprøvene (6). De ulike in house metodene som benyttes er ikke skikkelig standardisert, og en multi-senterstudie i regi av European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis av forskjellige RT-PCR tester viser at det er viktig å delta i eksterne kvalitetsstudier (7).

For å kunne påvise alle enterovirus, velger man primere fra det konserverte 5' ikke-kodende område til RT-PCR (1,2). Med denne strategien er det imidlertid ikke mulig å påvise serotypen. Det kan eventuelt gjøres ved PCR og sekvensering av et annet område av genomet, VP1, VP2 eller VP4 (5,8,9).

Det finnes nå automatisert utstyr for nukleinsyresekstraksjon og nylig er påvisning av enterovirus med realtids PCR beskrevet (10,11). Dette krever mindre manuelt arbeid, og det mulig å få svar i løpet av 4 timer.

En annen nukleinsyresekvensbasert amplifikasjonstest (NASBA), med sammenlignbar sensitivitet som RT-PCR, er også beskrevet for påvisning av enterovirus RNA i spinalvæske (12,13). I den ene studien ble et kommersielt kit, NucliSens Basic kit, fra Organon Teknika benyttet (12). To andre kommersielt tilgjengelige amplifikasjonstester, Light Diagnostics OligoDetect test (Chemicon) og Enterovirus Consensus test (Argene) er blitt evaluert av Buck GE et al (4). Det finnes også et kommersielt kit, DiaSorin DNA enzyme immunoassay, for påvisning av enterovirus RT-PCR produkt (14).

## Referanser:

1. Glimåker M et al: Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis* 25:547-557, 1993.
2. Rotbart HA: Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J Pediatr* 117:85-89, 1990.
3. Sawyer MH et al: Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 13:177-182, 1994.
4. Buck GE et al: Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-mix) with RT-PCR and conventional cell cultures for the diagnosis of enterovirus meningitis. *J Clin Virol* 25:S13-S18, 2002.
5. Arola A et al: Identification of enterovirus in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J Clin Microbiol* 34:313-318, 1996.
6. Kwok S & Higuchi R: Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238, 1989.
7. Muir P et al: Multicenter quality assessment of PCR methods for detection of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 37:1409-1414, 1999.

8. Oberste MS et al: Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37:1288-1293, 1999.
9. Ishiko H et al: Molecular diagnosis of human enterovirus by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* 185:744-754, 2002.
10. Verstrepen WA et al: Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 39:4093-4096, 2001.
11. Watkins-Riedel T et al: Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42:99-105, 2002.
12. Fox JD et al: Development and evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) for diagnosis of enterovirus infections using the NucliSens Basic Kit. *J Clin Virol* 24:117-130, 2002.
13. Heim A & Schumann J: Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. *J Virol Met* 103:101-107, 2002.
14. Young PP et al: Evaluation of a commercial DNA enzyme immunoassay for detection of enterovirus reverse transcription-PCR products amplified from cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 38:4260-4261, 2000.

## NYTTEN AV CELLEKULTUR I DIAGNOSEN AV ENTEROVIRUSMENINGITT OG FOR OVERVÅKINGEN AV POLIOVIRUS.

*Ivar Ørstavik, Nasjonalt folkehelseinstitutt*

### *Enterovirus og cellekultur*

Cellekulturer var i mange tiår nærmest enerådende for diagnosen av enterovirusmeningitt, men har i de siste 8-10 år i økende grad blitt erstattet av RT-PCR.

Enterovirus er en stor gruppe virus, og svært mange av serotyper er aktuelle som årsak til CNS-sykdom. Aktuelle cellekulturer varierer i sin mottagelighet for forskjellige enterovirus, og for rimelig sensitiv teknikk er det derfor nødvendig å anvende flere forskjellige cellekulturer.

Nedenfor er gjengitt noen typer cellekulturers egenskaper (1,2)

Celletyper	Eksempler	Mottagelighet
Primær	Apenyre	Enterovirus (mange)
	Human embryo nyre	Enterovirus (mange)
Diploid	Human embryo fibroblast	Vesentlig polio- og echovirus
Kontinuerlig	BGM (Buffalo green monkey)	Coxsackie B virus, poliovirus. Echovirus (varierer)
	RD (humant rhabdomyosarkom)	Echovirus(?) Enkelte Coxsackie A virus. Ikke Coxsackie Bvirus
	LLC-MK2/Vero	Som BGM?
	CaCo (human ca. coli)	
Genmanipulert (kontinuerlig)	BGM celler som uttrykker humant DAF på overflaten	DAF-reseptor: Echovirus 3,6,7,11-13, 19,21,25,29,30,33, Coxsackievirus B1, B3, B5, A21, enterovirus 70 o.a.
	L20B Musecellelinje som uttrykker human poliovirusreseptor på overflaten	Poliovirus

I de senere årene er genteknologien brukt til å modifisere celler for å øke deres sensitivitet for enterovirus mer generelt (GMK-celler genetisk modifisert med en reseptor felles for mange enterovirus) eller selektiv modifikasjon av musceller med poliovirusreseptor (L20B celler) (3,4).

Det vanligste synes fortsatt å være bruk av en kombinasjon av 2 eller 3 cellekulturer: en eller to kontinuerlige cellelinjer og diploide fibroblaster. Primærkulturer, selv om de trolig er meget sensitive, brukes sjelden, bl.a. pga. pris og etiske forhold.

Konvensjonell teknikk med dyrkning i rør eller i flerbrønnsplater anbefales. Såkalt ”rapid shell vial technique” hvor virus dyrkes på objektglass i flatbunnede rør etter forutgående sentrifugering og farging av cellene med enteroviruspefikke antistoff, angis å ha lavere sensitivitet(5).

*Når kan vi ha nytte av cellekultur i det diagnostiske arbeidet?*

Som nevnt er RT-PCR av spinalvæske i akuttfasen førstevalget i dag for diagnosen av enterovirusmeningitt. Her er cellekultur dyrking klart mindre sensitiv og tar dessuten lengre tid(6).

Ved enterovirusmeningitt utskilles virus vanligvis i feces i lengre tid og i større mengder enn det forekommer i spinalvæske. Det er færre studier som sammenligner sensitivitet av RT-PCR og cellekultur dyrking for påvisning av enterovirus i feces og noe varierende angivelser i litteraturen om resultater. Cellekultur kunne derfor vurderes som et supplement til RT-PCR for diagnostikk her.

Cellekultur dyrking er nødvendig for serologisk typebestemmelse av virus. Selv om det er beskrevet, kan det være vanskelig å produsere sekvenser direkte fra klinisk materiale ved hjelp av RT-PCR som kan nyttes til å bestemme enterovirus genotype. Cellekultur er derfor ofte nødvendig hvis det er ønskelig/nødvendig å kjenne geno- eller serotype(5). Vi kan si at cellekultur i dag i første rekke er nyttig for den epidemiologiske overvåkingen av enterovirusinfeksjoner i CNS.

*Poliovirusovervåking*

I 1988 startet Verdens helseorganisasjons program for en poliofri verden. Det ble utviklet et virologisk overvåkingssystem for vilt poliovirus for å diagnostisere forekomsten av infeksjon i endemiske områder og gi pålitelig dokumentasjon på at et land eller en region er fritt for sirkulerende vilt virus. Det ble etablert et system av WHO-akkrediterte nasjonale laboratorier for dyrking av poliovirus fra feces i cellekultur. WHO anbefaler å overvåke alle tilfeller av akutte, slappe pareser hos barn <15 år og utvalgte grupper av befolkningen. Etter at Norge, sammen med andre non-endemiske land i Europa ble bedt om å delta, startet den virologiske overvåkingen her 1. november 1998 (7).

Med hjemmel i smittevernloven ble det oppfordret til å ta to fecesprøver i løpet av de første 14 dager etter sykdomsdebut fra AFP-pasienter < 15 år og fra pasienter med akutt serøs meningitt i alle aldre. Fra 1. januar 2000 blir prøver fra AFP-pasienter sendt direkte til Folkehelseinstituttet, mens feces fra pasienter med serøse meningitter blir sendt via regionslaboratoriene, som blir bedt om å sende feces videre til Folkehelseinstituttet uavhengig av om de selv også utfører undersøkelser av denne prøven (8, 9).

Fæcesprøvene blir behandlet etter WHO-protokoll og ved Folkehelsa sådd ut i BGM, humane embryonale fibroblaster, RD og L20 B celler. Selv om bruk av L20 B celler alene, etter blindpassasje, skulle være tilstrekkelig til å kunne utelukke poliovirus, anvendes flere celler for å kunne påvise andre enterovirus.

Som kjent ble WHO's Europaregion sertifisert som fri for endemisk poliovirus i juni 2002. Likevel har Norge akseptert WHO's henstilling om å fortsette overvåkingen til hele verden er erklært poliofri, etter planen i 2005 eller kort etter (10).

Det stilles krav til forskjellige sider av undersøkelsen, hvor avvik reduserer den score som det enkelte land som deltar får. De nevnes her fordi det angir forhold som bidrar til kvaliteten av dyrkningsundersøkelse av enterovirus:

To prøver med minst 24 timers intervall. Undersøkelser har vist at to prøver øker andelen positive, men så lite at det nå legges mindre vekt på dette enn tidligere, forutsatt at den ene prøven har god score.

Begge prøver tatt innen 14 dager etter sykdomsdebut. En omfattende litteraturstudie viste at hos over 70 % av poliopasienter ble virus påvist i feces i denne periode. Bidrar til utsagnskraft for et negativt resultat (11).

Kjølet lagring og transport. Is eller fryste kjøleelementer ved fremkomst til laboratoriet. Det har ikke vært vanlig å kreve hos oss, men angis som viktig også i land som har klima som kan minne om vårt (12).

Rask transport. Tre døgn maksimum uten “anmerkning” på dette punkt.

Bruken av cellekulturer for poliovirusovervåking ble etablert lenge før RT-PCR kom i praktisk bruk. Dertil er teknikkene relativt enkle og billige og det har vist seg at de fleste land kan drive et akkreditert laboratorium, slik at en kan få et verdensomspennende nett av laboratorier med samme teknikk. Metoden har fungert bra over lengre tid, og jeg tror ikke den blir forlatt til fordel for genteknologi i WHO-systemet med det første.

Nedenfor er gjengitt noen av resultatene så langt fra **poliovirusovervåking av serøse meningitter i Norge**. Aktive klinikere og medisinske mikrobiologer på fylkes- og regionsplan bidro til tallene som presenteres nedenfor:

Fordelingen av antall fecesprøver pr. pasient

	2 fecesprøver	1 fecesprøve	0 fecesprøve
01.10.98-31.12.00	25 (7%)	121 (36%)	192 (52%)
01.01.01-31.12.01*	21 (11%)	76 (40%)	91 (49%)

\* Foreløpige tall for år 2001

RT-PCR fått en økende rolle i diagnosen av serøs meningitt, og dette kan ha bidratt til at andelen meningittpasienter uten virologisk overvåking av feces for poliovirus er relativt stor. På den annen side viser tallene fra tabellen over at andelen faktisk har øket!

Sammenligning av PCR (sp.v.) og dyrking i cellekulturer (feces) hos pasienter med serøs meningitt i 2001 hvor begge undersøkelser var gjort (foreløpige tall):

PCR/cellek.	+/+	+/-	-/+	-/-
Antall pasienter	29	4	2	6

Noen resultater av virologiske undersøkelser av serøse meningitter/meningoencefalitter 2001 (foreløpige tall):

Cellekulutdyrk fra 1 eller 2 fecesprøver	PCR av spinalvæske hvor ingen fecesprøve
--	--

Echovirus type 6x35, type 9x1, type 11 x1, type 13 x5, type 25 x1, type 30 x3 Coxsackievirus B1 Enterovirus RNA positiv x4 Virus dyrkning og PCR negativ x35	Enterovirus RNA positiv x31 Herpesvirus (HSV1 el. 2, VZV, EBV) x38 Negative x10 Ikke undersøkt x8
---	--

## Min konklusjon

RT-PCR i prøve av spinalvæske fra akutfasen av sykdom anbefales for diagnosen av enterovirusmeningitt. Det gir raskt diagnosen som er ytterligere sikret ved påvisning av agens i CNS.

For overvåking av poliovirus er det naturlig å undersøke feces hvor virusutskillelsen er langvarig, og her er dyrkning i cellekultur etter internasjonalt godkjente prosedyrer tilstrekkelig. Virusdyrkning synes foreløpig også nødvendig for serotypisk og ofte også for genotypisk karakterisering av enterovirus.

## Litteratur

1. Kapsenberg JG: Picornaviridae, i Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice, Lennette EH, Halonen P, Murphy FA, Springer-Verlag, New York, 1989, s. 692
2. Pallansch MA & Roos RP: Enteroviruses, i Fields Virology, 4. utg. Lippincott Williams & Wolkins, Philadelphia, 2001, s. 723.
3. Huang YT et al: Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. J Clin Microbiol 40:366-371, 2002
4. Wood DJ & Hull B: L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. J Med Virol 58:188-192, 1999.
5. Van Doornum GJJ & De Jong JC: Rapid shell vial technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. J Clin Microbiol 36:2865-2868, 1998
6. Stellrecht KA et al: The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. J Clin Virol 25:S19-S26, 2002
7. Hareide B & Ørstavik I: Virologisk overvåking av poliovirus i feces. Tidsskr Nor Lægeforen 118:4427, 1998.
8. Statens institutt for folkehelse: Brev av 1. juni 2002 til regionsykehusenes medisinsk mikrobiologiske avdelinger med referat fra Møte på Folkehelsa 4. april 2001 med virologer fra de medisinsk mikrobiologiske avdelinger ved regionsykehus.
9. Ørstavik I: Intensivert klinisk/virologisk overvåking av barn < 15 år med akutte, slappe pareser. MSIS-rapport 20/2001.

10. Helsedepartementet: Brev av 22. mai 2002 til WHO's Europakontor vedlagt "The Norwegian Plan of Action to Sustain Poliomyelitis-free Status (dated May 23, 2002).
11. Alexander JP, Gary Jr. HE, Pallansch MA: Duration of poliovirus excretion and its implication for acute flaccid paralysis surveillance: A review of the literature. *J Infect Dis* 175(Suppl 1):S176-182, 1997.
12. Storch GA: Diagnostic virology, i *Fields Virology*, 4. utg. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, s. 493.

## SKOGFLÅTTBÅREN ENCEFALITT (TBE), LABORATORIEDIAGNOSTIKK.

*Tone Skarpaas, Mikrobiologisk avdeling, Vest-Agder sykehus HF*

**Innledning.** Skogflåttbåren encefalitt (TBE) forårsakes av et flavivirus kalt skogflått-encefalittvirus (tick-borne encephalitis virus – TBEV). Smågnagere er viktigste reservoar. I Norden er flåtten *Ixodes ricinus* vektor. I Skandinavia er TBE endemisk i kystområdene rundt Østersjøen (1-3). De første tilfeller av pasienter med TBE, som er smittet i Norge, er nylig beskrevet (4, 5). Det er holdepunkter for at det skjer endringer som fører til en nordlig forskyvning av grensen for etablering av TBEV foci i Europa (6).

**Virus.** TBEV er et RNA virus med ca. 11000 nukleotider. Membranen inneholder E - og M protein. E protein er et glykoprotein som induserer produksjon av nøytraliserende antistoff. Nukleotidsekvensen som koder for E protein benyttes til viruskarakterisering. Tre undertyper er isolert: subtype 1, som forårsaker sentraleuropeisk encefalitt, subtype 2, som er etiologisk agens ved Russian spring-summer encephalitis og subtype 3, Sibirsk subtype (2, 3, 7, 8, 9). I membranproteinet hos de europeiske stammer er det høy grad av homologi. Stammevariasjon innenfor visse geografiske områder kan imidlertid være mer kompleks enn tidligere antatt (10, 11).

**Laboratoriefunn.** I initialfase kan trombocytopeni og granulocytopeni påvises. Ved meningoencefalitt: I blod påvises leukocytose (77 %), forhøyet SR (87 %) og forhøyet CRP (84 %). I spinalvæske (CSF) påvises pleocytose  $< 100/\text{mm}^3$ , først granulocytose, så lymfocytose, og stigende protein. Ved MR kan patologi påvises hos 11 % (3).

**Antistoffpåvisning i serum** danner basis i TBE diagnostikken. IgM-, IgG- og IgA-antistoff kan påvises i serum og spinalvæske. EIA er den mest benyttede metode. Kommersielle IgM- og IgG-ELISA kit er tilgjengelig. Til IgM påvisning er det viktig å bruke  $\mu$ -capture teknikk for å unngå uspesifikke resultater.

De første dager etter debut av encefalittsymptomer påvises IgM i serum hos nesten alle pasienter ( $>96$  %). Vanligvis påvises samtidig IgG. IgM nivået er høyest etter 4-6 uker for deretter å avta relativt raskt. IgM kan hos enkelte personer persistere i inntil ett år etter infeksjon. IgG produksjonen når høyt nivå etter 6-10 uker. IgG kan detekteres i mange år ( $>30$ ) etter infeksjon. Dersom det er klinisk mistanke om TBE og TBEV-IgM påvises i serum, må det tas flere prøver slik at antistoffprofilen (IgM/IgG) kan følges. For sikker diagnose er konfirmasjon nødvendig (se senere) (2, 3, 7, 8, 12).

Hemagglutinasjonshemming (HAI), komplementbindingsreaksjon (KBR) og immunfluorescens (IF) har lav sensitivitet og spesifisitet og benyttes ikke lenger i rutinediagnostikk.

**Spinalvæske.** Undersøkelse er indisert for å vurdere CNS affeksjon (celler og protein) og som differensialdiagnostisk undersøkelse (først og fremst herpes simplex virus og enterovirus). TBEV-IgM og -IgG undersøkes i spinalvæske ved påvist IgM i serum. Dersom TBE-antistoff påvises i CSF, bør undersøkelse for svikt i blod/hjernebarriere utføres. Spesifikke TBE-antistoff kan mangle i spinalvæske i tidlige fase.

Kommersielle ELISA-IgG tester har sensitivitet 73–99 % og spesifisitet 14–81 % (13). Den lave spesifisiteten skyldes mulighet for krysreaksjon med andre flavivirus (12–16). I praksis



er kryssreaksjon aktuelt ved vaksinasjon (TBE, gul feber, japansk encefalitt) og nylig gjennomgått eller aktuell infeksjon (spesielt denguefeber) etter reise (2).

**Konfirmasjon:** Når TBEV-IgM og -IgG er påvist i serum og det er usikkerhet omkring diagnosen, bør resultatet konfirmeres med nøytralisasjonstest (NT). Immunoblot (WB) kan også benyttes som konfirmasjonstest. Det er viktig å få konfirmert resultatet når pasienten er smittet i lavprevalensområde eller i et område der sykdommen er ukjent (12, 16).

**Aviditetsundersøkelse** for TBE-IgG (urea denaturerings metode) kan skille primærinfeksjon og tidligere gjennomgått infeksjon. Dette kan være aktuelt ved mangel på IgM-respons ved primærinfeksjon og ved persisterende IgM (17). Undersøkelsen er mest aktuell i endemiske strøk.

**Agenspåvisning.** TBEV kan påvises i blod og CSF, evt. i biopsi i tidlig IgM-negativ fase. Når nøytraliserende antistoff påvises, kan infeksjøst virus vanligvis ikke påvises i blod eller CSF. RT-PCR er vanligste metode til påvisning i pasientprøver og i flått (2, 3, 8, 18). (Elektronmikroskopi kan utføres).

Dersom det er ønskelig å isolere virus for karakterisering og typing, kan dyrkning i cellekultur og poding på mus benyttes. Ved dyrkning kan for eksempel kyllingembryo cellekultur benyttes. Virus gir ikke cytopatogen effekt i slik kultur, men vekst detekteres ved økt interferonproduksjon eller ved IF. For identifikasjon av subtype i positiv cellekultur benyttes NT, HAI eller IF. For å skille mellom subtyper av TBEV kan oligopeptid analyse utføres (3, 9).

Agenspåvisning er ikke rutinediagnostikk. Isolasjon av virus fra personer smittet i Norge eller fra flått vil være av stor betydning for å verifisere virusets tilstedeværelse i landet.

TBEV er ikke påvist i Norge, men virusets nære slektning louping ill-virus er isolert. Louping ill-virus forårsaker sykdom primært hos sau. Sykdommen er beskrevet hos sauebesetninger langs kysten av Sør-Vest Norge (19, 20). De fleste tilfeller av rapportert sykdom med louping ill-virus hos mennesket er resultat av laboratorieinfeksjon. Enkelte tilfeller er beskrevet hos personer med nærkontakt med sau. Det er lite holdepunkt for at louping ill er overført til mennesket ved flåttbitt (21). Ved diagnostikk av human sykdom, vil kryssreaksjon med dette virus neppe ha betydning. Det er uklart om kryssreaksjon vil være et usikkerhetsmoment ved seroepidemiologiske studier.

**Konklusjon:** TBEV-antistoff bør undersøkes ved klinisk mistanke om meningoencefalitt hos personer som i tidsrommet april til november har vært i områder der det er risiko for å få flåttbårne infeksjoner. TBEV-IgM og -IgG ELISA i serum utføres. Signifikant funn av antistoff konfirmeres med nøytralisasjonstest. Spinalvæske undersøkes for infeksjonsparametre og differensialdiagnostisk. Spinalvæsken testes for TBEV-antistoff ved funn av TBEV-IgM i serum. Opplysninger om reise siste måned før sykdomsdebut og om nærkontakt med sau er viktig for å vurdere mulighet for infeksjon med andre flavivirus. Vaksinasjonsstatus for flavivirus bør kartlegges.

## Litteratur

1. Gustafson R. Epidemiological studies on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Scand J Infect Dis 1994; (suppl 92).
2. Terapienbefaling: Behandling og profylakse av flåttbårne infeksjoner. Nytt om legemidler 1999; 22 (suppl 1).
3. Oschmann P, Kraiczy P, Halperin J, Brade V. Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. UNI-MED Verlag AG, 1999. ISBN 3-89599-449-9.
4. Ormaasen V, Brantsæter AB, Moen EW. Flåttbåren encefalitt i Norge. Tidsskr Nor Lægeforen, 2001; 121, 807-9.
5. Skarpaas T, Sundøy A, Bruu AL, Vene S, Pedersen J, Eng PG, Csángó PA. Skogflåttencefalitt i Norge. Tidsskr Nor Lægeforen, 2002; 122, 30-2.
6. Randolph SE. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europa. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001; 356: 1045-56.

7. Gubler DJ, Roehrig JT: Arboviruses (Togaviridae and Flaviviridae) In: Mahy BWJ, red. Virology. London: Edward Arnold 1998: 588-96. (Bd.1 i serien: Collier L, Balows A, Sussman M, red. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, 9.utg.).
8. Blessing J. Frühsommer-Meningoenzephalitis(FSME)-Virus. In: Virusdiagnostik, Horstman T (Hrsg.), Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin 1996: 188-200.
9. Ecker M et al. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol* 1999; 80: 179-85.
10. Lundkvist Å et al. Characterization of Tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes. Poster "Current Research in Tick-Borne infections" Kalmar, Sweden, March 2001.
11. Mickiene A et al. Tick-borne encephalitis virus in Lithuania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001 Dec; 20 (12): 886-8.
12. Holzmann H. Pitfalls in modern TBE sero-diagnosis. *Zentralbl Bakteriol* 1999; 289, 548-9.
13. Niedrig M et al. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for detection of TBEV-antibodies. *J Clin Virol* 2001 Feb; 20 (3): 179-82.
14. Dobler G et al. Diagnosis of tick-borne encephalitis: evaluation of sera with borderline titers with the TBE-ELISA. *Infection* 1996 Sep-Oct; 24 (5): 405-6.
15. Dobler G et al. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr* 1997; 147 (19-20) : 463-4.
16. Rieger MA et al. Detection of antibodies against TBE virus by means of Western Blot: Confirmation of a high level of false positive ELISA results in a population with low TBE incidence. *Zentralbl Bakteriol* 1999; 289, 620-7.
17. Gassmann C, Bauer G. Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infection. *J Med Virol* 1997 Mar; 51 (3): 242-51.
18. Puchhammer-Stöckl et al. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* 1995; 4: 321-6.
19. Traavik T, Mehl R, Wiger R. The first tick-borne encephalitis virus isolates from Norway. *Acta path microbiol scand* 1978; Sect B, 86: 253-5.
20. Stuen S, Øvernes G, Baalsrud KJ. Antistoffer mot louping-ill- eller beslektede virus i tre sauebesetninger i Sunnhordland. *Norsk Veterinærtidsskrift* 1996; 108, 6: 412-3.
21. Davidson MM et al. Louping ill in man: a forgotten disease. *J Infect* 1991; 23: 241-9.

## **VIRALE CNS-INFEKSJONER HOS IMMUNSUPPRIMERTE PASIENTER.**

### **Klinisk spektrum, og indikasjon for og nytte av mikrobiologisk diagnostikk.**

*Arvid Bjørneklett, Seksjon for klinisk immunologi og infeksjonssykdommer, Med.avd., Rikshospitalet*

De fleste virale infeksjoner i CNS affiserer primært meningene og gir opphav til relativt mild, såkalt aseptisk meningitt evt. en relativt mild meningoencefalitt. Slike infeksjoner er vanligvis ikke noe stort klinisk problem hos immunkompetente, men kan i blant hos immunsupprimerte pasienter anta et kronisk og mer alvorlig forløp. Akutte eller mer subakutte virale encefalitter er derimot blant de mest alvorlige infeksjoner vi opplever både hos immunkompetente og hos immunkompromitterte. De utgjør alltid en stor utfordring for klinikeren både diagnostisk og terapeutisk. I denne oversikten vil hovedvekten bli lagt på forekomst, klinikk og diagnostikk av virusencefalitt hos grupper av de mest immunsupprimerte pasienter vi har, benmargstransplanterte, organtransplanterte og AIDS-pasienter.

### **Etiologi og prevalens:**

En lang rekke forskjellige virus har vært knyttet til CNS-infeksjoner. Flere av disse opptrer kun i visse områder av verden og har spesielle smitteveier, for eksempel rabies og Japansk B-encefalitt. De virus med CNS-tropi som er mest aktuelle i våre populasjoner av immunsupprimerte pasienter er i all hovedsak virus innen herpesgruppen og såkalt papovavirus. Dette er virus som en større del av befolkningen akvirerer relativt tidlig i livet og som i regel ikke forårsaker alvorlig sykdom før immunforsvaret svikter. Unntaket er herpes simplex virus type 1 (HSV-1) som er årsak til ca 10 % av virusencefalitter hos immunkompetente og som fortsatt har høy mortalitet.

I herpesvirusgruppen er det CMV som er årsak til mest morbiditet blant gravt immunsupprimerte. Encefalitt er imidlertid en uvanlig manifestasjon, iallfall svært sjelden erkjent i live. I en oppfølgingsstudie utført ved Rikshospitalet som omfattet 477 konsekutive nyretransplantasjoner utført fra 1994–97 diagnostiserte man CMV-infeksjon hos 63 %, men ingen med encefalitt. De høyeste prevalensangivelser stammer fra autopsimaterialer med opptil 12 % hos AIDS-pasienter og 2 % hos transplantasjonspasienter. Slike tall må vurderes med varsomhet fordi de helt klart er basert på selekterte grupper av pasienter som har vært ekstremt immunsupprimert under en terminalfase. VZV-encefalitt er trolig enda sjeldnere. Noen sikre tall finnes ikke, heller ikke for HHV-6. HSV (i regel 1) er anslått å forårsake encefalitt hos ca 1 pr. mill. pr år. Det er ikke sikre data som taler for noen høyere forekomst hos immunsupprimerte.

I papovavirus-gruppen er det bare JCV som er vist å kunne forårsake den spesielle form for encefalitt som benevnes progressiv multifokal levkoencefalopati (PML). Det er oppgitt prevalenstall hos HIV-infiserte på 3-5 %, men også dette baseres i vesentlig grad på autopsidata. Hos transplantasjonspasienter er PML en meget sjelden komplikasjon.

### **Patogenese og patologisk/anatomiske forandringer:**

### Cytomegalvirus (CMV):

De fleste infiseres med CMV i barneårene og primærinfeksjonen er da subklinisk. I transplantasjonsgruppen er det en del CMV-negative som får primærinfeksjon via transplantatorgan fra CMV-positiv donor. Dette er forbundet med en del problemer, men uten at det synes å føre til økt forekomst av CNS-infeksjon. CMV-encefalitt opptrer i to distinkt forskjellige former klinisk så vel som patologisk-anatomisk. Begge encefalittformene er rapportert meget sjelden hos transplanterte og er best studert og beskrevet hos AIDS-pasienter. Ved den ene formen, kalt mikroglioma nodulær encefalitt (MGNE), antas virusspredningen til hjernen å skje via blodbanen. Lesjonene oppstår spredt i hjernevevet, mer i grå enn i hvit substans. Det oppstår små mikroglioma-knuter med spredte, ofte få CMV-infiserte celler med inklusjoner. Lesjonene kan finnes i cortex, basalganglier, cerebellum og hjernestamme. Den andre formen kalles ventriculoencefalitt (VE) og her antas virusspredningen å skje via cerebrospinalvæsken. Virusset invaderer ependymalceller som kler ventriklene. Det oppstår nekrose i periventrikulært vev og hjernenerver. Disse pasientene har også ofte samtidig CMV-radiculomyelitt. Både VE og MGNE har vært beskrevet hos en og samme pasient men det synes å forekomme sjelden.

### Varicella-zoster virus (VZV):

VZV persisterer vanligvis i ganglier etter gjennomgått varicella. Den vanligste reaktiveringstilstand er herpes zoster. VZV kan også spres sentralt til ryggmarg og hjerne og forårsake myelitt og encefalitt. Det diskuteres om VZV først og fremst spres til CNS transaxonal eller om spredningen også skjer hematogent. Myelitt kan man iblant se hos immunkompetente, oftest voksne, en til to uker etter varicellautbrudd. Hos immunsupprimerte kan både VZV-myelitt og -encefalitt oppstå under eller etter utbrudd av herpes zoster, men er også sett uten noen klar relasjon til forutgående zoster-utbrudd. En parenkymal invasjon av VZV i ryggmargen fører til intens inflammasjon og vevsnekrose. VZV-encefalitt er først og fremst preget av vaskulopati og disseminerte patologiske forandringer med ischemi og hemorrhagi samt områder med demyelinisering. Lesjonene omfatter både grå og hvit substans og er typisk ofte konsentrert i overgangssonen mellom grå og hvit substans. Dyptsittende lesjoner i hvit substans kan også sees. Det anføres at de demyeliniserende lesjonene man kan få ved VZV-indusert små-kars vaskulopati tenderer til å være mindre enn de man vanligvis ser ved JCV-infeksjon (PML). En form for nekrotiserende ventriculitt med VZV-infeksjon av fortrinnsvis ependymalceller er også beskrevet.

### Humant herpesvirus 6 (HHV-6):

HHV-6 infiserer mer enn 90 % av befolkningen før 2 års alder og persisterer livslangt. Reaktivering av HHV-6 skjer i stor utstrekning hos benmargstransplanterte, organtransplanterte og AIDS-pasienter. Denne reaktiveringen synes alt overveiende å være subklinisk. HHV-6 er imidlertid i noen tilfelle satt i relasjon til fokale lesjoner i CNS. Imidlertid mangler vi mer inngående beskrivelser og analyser av denne tilstanden.

### Papovavirus (JCV):

Ca 80–90 % av den voksne befolkning har antistoffer mot JCV. Det er postulert at JCV spres via luftveiene. Det er vist at viruset persisterer i nyrene hos friske individer og kan skilles ut med urinen. Det er også vist at det kan persistere i B-lymfocytter. Dessuten er det påvist JCV i hjerner fra personer uten PML. Virusset infiserer oligodendrocytter og fører til lysis av disse cellene. Det oppstår initialt mikroskopiske brudd i myelinskjedene som siden flytter sammen til stadig større lesjoner. Virusset infiserer også astrocytter der man kan få morfologiske forandringer som kan mistolkes som tegn på malignitet. I sjeldne tilfeller er det beskrevet unifokale lesjoner, regelen er at man har multifokale demyeliniserte lesjoner.

Predileksjonsområdene i hjernen er parieto-okspitalt, men det er beskrevet affeksjon både av cerebellum, hjernestammen og i meget sjeldne tilfeller også ryggmargen.

### **Klinikk:**

#### CMV-encefalitt av mikroglia nodulær type (MGNE):

Klinikken ved MGNE har vært sammenlignet med HIV-encefalopati. MGNE opptrer imidlertid senere i AIDS-forløpet (lavere CD4-tall) og sykdomsutviklingen er raskere. Det typiske er en nokså akutt innsettende konfusjonstilstand med delir og psykomotorisk agitasjon. Man kan også se apati og tilbaketrekning. Omtrent halvdel har tidlig fokale nevrologiske utfall mens det bare ses hos et fåtall med HIV-encefalopati. Generaliserte krampeanfallet er også beskrevet i noen tilfeller.

#### CMV-ventriculoencefalitt (VE):

VE debuterer i regel med hodepine, evt. oppkast, tiltagende letargi, nystagmus, oftalmoplegi og evt. andre hjernenerveutfall, ataxi og konfusjon. Det er også beskrevet et forløp med en konfabulatorisk komponent som ved Korsakoffs psykose. Tempoet i sykdomsutviklingen kan variere fra mindre enn en uke til flere uker.

#### VZV-encefalitt og myelitt:

Symptomene ved myelitt er paraparese med nivå for sensorisk utfall og sfinkterforstyrrelser. Hos immunkompetente etter varicella er debuten oftest akutt mens den hos immunsupprimerte kan være mer gradvis progredierende. VZV-encefalitt karakteriseres av hodepine, feber, oppkast, mentale forandringer, kramper og fokale nevrologiske utfall. Kramper er rapportert relativt hyppig ved VZV-encefalitt.

#### HHV-6 encefalitt:

Det foreligger få presise kliniske beskrivelser av HHV-6 encefalitt. Både kramper og fokale nevrologiske utfall er rapportert.

#### Progressiv multifokal levkoencefalitt (PML):

Det vanligste debutsymptom ved PML har vært en følelse av svakhet i ekstremitetene, videre kognitiv dysfunksjon, synsforstyrrelser, gangforstyrrelser, taleforstyrrelser og i noen tilfeller hodepine. Under det videre forløp utvikler de fleste pareser, oftest hemiparese, evt. afasi, mens kramper angis å forekomme relativt sjelden, bare hos ca 5 %. Tempoet i sykdomsutviklingen kan variere, men er i regel relativt langsomt over uker og måneder. I tidligere materialer ble det rapportert at mer enn 80 % var døde etter 1 år. Forløpet kan imidlertid også være fluktuerende med spontane remisjoner eller med regress av noen symptomer.

### **Diagnose:**

Når et encefalopatisk sykdomsbilde oppstår hos en immunsupprimert pasient, enten det starter med kramper, fokale nevrologiske utfall eller mer diffuse cerebrale symptomer, så vil ikke klinikken gi oss noen klar indikasjon på hva som er den etiologiske årsak. Det viktigste blir i første omgang å påvise eller utelukke de tilstander vi faktisk har behandlingsalternativer for. Av infeksjoner gjelder det først og fremst bakteriell abscess, listeria- og nocardia-infeksjon. Dernest toxoplasmose og sopp, først og fremst cryptokokkinfeksjon og aspergillus. Samlet er slike CNS-infeksjoner hyppigere blant immunsupprimerte pasienter enn de virale CNS-infeksjonene. Hos transplantasjonspasienter er dessuten CNS-lesjoner forårsaket av medikamenter, først og fremst ciclosporin eller tacrolimus en viktig differensialdiagnose. Hos

benmargstransplanterte kan i tillegg visse cytostatika forårsake cerebrale lesjoner. Andre ikke-infeksiøse årsaker må også overveies som trombose, hemorrhagi og malign sykdom. CNS-lymfom kan være en viktig differensialdiagnose hos en del av disse pasientene, bl.a. AIDS-pasienter og en del benmargstransplanterte.

Hvis det er holdepunkter for nylig gjennomgått eller pågående infeksjon utenfor CNS med et av de aktuelle agens vil det selvsagt være suggestivt. For virale agens gjelder det VZV og CMV.

Første trinn i utredningen vil i regel være radiologisk billedundersøkelse. I noen tilfeller vil cerebral CT med kontrast være avklarende men i langt de fleste situasjoner gir MR mer og bedre informasjon. Slik undersøkelse vil også kunne avsløre evt. kontraindikasjoner mot spinalpunksjon, som hvis det kan gjennomføres ut fra hensyn til koagulasjonsforhold og lignende vil være det neste trinn i utredningen. Endelig må man hvis det påvises fokale lesjoner vurdere om disse kan biopses med stereotaktisk teknikk uten uakseptabel risiko for komplikasjoner.

#### CT/MR funn ved CMV-encefalitt:

Ved MGNE tyder de fleste rapportene på at man sjelden eller aldri påviser de fokale lesjonene verken ved CT eller MR. Både ved MGNE og VE er det hyppigst beskrevne funn perifer og sentral atrofi supratentorielt. Ofte også subtentorielt. Ved VE viser MR typisk svinn av periventrikulær hvit substans og signalforsterkning ("enhancement") rundt ventriklene.

#### MR funn ved VZV-encefalitt og myelitt:

Ved VZV-myelitt viser T2-vektede MR bilder typisk såkalt hyperintense lesjoner ofte med fokalt ødem i medulla. Ved VZV-encefalitt viser MR bilder større og mindre lesjoner med preg som små iskemiske partier eller hemorrhagiske infarkter lokaliser både corticalt, subcorticalt og i hvit substans. Ved periventrikulær affeksjon er det også beskrevet lignende forandringer som ved CMV-VE.

#### MR funn ved HHV-6 encefalitt:

Det er bare få rapporter, men det er beskrevet fokale lesjoner i hvit substans lik de som finnes ved demyeliniserende multippel sclerose bortsett fra at de tenderer til å strekke seg inn i corticale strukturer.

#### CT/MR-funn ved PML:

Cerebral-CT vil ofte vise hypodense områder i hvit substans, i regel uten kontrastoppladning og uten masseeffekt (ekspansjon). MR avslører vanligvis flere og mer utbredte lesjoner, oftest flekkvise og delvis konfluerende på T2-vektede bilder. Svak og helt perifer kontrastoppladning er rapportert i noen få tilfeller (5-10 %).

#### Cerebrospinalvæske (CSV):

Ved CMV-encefalitt av typen MGNE er det oftest beskjedne funn med moderat økt protein, normal glukose, ingen eller bare lett mononukleær celleøkning. Funnene kan også være helt beskjedne ved VE men hos disse pasientene kan man også ha massiv celleøkning med dominans av polymorfne granulocytter, i noen tilfeller også nedsatt glukose. Ved VZV-encefalitt er det oftest rapportert lett mononukleær pleocytose, normalt eller lett øket protein og normal glukose. I noen rapporterte tilfeller har man imidlertid sett høye celletall (>1000) med dominans av granulocytter og dessuten nedsatt glukoseratio. Ved HHV-6 encefalitt er det rapportert lett proteinforhøyelse og lett mononukleær celleøkning. Ved PML

har man funnet normal CVS hos ca halvdelen av pasientene og bare lett proteinøkning og lett mononukleær celleøkning (<20) hos de øvrige.

#### Viruspåvisning:

Mistanke om CMV-encefalitt kan styrkes ved påvisning av økt virusantigen i perifert blod (pp65 eller kvantitativ PCR). PCR i CSV ble tidlig rapportert i materialer av AIDS-pasienter å ha høy (>80 %) sensitivitet og tilsvarende spesifisitet. Senere rapporter har vært mer motstridende og det er mulig at PCR-metoden ikke har så høy sensitivitet hos transplantasjonspasienter. Ved mistanke om VZV-encefalitt anbefales å undersøke CSV både på antistoffer og med PCR. Dyrkning anses derimot for bortkastet. Tall for sensitivitet og spesifisitet foreligger ikke. Ved HHV-6-encefalitt er også PCR i CSV hevdet å være den viktigste undersøkelsen, men heller ikke her er det publisert data for sensitivitet/spesifisitet. Påvisning av HHV-6 DNA i perifert blod kan trolig ikke tillegges noen betydning fordi en stor andel av de aktuelle immunosupprimerte pasientene tester positivt uten at de har symptomgivende sykdom. Ved PML angir nyere undersøkelser en sensitivitet på opp mot 85 % for PCR i CVS med så godt som ingen falske positive.

#### Hjernebiopsi:

Stereotaktisk hjernebiopsi vil bare unntaksvis være aktuelt. Man er avhengig av at radiologisk billedteknikk viser lesjoner som er anatomisk rimelig lett tilgjengelige og at det for øvrig ikke er vesentlige kontraindikasjoner. Den histopatologiske undersøkelse kan være suggestiv for etiologisk agens, men den beste undersøkelsesmetodikk synes å være in situ hybridisering av virus-DNA fordi antigenpåvisning med immunfluorescens kan ha dårlig sensitivitet.

#### Konklusjon:

Virale CNS-infeksjoner hos immunosupprimerte er en stor diagnostisk utfordring. Klinikken er ofte relativt uspesifikk. De radiologiske billedteknikker kan bare gi antydninger om etiologi. PCR for påvisning av aktuelt virus-DNA i spinalvæske er så langt vårt mest presise verktøy, men langt fra perfekt. Spesielt vil et negativt resultat ikke definitivt utelukke noe agens. Rutinen må imidlertid være at man undersøker spinalvæsken med PCR for alle aktuelle virus i herpesgruppen og JC-virus. Stereotaktisk biopsi må overveies i noen tilfeller.

De diagnostiske problemene vil bli illustrert ved gjennomgang av to kasuistikker.

## **CMV, MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED VIRALE CNS-INFEKSJONER.**

*Ellen Holter, Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet*

Cytomegalovirus (CMV), et medlem av subfamilien betaherpesvirinae i familien herpesviridae, gir oftest subklinisk infeksjon hos immunkompetente personer, mens immunkompromitterte personer ofte får sykdom med feber, myalgier, artralgi, hepatitt, gastrointestinale symptomer, pneumoni, retinitt (særlig hos AIDS-pasienter), og symptomer fra sentralnervesystemet (CNS). CNS-manifestasjoner (meningitt, meningoencefalitt, encefalitt, transvers myelitt, polyneuropati og opticusneuritt) forekommer først og fremst hos immunkompromitterte personer, men er også beskrevet i sjeldne tilfeller hos immunkompetente (1,2).

Hvordan virus kommer inn i CNS: Generelt kan virus komme inn i CNS via to hovedveier: ved hematogen spredning og ved spredning via nerver. Ved hematogen spredning kan virusinfiserte aktiverte lymfocytter og makrofager passere blod-hjernebarrièren ("trojansk hest"-hypotese), men virus kan også direkte infisere endotelcellene i blod-hjernebarrièren (3). Ved spredning via nerver infiserer virus først perifere nerveender, trolig via receptormediert endocytose, og transporteres deretter i vesikler retrograd i axonene. CMV kan infisere både monocytter og endotelceller, og hematogen spredning spiller sannsynligvis størst rolle for CMV. Sannsynligvis kan CMV også spres via spinalvæsken (4). CMV-assosiert vevsnekrose i CNS skyldes både direkte cytopatogen effekt i neuroner og astrocytter, og cytokinmediert cytotoxicitet (5). Infeksjon i endotelcellene kan gi oblitererende vaskulitt, som også fører til vevsdestruksjon.

Immunresponsen på virusinfeksjon i CNS: En effektiv immunrespons på virusinfeksjoner i CNS er hindret pga. den relative mangelen på MHC- og adhesjonsmolekylekspresjon i nervevev. Visse cytokiner - og cytokiner produseres i CNS som respons på virusinfeksjoner - kan imidlertid oppregulere ekspresjonen av MHC og adhesjonsmolekyler på overflaten av gliaceller.

Immunresponsen på virusinfeksjoner i CNS begynner i perifert lymfoid vev med påfølgende kryssing av blod-hjernebarrièren og invasjon i CNS av aktiverte og differensierte T- og B-celler. B-celler differensieres til B-hukommelsesceller og til antistoffproduserende plasmaceller som invaderer CNS og gir intratekal antistoffproduksjon.

Kryssingen av blod-hjernebarrièren foregår i flere trinn ved at lymfocytene ved hjelp av reseptorer på sin overflate adhererer til adhesjonsmolekyler på endotelcellenes overflate, og deretter beveger seg gjennom endotelcellene og kommer over i CNS.

Virusspesifikke antistoffer som er produsert intracerebralt hindrer ekstracellulær spredning av virus, bl. a. ved å nøytralisere virus som er frigjort fra infiserte celler.

Både CD4+ og CD8+ T-celler kan isoleres fra spinalvæsken hos pasienter med viral encefalitt/meningoencefalitt, men den relative betydningen av de to cellypene i forsvaret ved CNS-infeksjon er uklar. Dyreforsøk har antydnet at CD4+ T-celler er helt nødvendige for virusutryddelse, mens CD8+-cellene ikke er det. (3).



I viremisk fase er virusnøytralisasjon med spesifikke antistoffer er oftest meget effektivt i forsvaret for å hindre spredning til CNS. Men i noen tilfeller kan virus unngå immunsystemet: både intraaxonal transport og bruk av lymfocytter og makrofager som ”trojanske hester” gjør virus utilgjengelig for både humoralt og cellulært immunforsvar.

#### Aktuelle undersøkelser:

##### CMV DNA PCR i spinalvæske:

Flere studier har vist at påvisning av CMV ved PCR i spinalvæske er sensitivt, spesifikt og med god korrelasjon til aktiv CMV-sykdom i CNS. I en av studiene var PCR-påvisning av CMV i spinalvæske 92 % sensitiv, 94 % spesifikk, positiv prediktiv verdi (PPV) 86 % og negativ prediktiv verdi (NPV) 97 %, for CMV-sykdom i CNS hos AIDS-pasienter (6). Andre studier har imidlertid vist lavere spesifisitet, og at en sensitiv PCR kan påvise ikke-replikerende virus og derfor ikke alltid korrelerer med CNS-sykdom. De fleste studiene er utført på AIDS-pasienter, noen på pasienter i live (7,8), men de fleste på autopsimateriale (9), men tilsvarende funn er gjort på autopsimateriale etter levertransplantasjon (10), og også hos immunkompetente er det funnet positiv CMV PCR i spinalvæske uten klinisk korrelativ (11). Bruk av kvantitativ i stedet for kvalitativ PCR ser ut til bedre PPV (12). Det er også hevdet at kvantitativ PCR kan brukes til monitorering av antiviral terapi (13). Det er angitt at PCR av herpesviridae kan være positiv 2-4 uker etter sykdomsstart (14), men det er få studier vedrørende CMV. Valg av primere kan innvirke på sensitiviteten og spesifisiteten, gen regionen for major immediate early (MIE) exon 4 er angitt å være mer variabel enn genregionene for DNA polymerase og glykoprotein B (gB) (15).

##### CMV ”late gene” transkripter (pp65 mRNA og pp67 mRNA) i blod og spinalvæske:

mRNA-transkripter av sene gener (late genes) som pp65 og pp67 påvises bare når det foregår virusreplikasjon, ikke ved latent infeksjon.

Pp65 mRNA i leukocytter fra perifert blod (PBL) ble påvist hos 80 % av pasientene med aktiv infeksjon, og hos ingen med latent infeksjon (16).

Studier av pp67 mRNA-påvisning i PBL viser sprikende resultater når det gjelder å forutsi CMV-sykdom, fra sensitivitet 50 % og spesifisitet 100 % (17), til sensitivitet 100 % og spesifisitet 72 % (18). Funnet av disse transkripter i blod sier intet om sykdomslokalisasjon. Det er gjort få studier i spinalvæske, men Zhang et al. (8) fant at påvisning av pp67 mRNA med nucleic acid sequence based amplification (NASBA) i spinalvæske hadde PPV 100 % og NPV 82.7 %, sensitivitet 84.6 %, spesifisitet 100 % for CNS-sykdom med CMV.

Det fins kommersielt tilgjengelig kit for CMV pp67 mRNA-påvisning.

##### CMV signalamplifikasjon, blod og spinalvæske:

Hybrid Capture CMV DNA assay utført i blod er vist å ha sensitivitet 88 % og spesifisitet 43 % for å forutsi CMV-sykdom (19). Denne metoden er ikke utprøvd i spinalvæske.

CMV bDNA-us. i spinalvæske er funnet å ha sensitivitet 94 % og spesifisitet 95 % (20). Kommersielt kit er tilgjengelig.

##### CMV pp65-antigen, blod og spinalvæske, kvantitativ CMV PCR blod:

Påvisning av pp65-antigen i blod angis å ha sensitivitet 100 % og spesifisitet 25 % for påvisning av CMV-sykdom (19). Kvantitativ CMV PCR i plasma er et alternativ til pp65 antigenundersøkelse (21). Ved påvisning av pp65 antigen i spinalvæske er det funnet sensitivitet 91 % og spesifisitet 100 % (22). Metoden kan bare brukes hvis det er signifikant pleocytose i spinalvæsken.

Kommersielt kit for kvantitativ CMV PCR er tilgjengelig.

### CMV-dyrkning:

CMV-dyrkning er angitt med forskjellig sensitivitet, fra 18 % (8) til 73 % (20). Sensitiviteten er sannsynligvis også avhengig av hvilket prøvemateriale som undersøkes. Spesifisiteten i alle studier er 100 %.

### CMV-antistoffundersøkelse i blod og spinalvæske:

Antistoffundersøkelse i serum kan være av verdi ved primær CMV-infeksjon, men ikke ved reaktiveringer. Antistoffundersøkelse i spinalvæske kan være et supplement til andre undersøkelser, men resultatene må tolkes med forsiktighet. Ulike forfattere lanserer ulike teorier: Antistoffresponen er assosiert med pågående infeksjon (3). Antistoffrespon kan brukes til monitorering av terapi (23). Antistoffresponen kan være langvarig, uten at det foreligger pågående infeksjon (24).

### Anbefalinger:

Undersøkelser i blod: Kvantitativ CMV PCR i plasma *eller* CMV pp65 antigen-undersøkelse i leukocytter *eller* kvantitativ RNA-DNA-hybridisering i leukocytter *eller* CMV pp67 mRNA-us. i leukocytter. Antistoffundersøkelse er av verdi bare ved primærinfeksjon, og er unødvendig å utføre hos tidligere seropositive personer. Hos immunkompromitterte som er tidligere seronegative og hos immunkompromitterte med ukjent immunstatus anbefales antistoffundersøkelse. Hvis både IgG og IgM kan påvises, og sykehistorien er lengre enn 8-10 dager, er det vanskelig eller umulig å skille mellom primærinfeksjon og reaktivering. Aviditetsundersøkelse kan i så fall være til hjelp. Hos immunkompetente utføres antistoffundersøkelse bare ved spesiell mistanke om CMV-infeksjon.

Undersøkelser i spinalvæske: Hos immunkompromitterte personer anbefales CMV DNA PCR. Kvalitativ PCR suppleres med eller erstattes med kvantitativ. Undersøkelse av CMV pp67 mRNA i spinalvæske i tillegg til DNA PCR kan bedre spesifisiteten, men dette anbefales foreløpig ikke som noen nødvendig undersøkelse. Hos immunkompetente utføres CMV PCR bare ved spesiell mistanke om CMV-infeksjon. Antistoffundersøkelse i spinalvæske anbefales ikke pga. usikkerhet om betydningen av funn.

### Referanser:

1. Karacostas D, Christodoulou C, Drevelengas A, Paschalidou M, Ioannides P, Constantino A, Milonas I. Cytomegalovirus-associated transvers myelitis in a non-immunocompromised patient. *Spinal Cord* 2002 Mar; 40(3):145-9
2. Salamano R, Gervaz E, Manana G, Pena S, Panuncio A, Puppo C, Mesa P, Legnani C, Sabaris A, Azambuja C. Cytomegalovirus encephalitis in an immunocompetent patient: clinical, neuropathological and ultrastructural analysis. *Arq Neuropsiquiatr* 2001 Dec; 59(4):954-8
3. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Volume 1 Virology, Ninth Edition 1998
4. Reinke P, Prosch S, Kern F, et al. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* 1999; 1:157-64
5. Jellinger KA, Setinek U, Drlicek M, et al. Neuropathology and general autopsy findings during the last 15 years. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;213-20
6. Gozlan J, el Amrani M, Baudrimont M, et al. A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS. *AIDS* 1995; 9(3):253-60
7. Stanojevic M, Zerjav S, Jevtovic D, Salemovic D, Ranin R. CMV DNA in blood and CSF of HIV infected patients. *Virus Res* 2002 Apr 23; 85(1):117-22

8. Zhang F, Tetali S, Wang XP, Kaplan MH, Cromme FV, Ginocchio CC. Detection of human cytomegalovirus pp67 late gene transcripts in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus type 1-infected patients by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2000 May; 38(5):1920-5
9. Achim CL, Nagra RM, Wang R, Nelson JA, Wiley CA. Detection of cytomegalovirus in cerebrospinal fluid autopsy specimens from AIDS patients. *J Infect Dis* 1994; 169:23-7
10. Ribalta T, Martinez AJ, Jares P, Muntané J, Miquel R, Claramonte X, Cardesa A. Presence of occult cytomegalovirus infection in the brain after orthotopic liver transplantation. *Virchows Arch.* 2002 Feb; 440(2):166-71
11. Prosch S, Schielke E, Reip A, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) encephalitis in an immunocompetent young person and diagnostic reliability of HCMV DNA PCR using cerebrospinal fluid of nonimmunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3636-40
12. Wildemann B, Haas J, Lynen N, Stingele K, Storch-Hagenlocher B. Diagnosis of cytomegalovirus encephalitis in patients with AIDS by quantitation of cytomegalovirus genomes in cells of cerebrospinal fluid. *Neurology* 1998; 50:693-7
13. Cinque P, Baldanti F, Vago L, et al. Ganciklovir therapy for cytomegalovirus (CMV) infection of the central nervous system in AIDS patients: monitoring by CMV DNA detection in cerebrospinal fluid. *J Inf Dis* 1995; 171:1603-6
14. Weber T, Frye S, Bodemer M, Otto M, Luke W. Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovirol* 1996; 2:175-90
15. Wirgart BZ, Brytting M, Linde A, Wahren B, Grillner L. Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3662-9
16. Meyer T, Reischl U, Wolf H, Schuller C, Arndt R. Identification of active cytomegalovirus infection by analysis of immediate early and late transcripts in peripheral blood cells of immunodeficient patients. *Mol Cell Probes* 1994; 8:261-71
17. Blok M, Goosens VJ, Vanherle S, et al. Diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal-allograft recipients by nucleic acid sequence based amplification. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1341-6
18. Degré M, Kristiansen KI, Rollag H, Holter E, Nordal KP. Detection of human cytomegalovirus (HCMV) pp67-mRNA and pp65 antigenemia in relation to development of clinical HCMV disease in renal transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(5):254-60
19. Rollag H, Sagedal S, Holter E, Ariansen S, Nordal KP. Diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients by a quantitative RNA-DNA hybrid capture assay for cytomegalovirus DNA in leukocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:124-27
20. Flood J, Drew WL, Miner R, et al. Diagnosis of cytomegalovirus (CMV) polyradiculopathy and documentation of in vivo anti-CMV activity in cerebrospinal fluid by using branched DNA signal amplification and antigen assay. *J Infect Dis* 1997; 176:348-52
21. Caliendo AM, St George K, Kao SY, Allega J, Tan BH, LaFontaine R, Bui L, Rinaldo CR. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000 Jun; 38(6):2122-7
22. Rovello MG, Percivalle E, Sarasini A, Baldanti F, Furione M, Gerna G. Diagnosis of human cytomegalovirus infection of the central nervous system by pp65 detection in polymorphonuclear leukocytes of cerebrospinal fluid from AIDS patients. *J Infect Dis* 1994; 170:1275-9

23. Weber T, Beck R, Stark E, Gerhards J, Korn K, Haas J, Luer W, Jahn G. Comparative analysis of intrathecal antibody synthesis and DNA amplification for the diagnosis of cytomegalovirus infection of the central nervous system in AIDS patients. *J Neurol* 1994 Jun; 241(7):407-14
24. Sindic CJM, Monteyne Ph, Laterre EC. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimm* 1994; 54:75-80

# EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV)

## Mikrobiologisk diagnostikk ved virale CNS-infeksjoner

*Svein Arne Nordbø, Avdeling for mikrobiologi, St. Olavs Hospital*

EBV er et B-lymfocytotrop virus som hører til subfamilien gamma-herpesviridae, genus lymfocryptovirus, og gir kun infeksjoner hos mennesker. Det finnes 2 typer: type 1 og type 2 (tidligere kalt type A og type B). Det har ingen klinisk relevans å skille mellom disse typene i diagnostikken.

De fleste primærinfeksjonene er asymptomatiske, men eldre barn/ynge voksne utvikler ofte mononukleose. Affeksjon av CNS er ikke uvanlig i forbindelse med primær EBV-infeksjon. Det er beskrevet en rekke nevrologiske tilstander som serøs meningitt, encefalitt, akutt psykose, koma, transvers myelitt, akutt cerebellart syndrom, polynevritt, opticusnevritt og facialispårese (1, 2). Patogenesen er ikke kjent i detalj, men kan delvis skyldes invasjon av EBV-infiserte B-celler i CNS. Man har i enkelte tilfeller kunnet påvise lymfoide celler med EBV-genom samt antistoffproduserende celler i spinalvæsken (3).

Også ved kroniske og reaktiverte EBV-infeksjoner kan det oppstå nevrologiske symptomer hvor man finner EBV-DNA i spinalvæsken. Spesielt utsatt er pasienter med immunsvikt eller immunsuppresjon (4).

Pasienter med EBV-relaterte lymfomer i CNS vil nesten alltid ha påvisbart EBV-DNA i spinalvæsken. Positiv EBV-PCR i spinalvæske har vist seg å være den mest pålitelige enkeltmarkøren for å diagnostisere denne tilstanden (5, 6).

### Diagnostikk

Diagnostikken av EBV-infeksjoner ble grundig gjennomgått på Strategimøtet om EBV-diagnostikk 2. november 2000 og forutsettes kjent.

Serologisk diagnostikk kan være til hjelp for påvisning av så vel primærinfeksjon som reaktivt/kronisk infeksjon. Intratekale antistoffer produseres sent i forløpet (etter at EBV-DNA forsvinner) og kan være vanskelig å påvise. Serologiske undersøkelser i spinalvæske er derfor av liten diagnostisk verdi (7).

Virus dyrkning er lite aktuelt i praktisk diagnostikk.

Påvisning av EBV-DNA i spinalvæske og blod med PCR eller annen amplifikasjonsteknikk er det beste diagnostiske redskapet, men må tolkes med varsomhet. Det kan av og til påvises EBV-DNA i spinalvæsken sammen med andre agens som også kan gi CNS-symptomer (8). Dette sees hyppigst hos pasienter med annen herpesvirusinfeksjon (spesielt HHV-6 og HSV-1), men kan også påvises hos immunsupprimerte og AIDS-pasienter samt pasienter med lymfomer i CNS (7, 9). Det er en signifikant sammenheng mellom påvist virusmengde og sykdommens alvorlighetsgrad, og kvantitative DNA-analyser er viktig for å vurdere den kliniske relevansen (10, 11). Her synes real-time PCR å være den overlegne metoden i praktisk diagnostikk (12).

Det kan av og til påvises små mengder EBV-DNA i spinalvæsken som ikke synes å ha klinisk betydning (reakivering i forbindelse med annen infeksjon?) (9). I de alvorligste tilfellene kan man av og til påvise en systemisk viremi ved testing av serum/plasma/helblod eller perifere mononukleære celler. Det er derfor grunn til å anbefale testing av samtidig tatt blodprøve (EDTA-blod) til både serologiske undersøkelser og PCR.

Ved CNS-infeksjoner forårsaket av herpesvirus kan PCR i spinalvæske være negativ inntil 2 døgn etter symptomdebut. Falsk negativ PCR kan også forekomme pga inhibitorer i spinalvæsken. Bruk av internkontroll/amplifikasjonskontroll er derfor viktig. Spesifikt DNA kan vanligvis påvises i 2-4 uker, og i enkelte tilfeller over lengre tid (5, 13).

## Referanser

1. Grose C. Primary Epstein-Barr-virus infections in acute neurologic diseases. *N Engl J Med* 1975;292:392-5.
2. Tselis A. Epstein-Barr virus encephalomyelitis diagnosed by polymerase chain reaction: detection of the genome in the CSF. *Neurology* 1997;48:1351-5.
3. Schiff JA. Epstein-Barr virus in cerebrospinal fluid during infectious mononucleosis encephalitis. *Yale J Biol Med* 1982;55:59-63.
4. Portolani M. Epstein-barr virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus infection and central nervous system disorders. *New Microbiol* 1999;22:369-74.
5. Landgren M. Diagnosis of Epstein-Barr virus-induced central nervous system infections by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 1994;35:631-5.
6. Brink NS. Detection of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA in CSF from persons infected with HIV who had neurological disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:191-5.
7. Calvario A. Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002;25 Suppl:71-8.
8. Portolani M. Case of fatal encephalitis by HHV-6 variant A. *J Med Virol* 2001;65:133-7.
9. Aberle SW. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002;25 Suppl:79-85.
10. Puchhammer-Stockl E. Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of herpes simplex virus encephalitis. *J Clin Microbiol* 1993;31:146-8.
11. Domingues RB. Application of competitive PCR to cerebrospinal fluid samples from patients with herpes simplex encephalitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2229-34.
12. Kimura H. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:132-6.
13. Weber T. Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovirol* 1996;2:175-90.

## HUMANT HERPESVIRUS 6 (HHV-6)

### Mikrobiologisk diagnostikk ved virale CNS-infeksjoner

*Svein Arne Nordbø, Avdeling for mikrobiologi, St. Olavs Hospital*

HHV-6 er et T-lymfocytotrop virus som ble oppdaget i 1986. Det hører til subfamilien  $\beta$ -herpesviridae og gir hyppigst infeksjoner i løpet av det første leveåret (>90 % av 3-åringene har antistoffer) (1, 2). Horizontal spredning via infisert spytt synes å være vanligste smittevei (3). Viruset formerer seg primært i CD4+ T-lymfocytter, men det er også påvist i makrofager, dendritiske celler, astrocytter, oligodendrocytter og nevroner (4-7). Den cellulære receptoren for HHV-6 er CD46 som finnes på alle humane celler med kjerne (8).

Det finnes 2 varianter av HHV-6: HHV-6A og HHV-6B. HHV-6B er etiologisk agens ved exanthema subitum (9). HHV-6 har et nevroinvasivt potensiale både hos immunsupprimerte og hos immunkompetente individer (10, 11). HHV-6A synes å ha en mer uttalt nevrootropisme enn HHV-6B (12), men begge variantene kan finnes i spinalvæsken hos pasienter med forskjellige nevrologiske symptomer (13). HHV-6 kan gi kramper med og uten feber (2, 14), og kan gi både meningitter og encefalitter hos barn så vel som voksne (15, 16). Det er beskrevet fatalt forløpende encefalitter også hos pasienter med normalt immunforsvar (17, 18). HHV-6 har vært assosiert med demyeliniserende sykdom hos både immunsupprimerte og immunkompetente pasienter (18, 19). Enkelte studier har også påvist hyppigere forekomst av HHV-6 DNA i spinalvæske hos MS-pasienter enn i kontrollgrupper (20), mens andre studier ikke har kunnet verifisere disse funnene (21).

### Diagnostikk

Serologisk diagnostikk kan være til hjelp for påvisning av primærinfeksjon (serokonversjon/IgM i serum), men ikke ved reaktivert infeksjon. Intratekale antistoffer kan være vanskelig å påvise, og er av liten diagnostisk verdi (22).

Virus dyrkning krever spesialkompetanse og er tidkrevende og er lite benyttet i praktisk diagnostikk.

Påvisning av HHV-6 DNA i spinalvæske og blod med PCR eller annen amplifikasjonsteknikk av nukleinsyrer er det beste diagnostiske redskapet. Det er grunn til å anta at den kliniske relevansen er større desto høyere virus-DNA mengden i spinalvæsken er. Ved de høyeste konsentrasjonene i spinalvæsken finner man som regel også en systemisk viremi som kan påvises i serum/plasma/helblod eller perifere mononukleære celler (22). Bruk av semikvantitative eller kvantitative metoder er å foretrekke. Best egnet er sannsynligvis real-time PCR (23).

Det er beskrevet tilfeller hvor man har påvist både HHV-6 DNA og EBV DNA i spinalvæsken samtidig. I ett tilfelle fant man en høy HHV-6 DNA mengde i spinalvæsken og noe lavere mengde i serum, mens EBV-DNA mengden i spinalvæske var liten og ikke påvisbar i serum. Man konkluderte derfor at tilstedeværelsen av EBV i spinalvæsken ikke hadde noen klinisk betydning (22).

Det knytter seg stor usikkerhet til hvor lenge man kan påvise HHV-6 (og EBV) DNA i spinalvæsken etter en CNS-infeksjon. Det er også omdiskutert hvorvidt en reaktivert infeksjon hos immunkompetente individer er i stand til å forårsake nevrologiske symptomer.

Det synes som om virusmengden er den mest kritiske faktoren, noe som igjen understreker betydningen av kvantitative målinger.

Det er også beskrevet en RT-PCR for påvisning av gp105 mRNA for å kunne skille mellom latent og aktivt replikerende virus, men det er uvisst om denne metoden vil få noen plass i praktisk diagnostikk (24).

## Referanser

1. Dahl H, Linde A, Sundqvist VA, Wahren B. An enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies to human herpes virus 6. *J Virol Methods* 1990;29:313-23.
2. Hall CB, Long CE, Schnabel KC, Caserta MT, McIntyre KM, Costanzo MA et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994;331:432-8.
3. Mukai T, Yamamoto T, Kondo T, Kondo K, Okuno T, Kosuge H et al. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol* 1994;42:224-7.
4. Asada H, Klaus-Kovtun V, Golding H, Katz SI, Blauvelt A. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol* 1999;73:4019-28.
5. He J, McCarthy M, Zhou Y, Chandran B, Wood C. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* 1996;70:1296-300.
6. Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991;72:1401-8.
7. Saito Y, Sharer LR, Dewhurst S, Blumberg BM, Hall CB, Epstein LG. Cellular localization of human herpesvirus-6 in the brains of children with AIDS encephalopathy [see comments]. *J Neurovirol* 1995;1:30-9.
8. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999;99:817-27.
9. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum [see comments]. *Lancet* 1988;1:1065-7.
10. Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, McIntyre K, Long C, Costanzo M et al. Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. *J Infect Dis* 1994;170:1586-9.
11. Yamanishi K, Kondo K, Mukai T, Kondo T, Nagafuji H, Kato T et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in the central nervous system. *Acta Paediatr Jpn* 1992;34:337-43.
12. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998;26:132-7.
13. Zerr DM. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:309-17.
14. Zerr DM. Case report: primary human herpesvirus-6 associated with an afebrile seizure in a 3-week-old infant. *J Med Virol* 2002;66:384-7.
15. Yoshikawa T, Nakashima T, Suga S, Asano Y, Yazaki T, Kimura H et al. Human herpesvirus-6 DNA in cerebrospinal fluid of a child with exanthem subitum and meningoencephalitis. *Pediatrics* 1992;89:888-90.
16. Sloots TP, Mackay IM, Carroll P. Meningoencephalitis in an adult with human herpesvirus-6 infection [letter]. *Med J Aust* 1993;159:838.
17. Asano Y, Yoshikawa T, Kajita Y, Ogura R, Suga S, Yazaki T et al. Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Arch Dis Child* 1992;67:1484-5.
18. Novoa LJ, Nagra RM, Nakawatase T, Edwards-Lee T, Tourtellotte WW, Cornford ME. Fulminant demyelinating encephalomyelitis associated with productive HHV-6 infection in an immunocompetent adult. *J Med Virol* 1997;52:301-8.
19. Drobyski WR, Dunne WM, Burd EM, Knox KK, Ash RC, Horowitz MM et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 1993;167:735-9.



20. Wilborn F, Schmidt CA, Brinkmann V, Jendroska K, Oettle H, Siegert W. A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J Neuroimmunol* 1994;49:213-4.
21. Mirandola P, Stefan A, Brambilla E, Campadelli-Fiume G, Grimaldi LM. Absence of human herpesvirus 6 and 7 from spinal fluid and serum of multiple sclerosis patients. *Neurology* 1999;53:1367-8.
22. Portolani M. Case of fatal encephalitis by HHV-6 variant A. *J Med Virol* 2001;65:133-7.
23. Locatelli G. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2000;38:4042-8.
24. Norton RA, Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Hocknell P, Dewhurst S. Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:3672-5.

## JCV OG BKV, LABORATORIEDIAGNOSTIKK

*Christine H. Rinaldo, Avdeling for mikrobiologi og virology, IMB, Universitetet i Tromsø.*

### Introduksjon til polyomavirus

JC virus (JCV) ble første gang isolert i 1971 ved at ekstrakt fra hjernevev fra en pasient som led av progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) ble tilsatt til humane føtale hjerneceller. Samme år ble BK virus (BKV) isolert fra urinen til en nyretransplantasjonspasient som var immunosupprimert. Navnene til virusene refererer til de første pasientenes initialer<sup>5</sup>.

JCV og BKV tilhører familien polyomavirus. Til nå er det identifisert 13 medlemmer av denne virusfamilie<sup>5</sup>. Inntil ganske nylig har man trodd at JCV og BKV var de eneste polyomavirusene med menneske som vert, men det er nå akseptert at også SV40, som har vært betraktet som erapevirus, infiserer mennesker. Flere hundre millioner personer kan ha blitt smittet av SV40 via kontaminerte poliovaksiner mellom 1955 og 1963<sup>14</sup>.

Alle polyomavirus har små, nakne icosahedrale kapsid (~ 45nm i diameter) som består av 3 virale proteiner (VP1-3). Genomene består av et enkelt molekyl ds DNA (ca 5000bp) som er kovalent lukket og supercoilet rundt fire cellulære histoner. Det virale minikromosomet kan deles i en ikke-kodende kontrollregion med promotere og enhancere og en kodende region som i tillegg til å kode for virale kapsidproteiner (VP1-3), koder for proteinene stort og lite T-antigen og agnoprotein. Genomene inneholder dessuten åpne leserammer for 3 ytterligere proteiner<sup>5</sup>. Mens den kodende region er relativt konstant, er det store variasjoner i den ikke-kodende kontrollregion til ulike stammer. Vanligvis finner man de enkleste kontrollregionvariantene i urin.

Infeksjon med JCV og BKV er vanligvis asymptomatisk og skjer i barndommen. Allerede i tidlige barneår har mellom 60–100 % antistoffer mot polyomavirus. Fortsatt kjenner vi verken smittevei eller hvordan viruset spres i kroppen. Både respirasjonsvei og fordøyelseskanal er foreslått som innfallsport. Etter primærinfeksjon etableres en latent eller en persistent infeksjon i nyrene og kanskje også andre steder som lymfoid vev. Det er funnet JCV DNA i lymfocytter hos mellom 5 og 40 % av den humane populasjonen<sup>19</sup>. Også BKV DNA er funnet i lymfocytter<sup>6</sup>. Ved nedsatt immunforsvar som hos gravide, eldre, transplantasjonspasienter og personer med AIDS, reaktiveres virusene og skilles ut i urin.

**JCV infeksjon** kan gi PML. PML er en demyeliniserende sykdom i CNS som skyldes reaktivering av JCV hos immunosupprimerte pasienter. I 85 % av tilfellene skyldes immunosuppresjon AIDS. Mellom 4-7 % av alle med AIDS utvikler PML. Ved reaktivering etablerer JCV en lytisk infeksjon i oligodendrocytter, cellene som produserer myelin i CNS. De demyeliniserte områdene danner multifokale plaquelesjoner som inneholder forstørrede hyperkromatiske oligodendrocytter, makrofager og bisarre astrocytter. Deteksjon av JCV DNA i spinalvæske ved PCR er meget nyttig for å diagnostisere PML<sup>20</sup>. En hjernebiopsi er imidlertid den eneste fullstendig spesifikke testen, da JCV DNA en sjelden gang kan påvises i spinalvæske uten at PML foreligger.

**BKV infeksjon** er assosiert med hemorragisk cystitt og nefritt, spesielt i mottagere av organer eller beinmarstransplantat. Noen tilfeller av BKV encefalitt, de fleste hos AIDS

pasienter, er også rapportert <sup>3,8,10,18</sup>. Et tilfelle av fatal vaskulopati er kjent<sup>11</sup>. For andre sykdommer som mistenkes å være assosiert med BKV infeksjon se oversikts artikkel <sup>13</sup>.

### Nåværende diagnostikk av polyomavirus infeksjon i CNS

Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) er alene om å utføre JCV PCR av spinalvæske. Indikasjon for å få utført JCV diagnostikk er mistanke om PML.

Fordi antall virus i spinalvæske kan være lavt, gjøres en semi-nested PCR – noe som gir både god sensitivitet og spesifisitet. Primerne ligger i virusets kodende region på hver side av den ikke-kodende kontrollregion. Første primerpar GPPY1/GPPY2 <sup>16</sup> gir et PCR produkt på ca 800bp. For å minske/fjerne eventuelle uspesifikke produkter og inhibitorer fortynnes PCR produktet 100 gang før neste PCR. Neste primerpar BKTT1<sup>7</sup>/GPPY2 gir et PCR produkt på ca 600 bp.

F.o.m. høsten 2002 vil UNN erstatte denne metoden med real-time PCR. Bruk av real-time PCR gir flere fordeler. Det er mindre fare for kontaminering, det er tidsbesparende og best av alt så er metoden kvantitativ. For JCV er det rapportert at høy virus load i CSF er assosiert med kortere pasient overlevelse <sup>9</sup>. Real-time metoden som er utviklet i samarbeid med Universitetet i Tromsø, benytter primere som binder til en del av T-antigen kodende region hos både BKV, JCV og SV40. Det benyttes Taqman prober som gir fullstendig spesifikk deteksjon.

Med denne metoden kan UNN undersøke både CNS og annet prøvemateriale for de til nå kjente humane polyomavirus BKV, JCV og SV40.

### Fremtidig diagnostikk av polyomavirus infeksjon i CNS?

Som tidligere nevnt er det vanligst å finne virusstammer med enkle kontrollregioner i urin. Både for JCV og BKV er det funnet mer komplekse kontrollregioner som inneholder både duplikasjoner og delesjoner, i CNS <sup>1,2,4,15,17</sup> og også i andre organer. Både for JCV og BKV spekuleres det nå i at variasjoner i ikke-kodende kontrollregion er viktig for å gjøre viruset virulent <sup>1,2,15</sup> og en rapport konkluderer med at tandem repetisjoner i kontrollregion til JCV korrelerer med dårlig prognose ved PML<sup>12</sup>.

Hvis det er en sammenheng mellom kompleksitet av kontrollregion og prognose bør også kontrollregion undersøkes i spinalvæske funnet positiv for polyomavirus. Dette innebærer at man må sette opp en PCR som amplifiserer denne delen og sekvensere PCR produktet. Vi har flere primersett som er egnet til dette formålet.

#### Litteratur:

1. **Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch, E. J. Singer, and G. L. Stoner.** 1997. JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: two independent aspects of virus variation. *J. Gen. Virol.* **78 ( Pt 3):**659-664.

2. **Ault, G. S. and G. L. Stoner.** 1993. Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. *J. Gen. Virol.* **74 ( Pt 8)**:1499-1507.
3. **Bratt, G., A. L. Hammarin, M. Grandien, B. G. Hedquist, I. Nennesmo, B. Sundelin, and S. Seregard.** 1999. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS* **13**:1071-1075.
4. **Caldarelli-Stefano, R., L. Vago, E. Omodeo-Zorini, M. Mediati, L. Losciale, M. Nebuloni, G. Costanzi, and P. Ferrante.** 1999. Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extraneural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *J. Neurovirol.* **5**:125-133.
5. **Cole, C. N.** 2001. Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication, p. 2141-2174. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and et al (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.
6. **Dolei, A., V. Pietropaolo, E. Gomes, C. Di Taranto, M. Ziccheddu, M. A. Spanu, C. Lavorino, M. Manca, and A. M. Degener.** 2000. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J. Gen. Virol.* **81**:1967-1973.
7. **Flaegstad, T., A. Sundsfjord, R. R. Arthur, M. Pedersen, T. Traavik, and S. Subramani.** 1991. Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology* **180**:553-560.
8. **Garavelli, P. L. and R. Boldorini.** 2002. [In Process Citation]. *Recenti Prog. Med.* **93**:247.
9. **Garcia, D., V. I. M. Diaz, P. Miralles, J. Berenguer, M. Marin, L. Munoz, and E. Bouza.** 2002. JC virus load in progressive multifocal leukoencephalopathy: analysis of the correlation between the viral burden in cerebrospinal fluid, patient survival, and the volume of neurological lesions. *Clin. Infect. Dis.* **34**:1568-1575.
10. **Lesprit, P., D. Chaline-Lehmann, F. J. Authier, T. Ponnelle, F. Gray, and Y. Levy.** 2001. BK virus encephalitis in a patient with AIDS and lymphoma. *AIDS* **15**:1196-1199.
11. **Petrogiannis-Haliotis, T., G. Sakoulas, J. Kirby, I. J. Koralnik, A. M. Dvorak, R. Monahan-Earley, P. C. DE Girolami, U. DE Girolami, M. Upton, E. O. Major, L. A. Pfister, and J. T. Joseph.** 2001. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* **345**:1250-1255.
12. **Pfister, L. A., N. L. Letvin, and I. J. Koralnik.** 2001. JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* **75**:5672-5676.
13. **Replogel, M. D., G. A. Storch, and D. B. Clifford.** 2001. Bk virus: a clinical review. *Clin. Infect. Dis.* **33**:191-202.
14. **Shah, K. and N. Nathanson.** 1976. Human exposure to SV40: review and comment. *Am. J. Epidemiol.* **103**:1-12.
15. **Stoner, G. L., R. Alappan, D. V. Jobes, C. F. Ryschkewitsch, and M. L. Landry.** 2002. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *Am. J. Kidney Dis.* **39**:1102-1112.
16. **Sundsfjord, A., A. R. Spein, E. Lucht, T. Flaegstad, O. M. Seternes, and T. Traavik.** 1994. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1390-1394.
17. **Vaz, B., P. Cinque, M. Pickhardt, and T. Weber.** 2000. Analysis of the transcriptional control region in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurovirol.* **6** :398-409.
18. **Voltz, R., G. Jager, K. Seelos, L. Fuhry, and R. Hohlfeld.** 1996. BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch. Neurol.* **53**:101-103.
19. **Weber, T. and E. O. Major.** 1997. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* **40**:98-111.
20. **Weber, T., R. W. Turner, S. Frye, W. Luke, H. A. Kretzschmar, W. Luer, and G. Hunsmann.** 1994. Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by amplification of JC virus-specific DNA from cerebrospinal fluid. *AIDS* **8**:49-57.

## CNS-INFEKTION MED HIV, LABORATORIEDIAGNOSTIK

*Birgitta Åsjö, Avd. för mikrobiologi och immunologi, Gades institutt, Universitetet i Bergen*

Infektion av centrala nervsystemet (CNS) med humant immunbristvirus (HIV) sker hos de flesta patienter i samband med primärinfektionen, vare sig patienterna har akuta CNS-symptom eller inte (1,2). Neurologiska komplikationer är vanligt förekommande hos HIV+ patienter (mellan 15-50% i olika material, ref. 3,4) och som förväntat ökar de i antal och svårighetsgrad med ökande immunbrist (5,6). Virus angrepp på CNS representerar kanske en av de allvarligaste kliniska konsekvenserna och patienterna kan uppvisa ett brett spektrum av neuropsykologiska defekter, som kollektivt benämnes HIV-associerad demens (HAD).

Symptomen kan vara ganska beskedna i början av infektionen för att sedan bli så omfattande att patienterna inte kan klara sina dagliga sysslor. Allvaret i diagnosen understrykes också av att patienterna oftast inte klarar att följa en komplicerad antiviral behandling.

Postmortem är de histopatologiska förändringarna i hjärnan oftast mycket måttliga och står inte i proportion till den demens patienterna uppvisat. Det morfologiska korrelatet till HAD är en HIV-encefalit som karakteriseras av multipla spridda noduli bestående av astroglis, aktiverade mikroglia/makrofager och multinukleära kempeceller med påvisbart virus (p24-antigen eller in situ hybridisering, ref. 7,8) och perivaskulär inflammation. Det finns ett klart samband mellan HIV-encefalit och HAD. I obduktionsmaterial kan man finna att c:a 50% av patienter med HAD har en påvisbar HIV-encefalit.

### INFEKTION

HIV infekterar huvudsakligen CD4+ lymfocyter, men också monocyter och olika vävnadsmakrofager fungerar som målceller. Förutom CD4-molekylen, som är primär receptor, måste virus binda sig till en sekundär cellulär struktur (co-receptor), representerad av en  $\alpha$ (CXCR4) eller en  $\beta$ (CCR5, CCR3) kemokinreceptor (9). Bruket av co-receptor ger en biologisk förklaring till de olikheter i *in vitro* biologiska egenskaper man har funnit och som legat till grund för skillnader i celltropism (10).

Vilka celler kan infekteras i CNS? Det råder full enighet om att mikroglia/makrofager är de huvudsakliga producenterna av virus i hjärnan. Mikroglia/makrofager är ett samlingsnamn för celler av monocytoid linje man finner i hjärnvävnad och i anslutning till meningier och choroid plexus (11,12). Flera experimentella *in vitro* försök visar att astrocyter kan infekteras med vissa virusisolat, men att infektionen är ineffektiv och den begränsas till produktion av några regulatoriska proteiner (13). Det är fortfarande osäkerhet om de endotelceller som bildar blod-hjärnbarriären (BBB) kan infekteras. Neuroner är det däremot enighet om att de inte verkar kunna infekteras även om hjärnatrofi är vanligt förekommande hos HIV-infekterade personer(14).

### PATOGENES

Det finns två teorier om hur HIV-infektion av CNS kan orsaka neurologiska skador och HAD.

- 1) *en direkt cytopatisk påverkan till följd av virusreplikation.* Neuroner uttrycker olika kemokinreceptorer bl.a CXCR4. I avsaknad av CD4 kan inte cellerna infekteras men kan troligen bli känsliga för apoptos när CXCR4 interagerar med gp120 från HIV (15,16)

- 2) *indirekt påverkan genom att HIV-infektionen och en aktivering av monocytoida celler i CNS leder till frisättning av en mångfald av cytokiner, kemokiner, andra signalsubstanser och virala proteiner som kan vara neurotoxiska.* Denna modell är den mest komplexa, men mest troliga och förklarar neuroners död utan att de behöver infekteras av HIV (17). "Trafficking" är ett begrepp som innebär passage av mononukleära celler från blodbanan genom BBB in till hjärnan, genom CNS och tillbaka ut i blodbanan igen (12,18). HIV kan använda sig av denna fysiologiska transportväg eller passera som fria virioner. HIV-infektion av mikroglia leder till produktion av både strukturella och regulatoriska virusproteiner (t.ex. gp120 och Tat) samt viruspartiklar. Gp120 har visat sig vara toxiskt för neuronerna (19) medan Tat påverkar astrocyter till produktion av MCP-1 vilket attraherar monocyter genom BBB (20). Tat uppreglerar också CCR5 expression på monocytoida celler vilket ökar deras migrationsförmåga och infekterbarhet med HIV (21, 22). Aktiverade makrofager producerar TNF- $\alpha$  och IL-1 $\beta$ , som ökar expressionen av adhesionsmolekyler på endotelceller i BBB, vilket leder till ökad migration av monocyter in till CNS.

## DIAGNOSTIK

HIV-infektion av CNS kan laboratoriediagnostiskt påvisas serologiskt som virusspecifika antikroppar i spinalvätska, som fria virioner eller cellassocierat. Med tillgång till dagens känsliga molekylärbiologiska metoder har antikropps-baserad diagnostik mist mycket av sin betydelse för att påvisa intratekal virusproduktion. Tolkningen av resultaten kan också försvåras av att patienterna kan uppvisa en barriärskada relativt tidigt i sin HIV-infektion (23). Metoden kan ändå försvara sin plats som ett lågkostnadsalternativ eller i ett laboratorium med begränsade molekylärbiologiska resurser.

Nukleinsyre-baserad diagnostik (bl.a. PCR) av spinalvätska har revolutionerat våra möjligheter att identifiera de mikroorganismer som infekterar CNS (24-26). Monitorering av antalet CD4+ lymfocyter och kvantitativ bestämning av HIV-RNA i framförallt plasma men också i spinalvätska (vid tecken på neurologisk påverkan), har blivit rutinmetoder för att följa progressionen av patienternas HIV-infektion med eller utan antiretroviral behandling (5,27,28).

Erfarenheterna av antiretroviral behandling (HAART) är att nedgången i HIV-RNA kan visa olika kinetik i olika organ (5,29) samt att virus med tiden utvecklar resistens mot de olika medicinerna. Bruk av PCR-baserad sekvenseringsteknik innebär en ny, värdefull och förhållandevis snabb möjlighet att identifiera genotypiska mutationer. Närvaro av både anatomiska och funktionella barriärer inom CNS skapar förutsättningar för en vävnadsreservoar där HIV kan "leva sitt eget liv" (29-31). Det finns ännu inte många publicerade undersökningar av resistensproblematiken inom CNS men några studier visar att det är en realitet (32,33) som antagligen kommer få större betydelse desto längre tid patienterna stått på behandling. Kompartimentalisering av HIV-replikationen och förekomsten av långlivade celler med arkivariskt virus som kan ha olika resistensmutationer är ett generellt problem i behandlingen av HIV+ patienter och är en av de stora utmaningarna i samarbetet mellan diagnostiskt laboratorium och behandlande kliniker.

HIV kan också påvisas som infektiöst virus i spinalvätska, antingen som fria virioner eller cellassocierat (i lymfocyter eller monocyter). Virusisolering spelade en större roll i början av HIV-epidemin än vad den gör idag. HIV-isolering är både tids- och resurskrävande samt skall ske i laboratorium med BSL-3 standard. För att uppnå tillfredställande isoleringsresultat är det helt nödvändigt med personal som har löpande erfarenhet med isolering och odling av HIV. Per idag finns ett ställe i Norge som uppfyller dessa krav, Senter for virologisk

forskning, UiB, Høyteknologisenteret i Bergen. Virusisolering kan fortfarande erbjudas men endast efter direkt avtale med Birgitta Åsjö, tel: 55 58 45 08 eller fax: 55 58 45 12.

## TOLKNING AV RESULTAT

Nukleinsyrebaserad teknologi applicerad på spinalvätska representerar ett mycket kraftfullt redskap i diagnostiken av infektioner i CNS. Även om erfarenheten från PCR-diagnostik av olika virusinfektioner i CNS talar för att virus inte kan detekteras i spinalvätska med mindre hjärnan är infekterad (24,26,34), måste resultaten tolkas med försiktighet och förnuft i relation till övriga kliniska parametrar hos patienten. Påvisbart HIV-RNA i spinalvätska kan teoretiskt ha sitt ursprung från tre olika källor.

1) *mikroglia/makrofager* i hjärnparenkym. Vanligen är det diskordance mellan HIV-RNA i plasma och spinalvätska, som då kan ha mycket höga värden. Detta kan ses i mer avancerade stadier av neurologisk påverkan och vid HIV-encefalit (4,34).

3) lokal låggradig virusproduktion från *meningeala eller perivaskulära makrofager* ses hos asymptomatiske HIV+ personer (30). Vanligen är HIV-RNA högre i plasma än i spinalvätska.

4) *lymfocytär "trafficking" från blod till spinalvätska*. Patienter med opportunistiska CNS-infektioner kan ha höga HIV-RNA värden och det är en korrelation mellan antalet mononukleära celler och HIV-RNA i spinalvätskan (35,36). Situationen kan kompliceras ytterligare av att opportunistiska mikroorganismer kan stimulera till ökad HIV-replikationen (37). HIV-RNA värdena återspeglar alltså inte den direkta CNS-infektionen utan en amplifiering av virus i inflammatoriska celler.

## SAMMANFATTNING:

I och med att HIV-infektionen etableras i CNS på ett tidigt stadium i infektions-förloppet kan HIV-RNA som oftast påvisas med molekylärbiologisk metodik även i frånvaro av CNS-symptom. Vid tillkomst av akuta CNS-symptom är det viktigt att först undersöka om en infektion med behandlingbara opportunistiska mikroorganismer kan förklara patientens symptom. Oftast utförs en HIV-RNA kvantifiering samtidigt i plasma och spinalvätska och i frånvaro av andra mikroorganismer blir den bakomliggande HIV-infektionen en uteslutningsdiagnos.

## REFERENSER:

- 1) Carne CA, Tedder RS, Smith A, Sutherland S, Elkington SG, Daly HM, Preston FE, Craske J. Acute encephalopathy coincident with seroconversion for anti-HTLV-III. *Lancet*. 1985, 8466:206-8.
- 2) Enting RH, Prins JM, Jurriaans S, Brinkman K, Portegies P, Lange JM. Concentrations of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in cerebrospinal fluid after antiretroviral treatment initiated during primary HIV-1 infection. *Clin Infect Dis*. 2001, 32:1095-9.
- 3) Dunlop, O. Brain affliction in AIDS. Akademisk avhandling, Ullevål sjukhus, Universitetet i Oslo, 1999
- 4) McArthur JC, Hoover DR, Bacellar H, Miller EN, Cohen BA, Becker JT, Graham NM, McArthur JH, Selnes OA, Jacobson LP. Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study. *Neurology*. 1993, 43:2245-52.
- 5) Sharer LR. Pathology of HIV-1 infection of the central nervous system. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992, 51:3-11.
- 6) Brew BJ, Pemberton L, Cunningham P, Law MG. Levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in cerebrospinal fluid correlate with AIDS dementia stage. *J Infect Dis*. 1997, 175:963-6.

- 7) Wiley CA, Achim C. Human immunodeficiency virus encephalitis is the pathological correlate of dementia in acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol.* 1994, 36:673-6.
- 8) Takahashi K, Wesselingh SL, Griffin DE, McArthur JC, Johnson RT, Glass JD. Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Ann Neurol.* 1996, 39:705-11.
- 9) Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol.* 1997, 62:20-9
- 10) Åsjö B, Morfeldt-Månson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidman K, Fenyö EM. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet.* 1986, 8508:660-2.
- 11) Vazeux R. AIDS encephalopathy and tropism of HIV for brain monocytes/macrophages and microglial cells. *Pathobiology.* 1991, 59:214-8.
- 12) Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol.* 1999, 2:125-37.
- 13) Brack-Werner R. Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS.* 1999, 13:1-22
- 14) Gray F, Haug H, Chimelli L, Geny C, Gaston A, Scaravilli F, Budka H. Prominent cortical atrophy with neuronal loss as correlate of human immunodeficiency virus encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 1991, 82:229-33.
- 15) Gabuzda D and Wang J: Chemokine receptors and mechanisms of cell death in HIV neuropathogenesis. *J.Neurovirol.* 2000, 6 Suppl 1: S24-32
- 16) Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature.* 2001, 410:988-94.
- 17) Nottet HS and Gendelman HE. Unraveling the neuroimmune mechanisms for the HIV-1-associated cognitive/motor complex. *Immunol Today.* 1995, 16:441-8.
- 18) Wu DT, Woodman SE, Weiss JM, McManus CM, D'Aversa TG, Hesselgesser J, Major EO, Nath A, Berman JW. Mechanisms of leukocyte trafficking into the CNS. *J Neurovirol.* 2000, 6 Suppl 1:S82-5.
- 19) Yeung MC, Pulliam L, Lau AS. The HIV envelope protein gp120 is toxic to human brain-cell cultures through the induction of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *AIDS.* 1995, 9:137-43.
- 20) Persidsky Y, Stins M, Way D, Witte MH, Weinand M, Kim KS, Bock P, Gendelman HE, Fiala M. A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J Immunol.* 1997, 158:3499-3510.
- 21) Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Droge W, Lehmann V. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J.* 1995, 14:546-54.
- 22) McManus CM, Weidenheim K, Woodman SE, Nunez J, Hesselgesser J, Nath A, Berman JW. Chemokine and chemokine-receptor expression in human glial elements: induction by the HIV protein, Tat, and chemokine autoregulation. *Am J Pathol.* 2000, 156:1441-53.
- 23) Andersson LM, Hagberg L, Fuchs D, Svennerholm B, Gisslen M. Increased blood-brain barrier permeability in neuro-asymptomatic HIV-1-infected individuals--correlation with cerebrospinal fluid HIV-1 RNA and neopterin levels. *J Neurovirol.* 2001, 6:542-7.
- 24) Cinque P, Scarpellini P, Vago L, Linde A, Lazzarin A. Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS.* 1997, 11:1-17.
- 25) Cinque P, Bestetti A, Morelli P, Presi S. Molecular analysis of cerebrospinal fluid: potential for the study of HIV-1 infection of the central nervous system. *J Neurovirol.* 2000, 6 Suppl 1:S95-S102.
- 26) Mamidi A, DeSimone JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol.* 2002, 8:158-67.
- 27) Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* 1996, 272:1167-70.
- 28) Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho DD. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature.* 1997, 387:188-91.
- 29) Staprans S, Marlowe N, Glidden D, Novakovic-Agopian T, Grant RM, Heyes M, Aweeka F, Deeks S, Price RW. Time course of cerebrospinal fluid responses to antiretroviral therapy: evidence for variable compartmentalization of infection. *AIDS.* 1999, 13:1051-61.
- 30) Garcia F, Niebla G, Romeu J, Vidal C, Plana M, Ortega M, Ruiz L, Gallart T, Clotet B, Miro JM, Pumarola T, Gatell JM. Cerebrospinal fluid HIV-1 RNA levels in asymptomatic patients with early stage chronic HIV-1 infection: support for the hypothesis of local virus replication. *AIDS.* 1999, 13:1491-6.



- 31) Stingele K, Haas J, Zimmermann T, Stingele R, Hübsch-Müller C, Freitag M, Storch-Hagenlocher B, Hartmann M and Wildemann B. Independent HIV replication in paired CSF and blood viral isolates during antiretroviral therapy. *Neurology*. 2001, 56:355-61.
- 32) Cunningham PH, Smith DG, Satchell C, Cooper DA, Brew B. Evidence for independent development of resistance to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in the cerebrospinal fluid. *AIDS*. 2000, 14:1949-54.
- 33) Tashima KT, Flanigan TP, Kurpewski J, Melanson SM, Skolnik PR. Discordant Human Immunodeficiency Virus Type 1 drug resistance mutations, including K103N, observed in cerebrospinal fluid and plasma. *Clin Infect Dis*. 2002, 35:82-3.
- 34) Cinque P, Vago L, Ceresa D, Mainini F, Terreni MR, Vagani A, Torri W, Bossolasco S, Lazzarin A. Cerebrospinal fluid HIV-1 RNA levels: correlation with HIV encephalitis. *AIDS*. 1998, 12:389-94.
- 35) Martin C, Albert J, Hansson P, Pehrsson P, Link H, Sönnnerborg A. Cerebrospinal fluid mononuclear cell counts influence CSF HIV-1 RNA levels. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998, 17:214-9.
- 36) Morris L, Silber E, Sonnenberg P, Eintracht S, Nyoka S, Lyons SF, Saffer D, Koornhof H and Martin DJ. High human immunodeficiency virus type 1 RNA load in the cerebrospinal fluid from patients with lymphocytic meningitis. *J Infect Dis*. 1998, 177:473-6.
- 37) Pettoello-Mantovani M, Casadevall A, Kollmann TR, Rubinstein A, Goldstein H. Enhancement of HIV-1 infection by the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet*. 1992, 339:21-3.